

Eigenschaften, Funktionen und Interaktionen des
Glutaredoxin S17 aus *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(*doctor rerum naturalium*)

-Dr. rer. nat.-

Eingereicht am Fachbereich Biologie/Chemie der
Universität Osnabrück

von

Dipl.-Biol. Nicolas König

Osnabrück, 2012

Gutachter:

Frau Prof. Dr. Renate Scheibe

Frau Prof. Dr. Sabine Zachgo

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE THIOREDOXIN-FAMILIE	2
1.1.1	<i>Eigenschaften der Trx und Grx in A. thaliana</i>	3
1.1.1.1	Trx.....	4
1.1.1.2	Grx	6
1.1.2	<i>Reaktionsmechanismen der Trx & Grx</i>	8
1.1.3	<i>[2Fe-2S]-Cluster-bindende Grx</i>	11
1.1.4	<i>Trx-Grx-Fusionsproteine</i>	13
1.1.4.1	Trx-Grx-Fusionsproteine aus nicht pflanzlichen Organismen	14
1.1.4.2	Struktur und Funktion des AtGRXS17-Proteins.....	14
1.2	ZIELSETZUNG	17
2	MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1	MATERIALIEN.....	19
2.1.1	<i>Verwendete Pflanzen</i>	19
2.1.2	<i>Bakterienstämme</i>	19
2.1.3	<i>Verwendete Kulturmedien und Selektionsantibiotika</i>	20
2.1.4	<i>Verwendete Primer</i>	21
2.1.5	<i>Plasmide</i>	22
2.2	KULTIVIERUNG DER PFLANZEN	22
2.2.1	<i>Anzucht von A. thaliana auf Erde</i>	22
2.2.2	<i>Oberflächensterilisation von Samen</i>	23
2.2.3	<i>Steril-Anzucht auf ½ Murashige & Skoog (MS)-Medium</i>	23
2.2.4	<i>Glutathion (GSH)-Behandlung</i>	24
2.2.5	<i>Gibberellinsäure (GA₃)-Behandlung</i>	24
2.2.6	<i>Pollen-Vitalitätstest mittels Alexander-Stain-Methode</i>	24
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	25
2.3.1	<i>Kultivierung und Selektion von Bakterien</i>	25
2.3.2	<i>Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen</i>	25
2.3.3	<i>Herstellung chemisch kompetenter A. tumefaciens-Zellen</i>	26
2.3.4	<i>Transformation von Plasmid-DNA in E. coli</i>	26
2.3.5	<i>Transformation von Plasmid-DNA in A. tumefaciens</i>	27
2.3.6	<i>Transformation von Plasmid-DNA in A. thaliana durch A. tumefaciens</i>	27
2.3.7	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien</i>	28
2.3.8	<i>Maxi-Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien</i>	28
2.3.9	<i>Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzengewebe</i>	30
2.3.10	<i>Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe</i>	30

Inhaltsverzeichnis

2.3.11	Präzipitation von DNA oder RNA	30
2.3.12	Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration	31
2.3.13	DNA-Restriktion	31
2.3.14	Synthese von cDNA	31
2.3.15	Insertion von DNA-Sequenzen in Vermehrungsvektoren	32
2.3.16	Insertion von DNA-Sequenzen in Überexpressionsvektoren	32
2.3.17	DNA-Sequenzierung	32
2.3.18	Erstellung von Glycerinkulturen	32
2.3.19	Amplifizierung von Gen-Sequenzen mittels PCR	32
2.3.20	qRT-PCR	33
2.3.21	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	34
2.3.22	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
2.3.23	Einführung einer Punktmutation in ein Gen-Vektorkonstrukt	35
2.3.24	Identifizierung von T-DNA-Insertions-Linien mittels PCR	35
2.3.25	Nachweis von homozygoten T-DNA-Insertions-Transformanten mittels PCR	36
2.3.26	In situ-Hybridisierung (ISH)	36
2.3.26.1	Anfertigung von Schnittpräparaten	37
2.3.26.2	Synthese und Test der RNA-Sonden	37
2.3.27	Isolierung von Blattprotoplasten aus <i>A. thaliana</i>	40
2.3.28	Transformation von Plasmid-DNA in <i>A. thaliana</i> Blatt-Protoplasten	41
2.3.29	Mikroskopie von transformierten Blattprotoplasten am Fluoreszenzmikroskop	42
2.4	BIOCHEMISCHE METHODEN	43
2.4.1	Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen	43
2.4.2	Reinigung von Proteinen mit His-tag aus <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS-Zellen	43
2.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford	44
2.4.4	Entsalzen von Proteinen-Lösungen	44
2.4.5	Aceton-Fällung	44
2.4.6	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.4.7	Herstellung von Protein-Rohextrakt aus <i>A. thaliana</i> -Pflanzen	45
2.4.8	AtGRXS17-Interaktionsstudien an einer Ni ²⁺ -NTA-Säule	46
2.4.9	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	47
2.4.10	Eisen-Schwefel-Cluster-Inkorporation	47
2.4.11	Histochemische Lokalisierung der β -Glucuronidase-Aktivität	48
2.5	BIOINFORMATISCHE METHODEN	48
2.5.1	Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen	48
2.5.2	Sequenzanalysen und Primerdesign	49
3	ERGEBNISSE	50
3.1	BIOINFORMATISCHE ANALYSEN VON ATGRXS17	50

3.1.1	<i>Phylogenetische Untersuchungen von GRXS17 aus photosynthetisch aktiven Organismen</i>	50
3.1.2	<i>Promotoranalysen von AtGRXS17</i>	54
3.1.3	<i>In silico-Transkriptmengenanalysen</i>	56
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSEN VON ATGRXS17	61
3.2.1	<i>Transkriptmengenanalyse von AtGRXS17 -mRNA mittels qRT-PCR</i>	61
3.2.2	<i>Herstellung und Untersuchung von grxs17_(prom)::GUS Pflanzen</i>	62
3.2.3	<i>In situ-Hybridisierungs (ISH)-Analysen von AtGRXS17-mRNA</i>	64
3.2.4	<i>Subzelluläre Lokalisation von AtGRXS17 in transient transformierten Protoplasten</i>	65
3.3	CHARAKTERISIERUNG DER PROTEINEIGENSCHAFTEN VON ATGRXS17	67
3.3.1	<i>Proteinexpression von AtGRXS17 und Cystein-Austausch-Mutanten</i>	67
3.3.2	<i>Nachweis von Eisen-Schwefel-Clustern [2Fe-2S] in AtGRXS17-Proteinen</i>	68
3.3.3	<i>Größenbestimmung des rekombinanten AtGRXS17-Proteins</i>	70
3.3.4	<i>Analyse des dimeren Auftretens des AtGRXS17 in vivo mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC)</i>	71
3.3.5	<i>Nachweis einer Oxidoreduktase-Aktivität mittels Insulin-Assay</i>	72
3.4	FUNKTIONSANALYSE DES ATGRXS17	74
3.4.1	<i>Interaktionsstudien mit dem rekombinanten AtGRXS17</i>	74
3.4.2	<i>Identifizierung von Trx-Interaktionspartnern durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)</i>	75
3.4.3	<i>Fluoreszenzmikroskopische Analysen von AtGRXS17, NF-YC11 und der Kinase At1g50570</i>	78
3.5	FUNKTIONSANALYSEN VON ATGRXS17 MITTELS T-DNA-INSERTIONS-KO-PFLANZEN	80
3.5.1	<i>AtGRXS17-T-DNA-Insertions-Pflanzen unter verschiedenen Lichtperioden</i>	81
3.5.2	<i>Blütenmorphologische Veränderungen der KO-Pflanzen</i>	85
3.5.3	<i>Reproduktiver Erfolg der KO- im Vergleich zu den WT-Pflanzen</i>	87
3.5.4	<i>Revertierbarkeit des Phänotyps durch Vernalisierung und GA-Behandlung</i>	89
4	DISKUSSION	91
4.1	PHYLOGENIE DES ATGRXS17	91
4.2	TRANSKRIPTION DES ATGRXS17-GENS	92
4.3	BIOCHEMISCHE UND FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN DES ATGRXS17-PROTEINS	97
4.3.1	<i>Dimerisierung und [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung in AtGRXS17</i>	97
4.3.2	<i>Kerntranslokation von AtGRXS17</i>	100
4.3.3	<i>Mögliche Interaktionspartner von AtGRXS17</i>	104
4.3.3.1	<i>Interaktion von AtGRXS17 mit Kinasen</i>	106
4.3.3.2	<i>Interaktionen von AtGRXS17 mit Transkriptionsfaktoren</i>	107
4.4	PHÄNOTYPEN DER ATGRXS17-KO-PFLANZEN	110
4.4.1	<i>Rolle von AtGRXS17 an der Blühinduktion im Langtag</i>	111

Inhaltsverzeichnis

4.4.2	<i>Rolle von AtGRXS17 an der Blütenbildung im Langtag</i>	117
5	ZUSAMMENFASSUNG	121
6	SUMMARY	123
7	LITERATURVERZEICHNIS	125
8	ANHANG	137
8.1	ABKÜRZUNGEN	137
8.2	MATERIALIEN	139
8.2.1	<i>Verwendete Geräte</i>	139
8.2.2	<i>Verwendete Chemikalien</i>	140
8.2.3	<i>Verwendete Enzyme</i>	141
8.2.4	<i>Verwendete Verbrauchs-Materialien</i>	141
8.2.5	<i>Verwendete Software</i>	142
8.3	LISTE DER TRX IN A. THALIANA	143
8.4	LISTE DER GRX IN A. THALIANA	144
8.5	PHÄNOTYP DER ATGRXS17-MUTANTE UNTER HL	145
9	DANKSAGUNG	147
10	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	149

1 Einleitung

Pflanzen beziehen als photoautotrophe Organismen die Energie für Wachstum und Entwicklung aus dem sichtbaren Licht. Sie können die Energie bestimmter Wellenlängen in die biochemisch nutzbaren Energieformen, wie Adenosintriphosphat (ATP) und Reduktionsäquivalente Nicotinamidadeninukleotidphosphat_{red} (NADPH + H⁺), überführen. Der als Lichtreaktion bezeichnete Prozess findet in den Thylakoiden der Chloroplasten statt. Die Produkte ATP und NADPH + H⁺ ermöglichen alle weiteren endergonischen Reaktionen. Zu ihnen gehören die Reduktion von Kohlendioxid, Nitrat und Sulfat sowie weitere energiebedürftige Prozesse (SCHEIBE, 2004).

Neben der Nutzung des Lichts als Energiequelle werden Teile des spektralen Bereichs mittels verschiedener Sensorpigmente als Informationsquelle genutzt (LI *ET AL.*, 2009c). So ist es möglich, dass Pflanzen ihren Stoffwechsel und Differenzierungsprozesse an die jeweiligen Lichtbedingungen anpassen. Ebenfalls wird die Synchronisation des zirkadianen Rhythmus durch das Licht gesteuert und reguliert seinerseits bis zu 36 % des Transkriptoms einer Pflanze (MICHAEL & McCLUNG, 2003). Morphologische Differenzierungsprozesse, wie bspw. die Steuerung des Zeitpunktes für den Übergang von vegetativer zu reproduktiver Phase, werden aus einem komplexen System aus exogenen und endogenen Signalen gesteuert (BOSS *ET AL.*, 2004). Zu dem exogenen Signal des Lichtes werden weitere Informationen aus der Umgebung wie die Temperatur, die Verfügbarkeit von Mineralien und Wasser (abiotische Faktoren) in endogene Signalkaskaden umgesetzt und mit den Signalen, die sich aus dem Entwicklungszustand der Pflanze ergeben, auf molekularer Ebene integriert. Zu diesen endogenen Signalträgern können unterschiedliche Substanzen gehören wie Proteine, Phytohormone, Ribozyme, kleine nicht codierende RNA's (miRNA), Zwischenprodukte des Stoffwechsels, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen (*reactive oxygen species*; ROS, *reactive nitrogen species*; RNS). In ihrer Gesamtheit „orchestrieren“ diese molekularen Faktoren den Stoffwechsel in einem physiologischen Bereich und bestimmen so den Lebenszyklus einer Pflanze (MITTLER, 2004). Wird dieses Gleichgewicht gestört, laufen biochemische Reaktionen ineffizient oder unvollständig ab. Es sammeln sich Zwischenprodukte an, die zu einer Verschiebung des zellulären Redox-Zustandes führen. Dies kann zur Bildung von großen Mengen an ROS oder RNS führen. ROS und RNS

schädigen aufgrund ihrer hohen Reaktivität DNA, Proteine und Bestandteile von biologischen Membranen, sodass es zum Absterben der betroffenen Zellen kommen kann (VAN BREUSEGEM & DAT, 2006). Um diese Verschiebungen in einem physiologischen Bereich zu halten, besitzen Pflanzen effektive Redox-Puffer wie Ascorbat, Glutathion, Tocopherol und Phyllochinon, die u. a. durch redox-aktive Redoxine regeneriert werden können (NOCTOR & FOYER, 1998; DIETZ & SCHEIBE, 2004; FOYER & NOCTOR, 2005 a, b; SCHEIBE, 2010). Diese Redoxine können mittels ihres aktiven Zentrums (-C-X-X-C-) einen reversiblen Redoxwechsel durchlaufen und stehen dann ihrerseits wieder zur Verfügung (vgl. 1.1.2). Weitere Aufgaben der Redoxine sind der direkte Schutz von aktiven Zentren gefährdeter Proteine, die Beeinflussung von Stoffwechselwegen in ihrer Aktivität oder eine Einflussnahme auf die Transkription (DIETZ, 2008; ROUHIER *ET AL.*, 2008; MEYER *ET AL.*, 2012). Zu diesen Redoxinen gehören die im Folgenden näher beschriebenen Thioredoxine (Trx) und Glutaredoxine (Grx).

1.1 Die Thioredoxin-Familie

Das Strukturmotiv der Trx-Familie besteht aus vier bzw. fünf antiparallelen β -Faltblättern (Abb. 1), die von drei bis fünf α -Helices umgeben sind (HOLMGREEN *ET AL.*, 1975; MARTIN, 1995). Aus den Variationen in diesem Strukturmotiv ergeben sich unterschiedliche

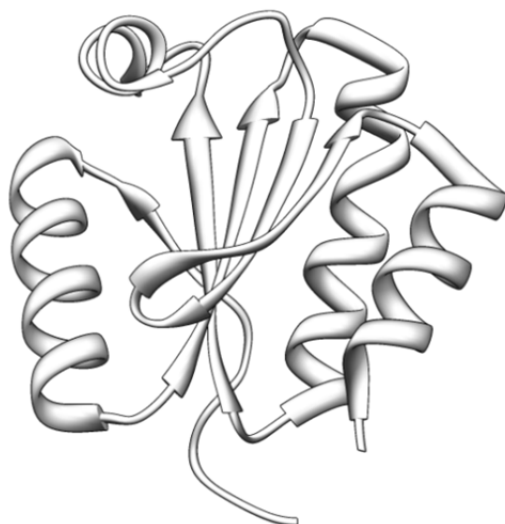


Abb. 1: Struktur des Thioredoxin h1 aus *A. thaliana* (PDB-Datei: 1XFL; Petterson et al., 2005). Charakteristisch sind die vier α -Helices, die das sich in der Mitte befindliche fünfstrahlige β -Faltblatt umgeben.

Funktionen und Interaktionen. Benannt wurde die Thioredoxin-Familie nach der zuerst beschriebenen Struktur der Trx. Die tertiäre Struktur der Thioredoxin-Familie ist in allen Reichen, von Archaeen bis hin zu den Eukaryonten, aber auch in Phagen, verbreitet und hoch konserviert, während die Zusammensetzung der Aminosäuren stark variiert (MEYER *ET AL.*, 2008; ROUHIER *ET AL.*, 2008; BORDEN & RICHARDS, 1990). Die einfachste bekannte Faltung dieser Art ist die des GLUTAREDOXIN 1 (GRX1) aus *E. coli* (EKLUND *ET AL.*, 1984). Die Thioredoxin-

Familie ist ein Mitglied der Thioredoxin-Supra-Familie, die bioinformatisch identifiziert wurde. Ihr konnten 159 Protein-Familien und 4082 Proteinsequenzen aus allen Reichen der sequenzierten Organismen zugeordnet werden. Damit stellt sie 0,45 % aller Proteine in der UniProt-Datenbank (<http://www.uniprot.org/>) (ATKINSON & BABBITT, 2009). Die Thioredoxin-Familie allein umfasst vierzehn funktionell unterschiedliche Protein-Familien, denen 723 Proteine zugeschrieben werden (MARTIN, 1995; GIORDANO *ET AL.*, 2003; QI & GRISHIN, 2005). Die dreizehn weiteren Mitglieder der Thioredoxin-Familie sind in Tabelle 1 zusammengetragen.

Tabelle 1 Mitglieder der Thioredoxin-Familie. Zusammengetragen aus MARTIN (1995), GIORDANO *ET AL.* (2003) und QI & GRISHIN (2005)

Abkürzung	Name / Beschreibung
DSB	Disulfidbrücken-bildende Proteine
PDI	Protein-Disulfid-Isomerasen
gU	Protein-Disulfid-Oxidoreduktasen
QSOX	Quiescin-Sulfhydryl-Oxidasen
GST	Glutathion-S-Transferase
ARSC	Arsenat-Reduktase
GPX	Glutathionperoxidase
GRX	Glutaredoxin
PRX	Peroxiredoxinen
CLIC	intrazelluläre Chlorid-Kanäle
SCO	Kupfer-Ionen-bindenden Proteine
NTRC	chloroplastidäre NADP-Trx-Reduktase
AGPase	ADP-Glukose-Pyrophosphorylase

1.1.1 Eigenschaften der Trx und Grx in *A. thaliana*

Das in dieser Arbeit näher untersuchte AtGRXS17 kann aufgrund seiner Domänenzusammensetzung sowohl den Trx als auch den Grx zugeordnet werden (vgl. 1.1.4.1). Sowohl Trx als auch Grx sind kleine, hitzestabile, globuläre Oxidoreduktasen. Sie bestehen aus 110 +/- 15 Aminosäuren und sind zwischen 9 bis 16 kDa schwer (EKLUND *ET AL.*, 1991; HOLMGREN, 1989). Entdeckt wurden die Trx 1964 und Grx 1975, jeweils als Wasserstoff-Donor für eine Ribonukleotid-Reduktase (RNR) in *E. coli* (LAURENT *ET AL.*, 1964; HOLMGREN *ET AL.*, 1975). Beide Familien besitzen das Trx-Strukturmotiv und eine funktionelle Verwandtschaft, die sich in einem ähnlichen Reaktionsmechanismus bemerkbar macht (Abb. 4). Die Anzahl der Mitglieder der Trx als auch der Grx sind in *A. thaliana* höher als in anderen eukaryotischen Organismen. In *A. thaliana* gibt es 43 Trx und je nach Definition zwischen 31 und 50 Grx. Die kleinere Anzahl gibt die „klassischen“ Grx für *A. thaliana* wieder (STÖHER *ET AL.*, 2012). Die größere

Anzahl umfasst auch Grx, deren aktive Zentren von den klassischen Sequenzmotiven abweichen bzw. Proteine einschließen, die aus mehr als einer Domäne bestehen (ROUHIER *ET AL.*, 2004; MEYER *ET AL.*, 2012).

1.1.1.1 Trx

Nach phylogenetischen Untersuchungen teilen sich die Trx in 15 Gruppen auf, deren Vertreter in den gleichen subzellulären Kompartimenten vorkommen (MEYER *ET AL.*, 2012). Alle in *A. thaliana* identifizierten Trx sind kernkodiert. Die subzellulären Lokalisationen der Trx wurden durch bioinformatische Sequenzanalysen der Transitsequenz und/oder mittels GFP-Fusions-Studien an transient transformierten Protoplasten ermittelt (MEYER *ET AL.*, 2002; COLLIN *ET AL.*, 2003).

Die in den Chloroplasten lokalisierten Trx bilden die größte Gruppe (Abb. 2). Die am besten verstandene Funktion der Trx in diesem Kompartiment ist die Licht/ Dunkel-Modulation von Enzymen. Dabei werden Elektronen vom Photosystem I (PSI) über Ferredoxin (Fd) und Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (FTR) auf das Trx übertragen. Die jetzt reduziert vorliegenden Trx können nun Enzyme des Calvin-Zyklus durch Reduktion von Disulfidbrücken regulieren (BUCHANAN, 1980; WOLOSUIK *ET AL.*, 1980; SCHEIBE, 1991). Neben diesen Zielenzymen wurden über 300 potentielle Interaktionspartner für chloroplastidäre Trx identifiziert (BUCHANAN & BALMER, 2005; HISABORI *ET AL.*, 2005; MICHELET *ET AL.*, 2006). Unter diesen befinden sich neben an der Kohlenstoff-Assimilation beteiligten Proteinen auch zahlreiche Proteine, die an unterschiedlichen Stoffwechselwegen wie Stickstoff-Assimilation, Aminosäure- und Fettsäure-Synthese, aber auch an der plastidären Translation oder Protein-Faltung beteiligt sind (LEMAIRE *ET AL.*, 2007; MONTRICHARD *ET AL.*, 2009).

Über die Funktion und Anzahl der Trx in den Mitochondrien ist bisher wenig bekannt. Obwohl TRX o1 das einzige Trx ist, das eine Transitsequenz für dieses Kompartiment besitzt, konnten weitere Trx in diesem Kompartiment identifiziert und putative Interaktionspartner ausgemacht und teilweise bereits *in vitro* verifiziert werden (MEYER *ET AL.*, 2006; BALMER *ET AL.*, 2004; GELHAYE *ET AL.*, 2004; BARRANCO-MEDINA *ET AL.*, 2008).

Für die zytosolischen Trx aus *A. thaliana* konnten ebenfalls eine große Anzahl an möglichen Interaktionspartner gefunden werden, deren Funktionen vielfältig sind. Einige der Interaktionspartner sind an metabolischen Prozessen, der Abwehr von Pathogenen

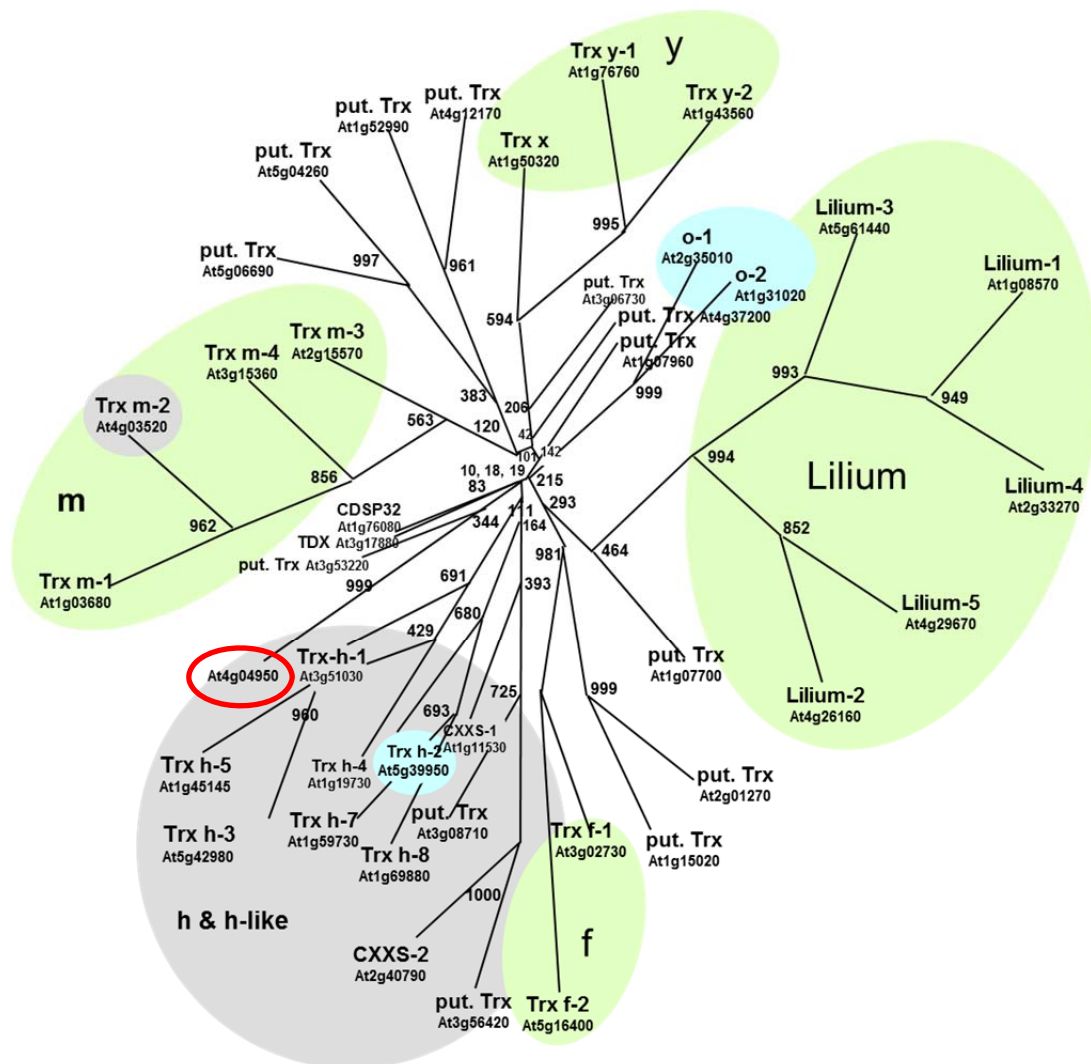


Abb. 2: Stammbaum der Trx aus *A. thaliana* (modifiziert nach HANKE ET AL., 2008). Die unterlegten Farben der Trx-Gruppen stehen für die anhand von Transitpeptiden vorhergesagte oder nachgewiesene Lokalisation der beinhaltenden Trx. Dabei symbolisiert grün eine chloroplastidäre, grau eine zytosolische und blau eine mitochondriale Lokalisation der beinhaltenden Trx. Das in dieser Arbeit untersuchte AtGrxS17 kann aufgrund seiner Trx-Domäne auch den zytosolischen Trx zugeordnet werden (roter Kreis).

oder der Initiierung der Transkription beteiligt. Andere übernehmen Aufgaben in der Signaltransduktion oder haben Chaperon-Funktion (YAMAZAKI ET AL., 2004; GELHAYE ET AL., 2004). Das in dieser Arbeit näher untersuchte AtGRXS17 kann aufgrund seiner Trx-Domäne (vgl. 1.1.4.1) dieser Klasse der zytosolischen Trx zugeordnet werden (Abb. 2)(MEYER ET AL., 2006). Eine Zusammenstellung aller Trx ist im Anhang in der Tabelle 36 aufgelistet.

1.1.1.2 Grx

Die Grx teilen sich in fünf Subgruppen auf (SG I-V; Abb. 3), die sich nach der Aminosäureabfolge ihrer aktiven Zentren gruppieren. Anders als bei den Trx sind nicht alle Subgruppen in allen photosynthetisch aktiven Organismen zu finden. Den Grx werden auch Grx-Fusions-Proteine zugerechnet, die zusätzlich zu einer Grx-Domäne andere Domänen beinhalten. Die Verteilung auf die Kompartimente innerhalb einer Subgruppe kann für die verschiedenen Mitglieder unterschiedlich sein (COUTURIER *ET AL.*, 2009; MEYER *ET AL.*, 2012).

Die Subgruppe I der Grx mit dem Aminosäuresequenzmotiv Cxx[S/C] im aktiven Zentrum umfasst sowohl plastidäre als auch zytosolische Proteine. Einige der Vertreter dieser Gruppe haben sowohl Oxidoreduktase-Aktivität und/oder sind in der Lage andere Proteine zu deglutathionylieren und/oder können selber glutathionyliert werden. Auch konnten für verschiedene SG I-Grx Wechselwirkungen mit Trx bei der Weitergabe von Elektronen belegt werden (GELHAYE *ET AL.*, 2003; MICHELET *ET AL.*, 2006). Alle Vertreter der Subgruppen I bilden Dimere, jedoch ist noch nicht geklärt, ob dieser Zustand über ein [2Fe-2S]-Cluster erreicht wird. Vertreter der SG I sind an verschiedenen metabolischen Prozessen zur Assimilation von Stickstoff, Schwefel und Kohlenstoff als auch bei Differenzierungsprozessen in Pollen und Embryo beteiligt (MEYER *ET AL.*, 2012).

Grx der Subgruppe II sind durch das Aminosäuresequenzmotiv CGFS ausgezeichnet. Zu dieser Gruppe gehört das in dieser Arbeit näher untersuchte zytosolische, aus mehreren Domänen aufgebaute AtGRXS17 (vgl. 1.1.4.2.) Die anderen drei Vertreter, die jeweils aus einer Grx-Domäne bestehen, sind entweder in den Chloroplasten oder in den Mitochondrien lokalisiert. Für diese drei wurde eine Beteiligung an der Verteilung von [2Fe-2S]-Cluster im Hefe-Komplementations-System nachgewiesen, während dieser Nachweis für das AtGRXS17 nur für dessen vereinzelte Grx-Domänen (Grx-HD) getestet wurde (BANDYOPADHYA *ET AL.*, 2008). Weiter werden Beteiligungen dieser Grx an antioxidativen Systemen angenommen, die die Redox-Homöostase im Gleichgewicht halten (CHENG *ET AL.*, 2006).

Mit 21 Vertretern bilden die ROXY-Grx (Subgruppe III; CCM[C/S]) die größte Gruppe der Grx in *A. thaliana*. Die ROXY-Grx sind nur in Landpflanzen zu finden. Die Anzahl der im Genom vorhandenen ROXY wächst in den Organismen mit deren evolutiver Stufe an (ZIEMANN *ET AL.*, 2009). Die Lokalisation der ROXY wird im Zytosol vermutet und konnte z.T.

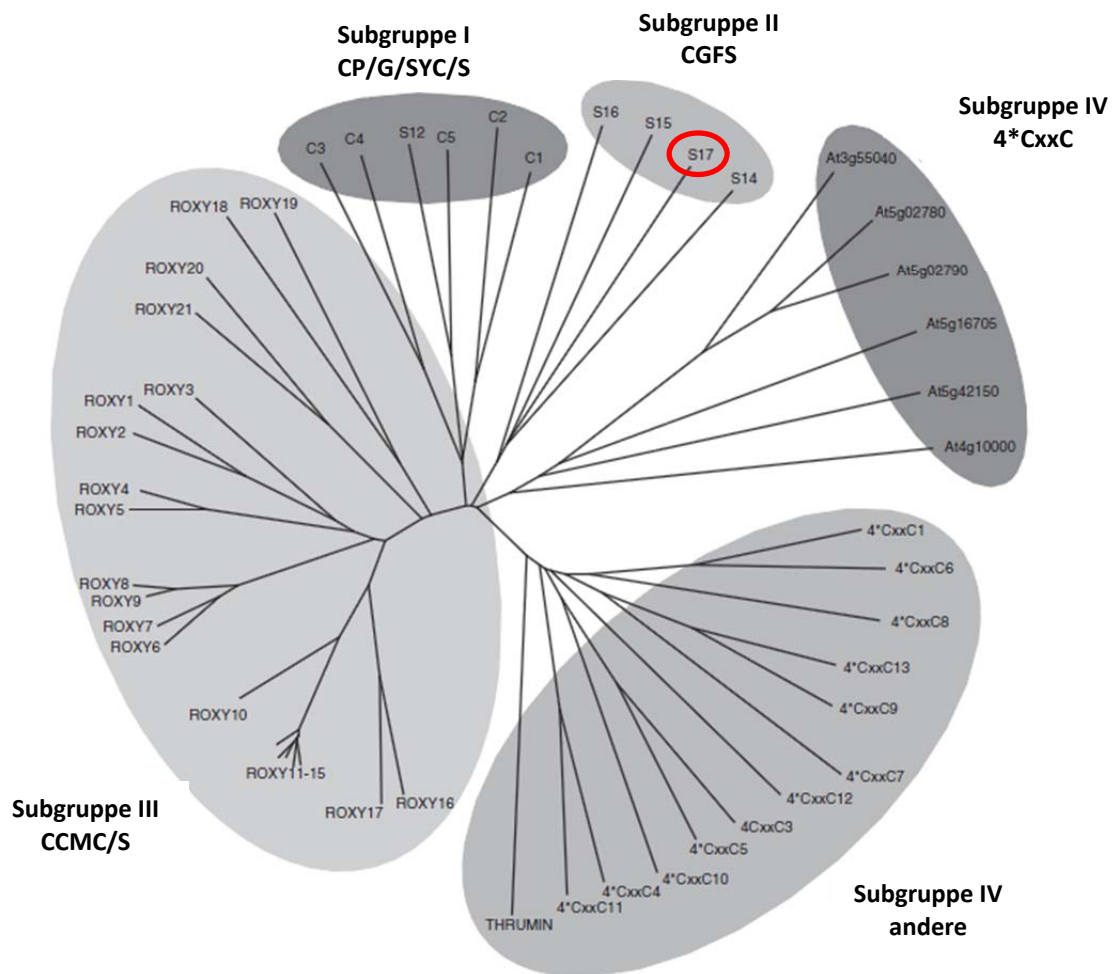


Abb. 3: Stammbaum der Grx aus *A. thaliana*. Die Grx aus *A. thaliana* teilen sich anhand ihrer Ähnlichkeit zueinander in fünf Subgruppen auf. Das in dieser Arbeit näher untersuchte AtGrxS17 gruppiert sich zu der Subgruppe II der Grx aus *A. thaliana* (roter Kreis). Die Agi-Nummern der Grx sind in der Tabelle 36 im Anhang aufgeführt (modifiziert nach MEYER *ET AL.*, 2012).

dort und zusätzlich im Zellkern nachgewiesen werden (LI *ET AL.*, 2009b). Die einzelnen Vertreter der ROXY sind verschieden gut untersucht. Für zwei der ROXY-Grx konnte eine spezifische Beteiligung an der Blütenbildung nachgewiesen werden (XING *ET AL.*, 2005; XING & ZACHGO, 2008; LI *ET AL.*, 2009b). Das Muster der Transkript-Verteilung im Blütenvegetationskegel von *A. thaliana* ähnelt dem Muster der mRNA-Verteilung von spezifischen an der Blütenbildung beteiligten Transkriptionsfaktoren (LI *ET AL.*, 2009b). Die Aminosäuresequenzen der ROXY beinhalten zwei spezielle C-terminale Aminosäuremotive (ALWL/L**LL), durch die eine Interaktion mit TGA-Transkriptionsfaktoren hergestellt werden kann (LI *ET AL.*, 2009; MURMU *ET AL.*, 2010; ZANDER *ET AL.*, 2010; LI *ET AL.*, 2011). Auch eine Beteiligung an der molekularen Antwort auf Pathogene konnte für verschiedene ROXY-Grx mittels „knock out“-Pflanzen gezeigt werden (WANG *ET AL.*, 2009).

Zu den Grx der Subgruppe IV (4*CxxC) ist bisher wenig bekannt. Klassifiziert werden die Grx-SG IV durch eine C-terminale Aminosäuresequenz aus vier repetitiven CxxC-Motiven, die möglicherweise eine Zinkfinger-Struktur bilden können (MEYER *ET AL.*, 2012). Weiter wird eine Beteiligung an der aktinvermittelten Chloroplasten-Bewegung für einen der Mitglieder der Grx-SG IV vermutet (WHIPPO *ET AL.*, 2011).

In der Subgruppe V der Grx befinden sich sechs Vertreter, deren Lokalisation für unterschiedliche Kompartimente (Chloroplast, Mitochondrium und Zytosol) vorausgesagt werden. Sie besitzen entweder ein oder zwei Cysteine im aktiven Zentrum. Vier dieser Grx werden aufgrund von bioinformatischen Vorhersagen auch den Glutathion-S-Transferasen zugeordnet (DIXON *ET AL.*, 2009; MEYER *ET AL.*, 2012).

Eine Zusammenstellung aller Vertreter der Trx und Grx aus *A. thaliana* mit den entsprechenden Agi-Nummern, Trivialnamen sowie vermuteter zellulärer Lokalisation befindet sich im Anhang dieser Arbeit (vgl. Tabelle 37).

1.1.2 Reaktionsmechanismen der Trx & Grx

Im reduzierten Zustand sind sowohl Grx als auch Trx effektive und spezifische Reduktionsmittel. Die beiden für den Reduktionsmechanismus verantwortlichen katalytisch aktiven Cysteine der Trx/Grx befinden sich im aktiven Zentrum am Anfang der ersten α -Helix (HOLMGREN, 1989). Die Reduktion der Disulfidbrücken von Zielenzymen der Trx/Grx kann je nach Fall unterschiedliche Funktionen haben. Zum einem werden Elektronen übertragen, um den Interaktionspartnern Reduktionskraft zu verleihen und so eine Redox-Kaskade auszulösen (FOYER & NOCTOR, 2009). Zum anderen werden Änderungen in der Konformation der Interaktionspartner hervorgerufen, die deren katalytische Aktivität regulieren. Der klassische Dithiol-Reduktionsmechanismus ist für bereits reduzierte Trx und Grx gleich (Abb. 4) (ROUHIER *ET AL.*, 2008). Das regulatorisch wirkende aktive Zentrum mit dem CxxC-Motiv kann zwei Redox-Zustände einnehmen. Das N-terminale Cystein dieser Redoxine liegt im reduzierten Zustand zugänglich an der Außenseite des Proteins (EKLUND *ET AL.*, 1991), sodass es mit einem Zielenzym in Wechselwirkung treten kann. Die Zielenzymerkennung wird bei dieser Reaktion durch die Struktur, die Ladungsverteilung und hydrophobe Bereiche der Oberfläche der Interaktionspartner vermittelt (SCHÜRMAN & JACQUOT, 2000). Nach einer erfolgreichen Erkennung reduziert das exponierte N-terminale Cystein des $\text{Trx}_{\text{red}}/\text{Grx}_{\text{red}}$ ein Cystein des

Zielproteins und es kommt zur Bildung eines gemischten Disulfids. In diesem Übergangszustand hat das C-terminale Cystein der Redoxine Kontakt zum zweiten Cystein des Zielproteins und reduziert dieses. Das Trx/ Grx bleibt oxidiert zurück und steht für eine erneute Reduzierung zur Verfügung (Abb. 4). Dieser Mechanismus ist für Trx/Grx mit nur einem Cystein im aktiven Zentrum nicht möglich (CxxS-Motiv). Sieben der Monothiol-Grx aus *A. thaliana* haben ein weiteres 50-54 Aminosäuren vom aktiven Zentrum entfernt liegendes C-terminales Cystein, welches in die AS-Konsensus-Sequenz [I/V/F]G[G/A/S/T]C eingebettet ist. Für das aus *S. cerevisiae* stammende ScGRX 5 wurde *in vitro* gezeigt, dass dieses Cystein mit diesem Monothiol-Cystein im aktiven Zentrum den Dithiol-Mechanismus vollziehen kann. Das C-terminal liegende Cystein hat durch die tertiäre Faltungsstruktur höchstwahrscheinlich Kontakt zum aktiven Zentrum (TAMARIT ET AL., 2003; ROUHIER ET AL., 2004). Die Monothiol-Grx, die kein zweites Cystein besitzen, können vermutlich [2Fe-2S]-Cluster binden (vgl. 1.1.3) oder sind auf die Deglutathionylierung von Zielproteinen beschränkt. Proteine werden glutathionyliert, wenn es verstärkt zur Bildung von ROS oder RNS kommt. Durch Radikale kommt es zur Schädigung von Makromolekülen durch Oxidation des Schwefels der Cysteine. Während die bei diesem Prozess gebildete Sulfensäure (SOH) noch reversibel ist, sind die höheren Oxidationsstufen der Cysteine, Sulfin- (SO₂H) oder Sulfonsäuren (SO₃H), irreversibel und führen zum Verlust der biologischen Aktivität der betroffenen Proteine (GIUSTARINI ET AL., 2005). Die Glutathionylierung von Proteinen ist ein Schutzmechanismus gegen diese Autooxidation durch Radikale. GSH kann unter oxidierenden Bedingungen direkt mit Thiolgruppen von Proteinen reagieren und lagert sich an diese an (HUDEMANN ET AL., 2008). Auf diese Weise kommt es nur zu einer kurzzeitigen Funktionsunfähigkeit des Proteins (GIUSTARINI ET AL., 2005). Die Deglutathionylierung von Proteinen durch reduziertes Grx wird als Monothiol-Mechanismus bezeichnet und ist sowohl für Mono- als auch für Dithiol-Grx möglich (PAN & BARDWELL, 2006; STARKE ET AL., 2003). Unterschiede ergeben sich in den Regenerationsmechanismen zu Re-Reduktion der Redoxine. Thioredoxine werden Kompartiment-spezifisch entweder durch NADPH-Thioredoxin-Reduktase (NTR) oder Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (FTR) reduziert. In photosynthetisch aktiven Kompartimenten sind klassische Trx ein Teil des Ferredoxin-Thioredoxin-Systems. Bei Belichtung von Photosystem I werden Elektronen direkt auf ein Ferredoxin (Fd) übertragen, welches nacheinander zweimal ein Elektron an FTR weiterleitet. Die FTR_{red} reduziert im Folgenden die Disulfidbrücke des

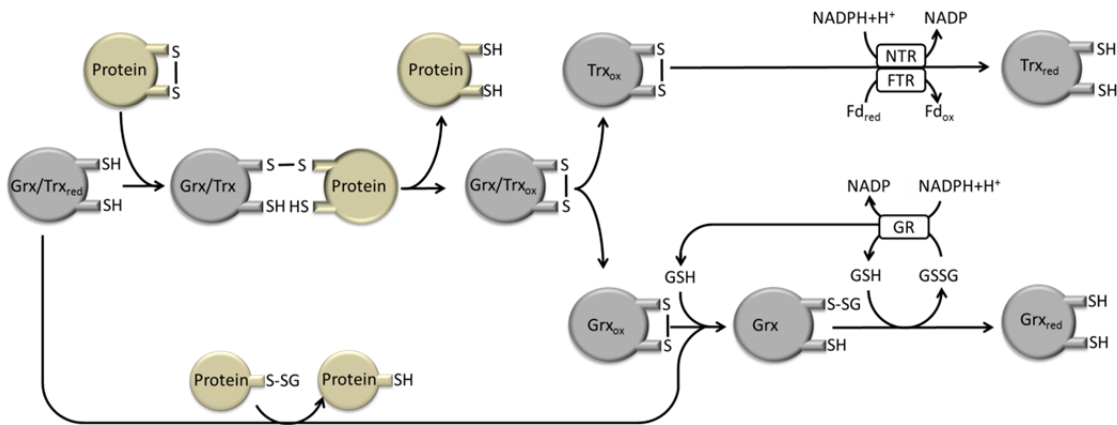


Abb. 4: Mögliche Reaktionsmechanismen für Grx/Trx. Abgebildet sind sowohl der Dithiol- als auch der Monothiol-Mechanismus der Trx und Grx. Die beiden Redoxine unterscheiden sich in der Regeneration. Die Trx werden je nach Kompartiment von der NTR oder FTR regeneriert, während für die Grx die GR via GSH die Elektronen liefert. Zusätzlich können die Grx glutathionylierte Proteine regenerieren.

entsprechenden Trx_{ox}, welches nun als Trx_{red} für weitere Reaktionen zur Verfügung steht. In nicht photosynthetisch aktiven Kompartimenten werden klassische Trx_{ox} von der NTR reduziert. Als Elektronendonator dient hier NADPH, das seine Elektronen aus dem oxidativen Pentosephosphatweg (OPP) bezieht (MEYER *ET AL.*, 2012).

Ein alternativer Weg, um Thioredoxine im Zytosol zu reduzieren, wurde von GELHAYE *ET AL.* (2003) postuliert. Dieser Weg verknüpft das GR-System mit dem NTR-System. Demnach können hier durch GR reduzierte Grx ihre Reduktionskraft an Trx weitergeben. Weiter wird in dieser Studie vermutet, dass möglicherweise andere Trx, die über NTR reduziert wurden, Grx reduzieren können.

Die ersten in Pflanzen identifizierten Proteine, die mittels Trx durch lichtabhängige Redox-Modulation reguliert werden, waren verschiedene chloroplastidäre Calvin-Zyklus-Enzyme, die GLYCERINALDEHYD-3-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE (GAPDH), FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE (FBPase), PHOSPHORIBULOKINASE (PRK), SEDOHEPTULOSE-BISPHOSPHATASE (SBPase), ATP-Synthase und die chloroplastidäre NADP-abhängige MALATDEHYDROGENASE (NADP-MDH) (BUCHANAN, 1980; SCHEIBE, 1991; HISABORI *ET AL.*, 2007). Heute werden aufgrund von Interaktionsstudien ca. 550, zumeist noch nicht verifizierte, Proteine für diesen Regulationsmechanismus vermutet (MONTRICHARD *ET AL.*, 2009). Diese Interaktionen umfassen Proteine, die an unterschiedlichen Prozessen, wie dem Kohlenstoff-Stoffwechsel, der Stickstoffassimilation, Translation, Proteinfaltung, Aminosäuresynthese und der

Fettsäuresynthese, beteiligt sind. Es kann aufgrund der Vielfalt an Proteinen davon ausgegangen werden, dass regulatorische Redox-Prozesse einen weit verbreiteten Mechanismus in der Proteinregulation darstellen.

1.1.3 [2Fe-2S]-Cluster-bindende Grx

Proteine, die [Fe-S]-Cluster als Co-Faktoren nutzen, sind in allen bekannten Lebensformen weit verbreitet (FONTECAVE, 2006). Die Fähigkeit des Eisens, Elektronen reversibel aufzunehmen, ermöglicht den [Fe-S]-Cluster-Proteinen eine Beteiligung an einer Vielzahl von biologischen Prozessen.

[Fe-S]-Cluster-Proteine kommen in Plastiden, Mitochondrien, Zytosol und im Zellkern vor und erfüllen dort eine Vielzahl von Aufgaben, die von physiologischer Bedeutung sind bzw. an der Differenzierung von Zellen beteiligt sind (BEINERT, 2010; BALK *ET AL.*, 2011).

Neben der Weitergabe von Elektronen in den energiebereitstellenden

Prozessen der Chloroplasten

und Mitochondrien sind sie an verschiedenen auf Reduktion und Oxidation basierenden katalytischen Prozessen sowie an der Assimilation von Stickstoff und Schwefel beteiligt (BALK *ET AL.*, 2011). Die am häufigsten vorkommenden Eisen-Schwefel-Cluster sind die [2Fe-2S]- und die [4Fe-4S]-Cluster. Neben diesen Formen gibt es eine Reihe von Mischformen, die bis zu [8Fe-8S]-Cluster reichen (BEINERT, 2010). Eisen-Schwefel-Cluster können spontan entstehen, jedoch müssten sie dafür in zytotoxischen Konzentrationen vorliegen. Die Synthese von [2Fe-2S]-Clustern ist ein komplexer Vorgang. In Eukaryonten werden die [2Fe-2S]-Cluster von einer aufwändigen Maschinerie synthetisiert und mittels Transfer-Proteinen auf die Zielproteine übertragen. Pflanzen können auf drei unterschiedliche Arten [2Fe-2S]-Cluster generieren. In den Plastiden über den *SUF (sulfur*

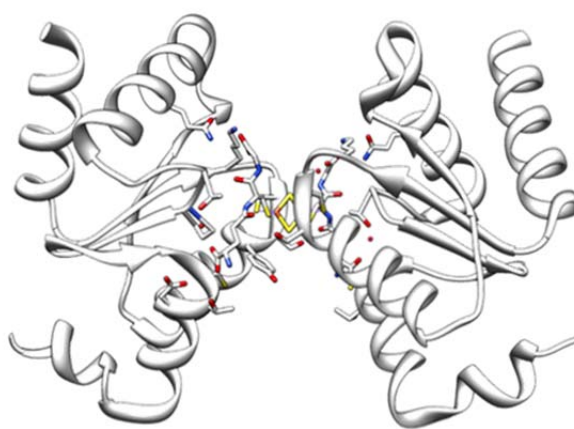


Abb. 5: [2Fe-2S]-Cluster-Bindung zwischen zwei Grx-Proteinen. Die [2Fe-2S]-Cluster der Grx werden durch je ein Cystein der Grx und durch die Cysteine von zwei GSH-Molekülen stabilisiert.

mobilization), im Zytosol über den CIA (*cytosolic iron-sulfur cluster assembly*) und in den Mitochondrien über den ISC (*iron-sulfur cluster*) Weg (BALK *ET AL.*, 2011).

Im Jahr 2002 wurde ein mitochondriales Grx aus *S. cerevisiae* mit [2Fe-2S]-Clustern in Verbindung gebracht (RODRIGUEZ-MANZANEQUE *ET AL.*, 2002). Das Grx 5 ist maßgeblich an der [2Fe-2S]-Cluster-Verteilung beteiligt. Grx 5-Null-Mutanten konnten keine [2Fe-2S]-Cluster an [2Fe-2S]-Cluster-beihaltende Enzyme liefern. Weiter kommt es bei dieser Mutante in den Mitochondrien zu einer Anhäufung von [2Fe-2S]-Clustern, die zu einer übermäßigen Bildung von ROS bei aerobem Wachstum in den Zellen führen. Aus diesen Gründen kann die GRX 5-Null-Mutante unter aeroben Bedingungen nicht wachsen (RODRIGUEZ-MANZANEQUE *ET AL.*, 2002).

Allen [2Fe-2S]-Cluster-Grx ist gemein, dass sie bei der [2Fe-2S]-Cluster-Bindung Dimere bilden. Koordiniert werden die [2Fe-2S]-Cluster über je ein Cystein im aktiven Zentrum der Grx und den Cysteinen von zwei GSH-Molekülen (Abb. 5). Die [2Fe-2S]-Cluster-Grx werden von nicht phylogenetisch zusammenhängenden Gruppen gebildet und können verschiedene Funktionen haben (RIONDET *ET AL.*, 2011). Bisher sind drei unterschiedliche Funktionen für [2Fe-2S]-Cluster-bindende Grx bekannt (Abb. 6).

Die erste Gruppe wird in ihrer Aktivität durch die Bindung des [2Fe-2S]-Clusters reguliert. Diese Grx besitzen in ihrer monomeren Form Oxidoreduktase-Aktivität. Durch die Bindung von [2Fe-2S]-Clustern sind die aktiven Zentren der Grx blockiert und die Grx inaktiv. Ändert sich der Redoxzustand der Zellen von reduziert zu oxidiert, verändert sich der GSH-Spiegel zu GSSG. Da nun weniger GSH für die [2Fe-2S]-Cluster-Bindung zur Verfügung steht, verlieren diese Grx ihre [2Fe-2S]-Cluster und werden so aktiviert (LILLIG *ET AL.*, 2005).

Die zweite Gruppe der [2Fe-2S]-Cluster-Grx können an Transkriptionsfaktoren binden. Diese Grx modulieren in Abhängigkeit von gebundenen [2Fe-2S]-Clustern die Bindeeigenschaften der interagierenden Transkriptionsfaktoren und nehmen so Einfluss auf die Transkription (VACHON *ET AL.*, 2012). Die dritte Gruppe der [2Fe-2S]-Cluster-Grx ist an der Verteilung von [2Fe-2S]-Cluster beteiligt. Diese Grx bilden [2Fe-2S]-Cluster vermittelte Dimere. Bei der Übertragung der [2Fe-2S]-Cluster auf ihre Zielproteine bilden sich gemischte Dimere mit den Zielproteinen. Beim Trennen dieser Verbindung werden die [2Fe-2S]-Cluster vollständig übertragen (LI *ET AL.*, 2012; WANG *ET AL.*, 2012).

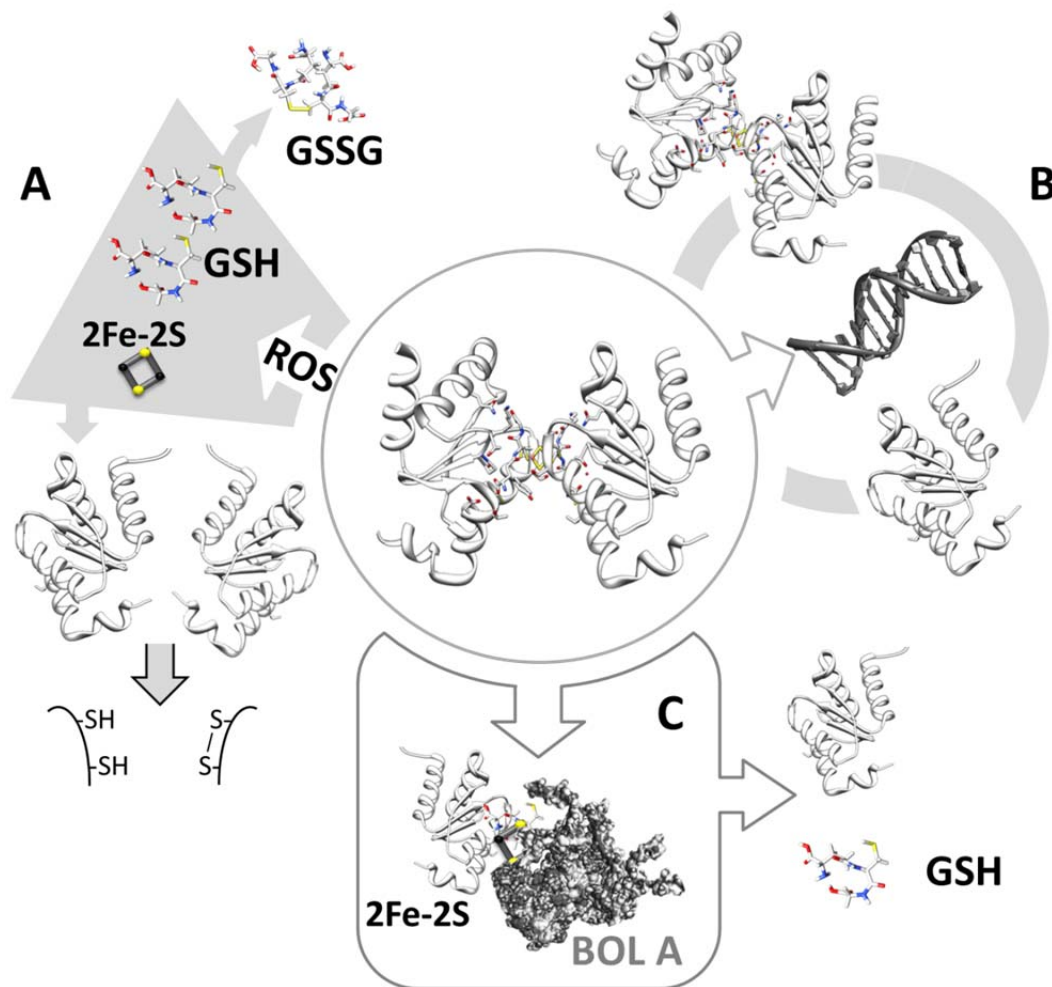


Abb. 6: Mögliche Funktionen von [2Fe-2S]-Cluster-bindenden Grx. In A) ist die Möglichkeit zur Aktivierung der Oxidoreduktase-Funktion der [2Fe-2S]-Cluster-bindenden Grx unter oxidierenden Bedingungen durch Verlust des [2Fe-2S]-Clusters abgebildet. Die Funktion zur Beeinflussung der Transkription in Abhängigkeit der gebundenen [2Fe-2S]-Cluster ist in B) dargestellt. Durch eine [2Fe-2S]-Cluster-abhängige Interaktion der Grx mit Transkriptionsfaktoren wird die Transkription bestimmter Gene beeinflusst. In C) ist die Verteilung von [2Fe-2S]-Cluster durch Bildung von gemischten Dimeren mit Zielproteinen, wie bspw. BOL A, dargestellt.

1.1.4 Trx-Grx-Fusionsproteine

Bei der Genfusion von Trx und Grx werden die vorher eigenständigen Gene zu Homologie-Domänen (Trx-HD/ Grx-HD) (ISA KOV *ET AL.*, 2000). Die Kombination aus einer N-terminalen Trx-HD und einer Grx-HD ist in prokaryotischen und einzelligen eukaryotischen Organismen weit verbreitet. Die Kombination einer Trx-HD mit zwei Grx-HD ist typisch für mehrzellige Eukaryoten, während die Kombination aus einer Trx-HD und drei Grx-HD als charakteristisch für höhere Pflanzen angenommen wird (ALVES *ET AL.*, 2007; COUTURIER *ET AL.*, 2008).

1.1.4.1 Trx-Grx-Fusionsproteine aus nicht pflanzlichen Organismen

Als GRX3 werden die nicht pflanzlichen Fusionsproteine aus Trx- und Grx-Domänen bezeichnet. Das humane Trx-Grx-Fusionsprotein ist in der Literatur unter verschiedenen Namen zu finden. Die Bezeichnung GRX3 ist der am häufigsten verwendete Name. Das *HUGO Nomenclature Committee* (HGNC), welches für die Bezeichnung von Proteinen zuständig ist, hat sich zurzeit offiziell auf den Namen GLXR3 geeinigt. Weitere bisher verwendete Namen sind: HGNC ID 15987, bA500G10.4, GLRX4, Glutaredoxin 4, GRX3, GRX4, HUSSY-22, PROTEINKINASE C THETA (PKC- θ)-INTERACTING COUSIN OF THIOREDOXIN (PICOT) (KESELMAN *ET AL.*, 2011). Das humane GRX3 ist wie alle nicht pflanzlichen, eukaryotischen Trx-Grx-Fusionsproteine mit zwei C-terminalen Grx-HD ausgestattet (ALVES *ET AL.*, 2009; COUTURIER *ET AL.*, 2009). Für die GRX3 aus Maus und Mensch konnten eine Reihe von Eigenschaften und Funktionen identifiziert werden. Hauptsächlich werden Funktionen in der Signaltransduktion durch die Interaktionen der GRX3 mit Kinasen und Transkriptionsfaktoren vermutet. Weiter konnte ein Zusammenhang mit einer spezifischen Phosphorylierung von GRX3 in Zellkultur nachgewiesen werden, nachdem diese mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden (BABICHEV *ET AL.*, 2001). Aus diesem Grund wird vermutet, dass GRX3 an einer zellulären Antwort auf die durch ROS generierten Stresssignale sein könnte (WITTE *ET AL.*, 2000; BABICHEV *ET AL.*, 2001). Ein Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen des Herzens in frühen embryonalen Stadien konnte experimentell belegt werden. Der Einfluss auf die Apoptose durch eine Interaktion mit Anamorsin scheint für das GRX3 möglich zu sein (CHENG *ET AL.*, 2011B; SAITO *ET AL.*, 2011; JOENG *ET AL.*, 2008; SAMAREL *ET AL.*, 2008; CHA, *ET AL.*, 2008; HOFFMANN *ET AL.*, 2011; KESELMAN *ET AL.*, 2011). Auch eine Funktion bei der Synthese und der Verteilung von Eisen-Schwefel-Clustern ([2Fe-2S]-Cluster) konnte in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden (HAUNHORST *ET AL.*, 2010; LI *ET AL.*, 2012). Dies wird in dieser Arbeit im Abschnitt 1.1.3 näher betrachtet.

1.1.4.2 Struktur und Funktion des AtGRXS17-Proteins

In dieser Arbeit galt das hauptsächliche Interesse dem pflanzlichen GRXS17 aus *A. thaliana* (AtGRXS17). Dieses Grx ist, wie alle pflanzlichen GRXS17, ein Fusionsprotein, das aus einer N-terminalen Monothiol-Trx-HD und drei C-terminalen Monothiol-Grx-HD besteht (Abb. 7). Aufgrund dieser Zusammensetzung aus Trx-HD und Grx-HD kann das AtGRXS17

diesen beiden Proteinfamilien (Trx & Grx) zugeordnet werden (vgl. 1.1.1.). Die Trx-HD des AtGRXS17 kann in *A. thaliana* einer homologen Gensequenz (At4g32580) zugeordnet werden, für die bisher jedoch kein Transkript identifiziert werden konnte (www.arabidopsis.org) und deshalb als Pseudogen angenommen wird. Bei den Grx aus *A. thaliana* wurde das AtGRXS17 den der Grx der Subgruppe II (CGFS) zugeordnet (vgl. 1.1.1.2) und erhielt seinen Namen aufgrund der Vielzahl an verschiedenen Monothiol-Grx in *A. thaliana* (ROUHIER *ET AL.*, 2004). Mit einer errechneten Größe von 54 kDa ist es um ein Vielfaches größer als die typischen Vertreter der Trx und Grx (10-15 kDa). Für das AtGRXS17 aus *A. thaliana* sind bisher wenige Funktionen beschrieben. In einer Studie von CHENG *ET AL.* (2011a) konnte für das AtGRXS17-Protein ein Zusammenhang mit der temperaturabhängigen post-embryonalen Entwicklung von *A. thaliana*-Pflanzen hergestellt werden. AtGRXS17-KO-Pflanzen, die in der Studie von CHENG *ET AL.* (2011a) erhöhten Temperaturen ausgesetzt worden waren, ähneln den *A. thaliana*-PIN1-*knock-out*-Pflanzen. Das PIN1-Protein ist ein Auxin-Transporter, der für die korrekte Verteilung des Phytohormons zuständig ist und so die Position der zu bildenden Blüten bestimmt (REINHARDT *ET AL.*, 2003). Die ermittelten Auxin-Mengen, die für die wärmebehandelten AtGRXS17-KO-Pflanzen ermittelt wurden, entsprachen denen des WT, sodass ein Zusammenhang mit der Auxin-Verteilung möglich erscheint (CHENG *ET AL.*, 2011a). In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt

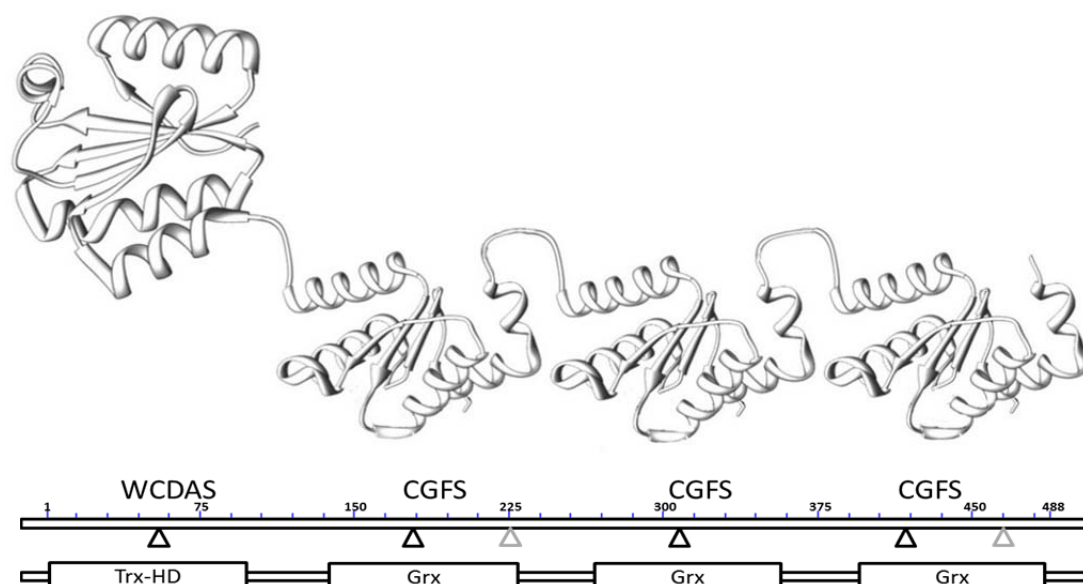


Abb. 7: Aufbau und hypothetische Struktur des AtGRXS17. Das AtGRXS17 besteht aus einer N-terminalen Trx-Homologie-Domäne (Grx-HD I) und drei C-terminalen Monothiol-Grx-Homologie-Domänen (Grx-HDI-III). Die abgebildete Struktur des AtGrxS17 wurde aus den pdb-Dateien 1XFL (PETTERSON *ET AL.*, 2005) und 3L4N (LUO *ET AL.*, 2010) generiert, ist jedoch experimentell nicht abgesichert.

werden, dass das AtGRXS17-Protein bei Überexpression in Tomaten die Toleranz gegenüber Hitze verstärkt. In den Blättern dieser Pflanzen konnte eine geringere Bildung von H_2O_2 im Vergleich mit denen von WT-Tomaten-Pflanzen detektiert werden. Damit bestehen Hinweise auf die Funktion von AtGRXS17 bei der Beseitigung bzw. Verhinderung von ROS, die bei übermäßiger Hitze entstehen können (WU *ET AL.*, 2012).

1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, weitere Erkenntnisse über das AtGRXS17-Protein aus *A. thaliana* zu gewinnen. GRXS17 ist ubiquitär mit leichten Variation in der Domänen-Anzahl in allen Organismenreichen zu finden. Die ungewöhnliche Kombination des AtGRXS17 aus einer Trx-HD und drei Grx-HD in Pflanzen und deren Konserviertheit lassen auf eine ursprüngliche und basale Funktion schließen.

Es sollte daher mittels phylogenetischer Analysen überprüft werden, ob GRXS17 in höheren Pflanzen hinsichtlich Vorkommen, Bildung von Unterfamilien und Domänenstruktur so konserviert ist, wie in der Literatur angenommen wird (ALVES *ET AL.*, 2009; COUTURIER *ET AL.*, 2009).

Mittels Transkriptmengen-Analysen in *A. thaliana* sollten Gewebe identifiziert werden, in denen das *AtGRXS17* vermehrt transkribiert wird. Daraus sollten Funktionen des AtGRXS17 abgeleitet werden, um weitere spezielle Untersuchungen anschließen zu können.

Ein weiterer Aspekt war die biochemische Charakterisierung des AtGRXS17-Proteins. Dazu sollte zunächst rekombinantes Protein hergestellt und eine mögliche Oxidoreduktase-Aktivität untersucht werden. Es ist bekannt, dass sich die vier anderen Vertreter der Grx-SG II (CGFS) zu Dimeren zusammenlagern und [2Fe-2S]-Cluster inkorporieren. Auch für die einzelnen Grx-HD des AtGRXS17 konnte eine [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung gezeigt werden. Es sollte daher geklärt werden, ob das komplette AtGRXS17 auch zur [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung fähig ist und so zu dieser Gruppe der [2Fe-2S]-Cluster-Grx gehört. Weiter sollte analysiert werden, ob das AtGRXS17 höhermolekulare Strukturen bilden kann oder ob auch die monomere Form des AtGRXS17 aufgrund der drei Grx-HD fähig ist, [2Fe-2S]-Cluster zu binden. Um diese Fragestellungen zu überprüfen, sollten Cystein-Serin-Austausch-Mutanten des AtGRXS17-Proteins erstellt werden. Die Cysteine der aktiven Zentren der AtGRXS17-Proteine sind bei einer [2Fe-2S]-Cluster-Bindung maßgeblich an der Bindung beteiligt, während Serin keine [2Fe-2S]-Cluster-Bindung herstellen kann. Zusätzlich wäre es auf diesem Wege möglich, die Orientierung einer möglichen Dimerisierung von AtGRXS17 zu überprüfen.

Durch den Einsatz eines *AtGRXS17-pulldown-assays* sollten aus *A. thaliana*-Protein-Rohextrakt mögliche Interaktionspartner von AtGRXS17 eluiert und mittels

anschließender massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden. Diese Versuche sollten dazu dienen, mögliche Beteiligungen des AtGRXS17-Proteins an Stoffwechselwegen oder Signaltransduktionskaskaden zu identifizieren. Anschließend sollten einige der auf diese Weise identifizierten möglichen Interaktionspartner von AtGRXS17 mittels weiterer Techniken verifiziert werden.

Durch die Verwendung von T-DNA-Insertions-Pflanzen im Gen des *AtGRXS17* sollten physiologische und anatomische Auswirkungen, die durch das Fehlen des AtGRXS17-Proteins verursacht werden, identifiziert werden. Dazu sollte zunächst geklärt werden, ob diese Pflanzen noch Transkript des *AtGRXS17*-Gens bilden können. Falls dies nicht der Fall ist, sollten diese KO-Pflanzen anschließend im Vergleich mit WT-Pflanzen unter Variationen von Lichtperiode und -intensität kultiviert werden. Bei möglichen Veränderungen der KO-Pflanzen gegenüber den WT-Pflanzen sollten die ursächlichen Bedingungen identifiziert und in einen physiologischen Kontext gestellt werden.

Die subzelluläre Lokalisation innerhalb von pflanzlichen Zellen sollte mittels verschiedener fluoreszenzmikroskopischer Analysen an isolierten Mesophyll-Protoplasten untersucht werden, um diese mit bioinformatisch vorhergesagten Lokalisationen zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Eine Liste mit den verwendeten Geräten, Chemikalien, Kit-Systemen und deren Bezugsquellen befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

2.1.1 Verwendete Pflanzen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Wildtyp-Pflanzen (WT) handelte es sich um *Arabidopsis thaliana* L. (HEYNH.) (*A. thaliana*) des Ökotyps *Columbia* (Col-0). Die verwendeten T-DNA-Insertions-Mutanten wurden beim *Salk*-Institut in den USA unter dem Namen SALK_021301.56.00.X bestellt (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Diese *AtGRXS17-knockout*-Pflanzen (KO-Pflanzen) sind wie die verwendeten Wildtyp-Pflanzen (WT) vom Ökotyps Col-0. Diese KO-Pflanzen wurden vor der ersten Verwendung in Sterilkultur (vgl. 2.2.2) auf Kanamycin (Endkonz. 50 µg/ml) selektioniert und wie unter 2.3.24 beschrieben auf Homozygotie untersucht.

Mittels einer *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*)-vermittelter Transformation wurde der Vektor pBarA35S, in den zuvor das *cauliflower mosaic virus* (CaMV)-35S-Promotor (35S)::*grxS17*-Konstrukt inseriert wurde, in KO-Pflanzen inseriert und dadurch Komplementationslinien, erstellt. Weiter wurden WT-*A. thaliana*-Pflanzen verwendet, die durch *A. tumefaciens* vermittelte Transformation mit dem Vektor pGPTV-BAR transformiert wurden, in den vorher das *atgrxs17*_{-prom}::*gusB*-Konstrukt (β-Glucuronidase; *AtGRXS17*::GUS-Pflanzen) inseriert worden war.

2.1.2 Bakterienstämme

Es wurden die in Tabelle 2 angegebenen Bakterienstämme verwendet. Zur Vermehrung von Plasmiden diente der *Escherichia coli*-Stamm (*E. coli*) XL1-Blue. Zur Expression von Proteinen wurde der Stamm *E. coli* BL21plysS verwendet. Für die Blüentransformation von *A. thaliana*-Col-0- und *AtGRXS17-KO*-Pflanzen wurde der *A. tumefaciens*-Stamm GV 3101 verwendet.

Tabelle 2 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Merkmale	Referenz
E. coli XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsrdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB, lac ^q ΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, Heidelberg
E. coli BL21 plysS	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB - mB-) λ(DE3)pLysS (cmR)	Novagen, Madison USA
A. tumefaciens (GV3101)	C58C1 rpoB (Rif ^r) [pMP90]	(Koncz & Schell, 1986)

2.1.3 Verwendete Kulturmedien und Selektionsantibiotika

Die zur Anzucht der *E. coli*- und *A. tumefaciens*-Stämme verwendeten Kulturmedien und deren Zusammensetzung sind in Tabelle 3, die der Selektionsantibiotika sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 3 Zusammensetzung der eingesetzten Kulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
YT-Medium	0,8 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,25 % (w/v) NaCl, pH 7,0 mit NaOH
Ψb-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) MgSO ₄ , pH 7,6 mit KOH
YEB-Medium	0,5 % (w/v) Rinderextrakt, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Peptone, 0,5 % Saccharose, 2 mM MgSO ₄ , pH 7,0 mit NaOH

Alle Medien wurden bei 124 °C für 20 min autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medien vor der Sterilisation 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Tabelle 4 Antibiotikakonzentrationen der Selektionsmedien für E. coli und A. tumefaciens

Antibiotikum	Stocklösung	E. coli		A. tumefaciens	
		Endkonzentration im Medium			
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml (in 50% Ethanol)	200 µg/ml	- - -	- - -	- - -
Kanamycin (Kan)	12,5 mg/ml (in H ₂ O)	25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml
Rifampicin (Rif)	20 mg/ml (in Methanol)	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Spectinomycin (Spec)	50 mg/ml (in H ₂ O)	50 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Tetrazyclin (Tet)	5 mg/ml (in 50% Ethanol)	10 µg/ml	10 µg/ml	1-2 µg/ml	1-2 µg/ml

2.1.4 Verwendete Primer

Die *Primer*, die während dieser Arbeit zur Amplifikation oder zur Mutagenese von Gensequenzen zum Einsatz kamen, sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5 Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'→ 3'	Interne Nummer
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	96
SALK_127_RP	ATCGTTTCAAAGGCGGAGCTT	289
SALK_127_LP	TTGCAACCAAACAAGCAACA	335
At4g04950rek <i>Ndel</i> -F	GGGAATTCCATATGAGCGGTACGGTGAAGG	310
pGPTV Seq.S	CGTGTCCGCTTCCTTTA	692
pGPTV Seq.AS	ATCCAGACTGAATGCCACAGG	693
ubq11-F_rt	GCAGATTTTCGTTAAAACC	594
ubq11-R_rt	CCAAAGTTCTGCCGTCC	595
AtGRXS17 GUS-RP	GCTCTAGACTTCGAAGAGGGAGAAGGATC	728
AtGRXS17 GUS-LP	GCTCTAGATAAGCACCACCGTGGTCACTA	729
310C33S_sense At4g04950 GrxS17	CTTCTGGGCTTCTTGAGTGATGCTTCGAAGCA	736
310C33S_AS At4g04950 GrxS17	TGCTTCGAAGCATCACTCCAAGAAGCCCAGAAG	737
310C179S_sense At4g04950 GrxS17	CCTGAAGAGCCTAGGAGTGGGTTTAGCAGGA	738
310C179S_AS At4g04950 GrxS17	TCCTGCTAAACCCACTCCTAGGCTTTCAGG	739
310C309S_sense At4g04950 GrxS17	GACCAGAAGAACC AAAGAGTGGGTTCAAGTGGGAAA	740
310C309S_AS At4g04950 GrxS17	TTTCCCACTGAACCCACTCTTTGGTTCTTCTGGTC	741
310C416S_sense At4g04950 GrxS17	GGTTCACCAGATGAACCGAAAAGCGGATTTAGCT	742
310C416S_AS At4g04950 GrxS17	AGCTAAATCCGCTTTTCGGTTCATCTGGTGAACC	743
pKNABBA_F_EcoRV	ATCGCAGATTTTCGTTAAAACC	744
pKNABBA_R_EcoRV	ATCCCAAAGTTCTGCCGTCC	745
At1g50570_191Sfi_for	GGCCATGGAGGCCCATATGGAATCTCCAC	1002
At1g50570_191Sma_rev	TCCCCCGGGGATCAGAAGAAGGCTCTAC	1003
At3g12480_171Sfi_for	GGCCATGGAGGCCCATATGAGGAAGAAGC	1004
At3g12480_171Sma_rev	TCCCCCGGGGATTAGCCTTCTTCGTCAT	1005
At3g13460_189Sfi_for	GGCCATGGAGGCCCATATGGCTACCGTTG	1006
At3g13460_189Sma_rev	TCCCCCGGGGATTAGCAACCATTGCCA	1007
At4g04950_89Sfi_for	GGCCATGGAGGCCCATATGAGCGGTACGG	1008
At4g04950_89Sma_rev	TCCCCCGGGGATTACTCGGATAGAGTTG	1009
At5g20830_183Sfi_for	GGCCATGGAGGCCCATATGGCAAACGCTG	1010
At5g20830_183Sma_rev	TCCCCCGGGGATCAATCATCTTGTCAA	1011
AT5g26110_Sfi_for	GGCCATGGAGGCCCATATGGATTGTGAGG	1012
AT5g26110_Sma_rev	TCCCCCGGGGATCATCAATCATAGTCC	1013
At5g46570_190 Sfi_for	GGCCATGGAGGCCCATATGGGTTGTTTAC	1014
At5g46570_190Sma_rev	TCCCCCGGGGATTAGCAGCGCCAGCTAT	1015
At5g54050_188Sfi_for	GGCCATGGAGGCCCATATGTCTTCTACTG	1016
At5g54050_188Sma_rev	TCCCCCGGGGATCACCTTGGGCATAAGT	1017
AT4g46570-mut3	GTGTGATATTCAGTTATGGAACCTATTC	1049
AT4g46570-mut3 Rev	GAATAGTTCCATAACTGAATATCACAC	1059
GrxS17-KompleF At4g04950	TCCCCCGGGATGAGCGGTACGGTGAAG	1103
GrxS17-KompleR At4g04950	GCTCTAGATTACTCGGATAGAGTTGC	1104

2.1.5 Plasmide

Die in dieser Arbeit zur Klonierung und Pflanzentransformation eingesetzten Plasmid-Vektoren sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6 Verwendete Plasmide

Plasmid	Relevante Merkmale	Referenz
pGEM-T <i>Easy</i>	Klonierungsvektor, 3015 bp, <i>bla</i> (Amp ^r), <i>lacZ</i> , T7/SP6-Promotor	Promega, Mannheim
pGPTV-bar	binärer Pflanzentransformationsvektor, 13444 bp, <i>nptII</i> (Kan ^r), <i>pAnos</i> , <i>uidA</i> , <i>Pnos</i> , <i>bar</i> , pAg7 Kan ^r	Becker <i>et al.</i> , 1992
pBarA35S	binärer Pflanzentransformationsvektor, 11634 bp, CaMV 35S-Promotor/Terminator, <i>Pnos</i> , <i>bar</i> , <i>lacZ</i> , <i>lacl</i> , Transposon 5, Kan ^r	Prof. Dr. S. Zachgo, Universität Osnabrück
pET16b	Amp ^r , Expressionsvektor der für N-terminalen Histidin- <i>tag</i> kodiert	Novagen
pGFP2	Amp ^R , GFP2-kodierende Sequenz	Prof. Dr. A. v. Schaewen, Universität Münster
pUC-Spine	Amp ^R , yFP-n-term-kodierende Sequenz	J. Kudla, Universität Münster
pUC-Spice	Amp ^R , yFP-c-term-kodierende Sequenz	J. Kudla, Universität Münster
pTK6	AtGRXS17 in pUC-Spyce	T. Kliche. Universität Osnabrück
pAV5	AtGRXS17 in pUC-Spyne	A. Voskors Universität Osnabrück
pJF14	At3g12480 in pUC-Spyne	Janina Franzen, Universität Osnabrück
pNK143	At3g12480 in pUC-Spyce	diese Arbeit
pJF12	At1g50570 in pUC-Spyne	Janina Franzen, Universität Osnabrück
pNK139	At1g50570 in pUC-Spyce	diese Arbeit
pNK7	AtGRXS17 (At4g04950) in pET16b	diese Arbeit
pNK14	AtGRXS17 xC1 (At4g04950 C35S) in pET16b	diese Arbeit
pNK15	AtGRXS17 xC2 (At4g04950 C179S) in pET16b	diese Arbeit
pNK16	AtGrxS17 xC3 (At4g04950 C309S) in pET16b	diese Arbeit
pNK17	AtGrxS17 xC4 (At4g04950 C416S) in pET16b	diese Arbeit
pMS16	AtGRXS17 C1 (At4g04950 C179S,C309S, C416S) in pET16b	Merle Leffers, Universität Osnabrück
pNK 152	AtGRXS17-pBar35S	diese Arbeit
pTK8	At3g12480 in pGFP2	T. Kliche. Universität Osnabrück
pTK9	At1g50570 in pGFP2	T. Kliche. Universität Osnabrück

2.2 Kultivierung der Pflanzen

2.2.1 Anzucht von *A. thaliana* auf Erde

Zirka 100 *A. thaliana*-Samen wurden in Töpfen (Ø 8 cm) auf Erde (36,4 % Bims, 36,4 % Kompost, 18,2 % Torf, 9,0 % Sand und 1,5 g/l Polycrescal) ausgesät. Zur Synchronisation der Keimung wurden die Aussaaten zwei Tage bei 4 °C stratifiziert. Nach zwei Wochen

wurden die Keimlinge einzeln in Töpfe (\varnothing 8 cm) pikiert. Die Pflanzen wurden, je nach Versuch, unter verschiedenen Bedingungen hinsichtlich Tageslänge, Temperatur, Lichtintensität und Lichtqualität angezogen. Für die Beleuchtung wurden in den Klimakammern Hochdruck-Metallhalogendampflampen des Typs Son-T Agro (400 W; Philips, Eindhoven, Niederlande) eingesetzt.

Die verschiedenen eingesetzten Bedingungen sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Der Zeitraum, in dem die Pflanzen diesen Versuchsbedingungen ausgesetzt wurden sowie zusätzliche Behandlungen wurden jeweils im Ergebnisteil angegeben.

Tabelle 7 Anzuchtbedingungen in den Klimakammern

Versuchsbezeichnung	Kurz-Tag KT	KT	Lang-Tag LT	LT	LT
	Normallicht NL	Starklicht SL	NL	SL	Hochlicht HL
Klimakammer (KK)	KK I	KK I	KK II	KK II	KK III
Lichtperiode	8 h	8 h	16 h	16 h	16 h
Dunkelperiode	16 h	16 h	8 h	8 h	8 h
Lichtqualität			SonT-Agro		
Lichtquantität	120 μ E	800 μ E	120 μ E	800 μ E	1200 μ E
Rel. Luftfeuchtigkeit	55 %				
Temperatur (Tag/Nacht)	22/ 22 °C	22/ 22 °C	22/ 22 °C	24/ 22 °C	24/ 22 °C

2.2.2 Oberflächensterilisation von Samen

Die Oberflächensterilisation erfolgte mittels Chlorgas (CLOUGH & BENT, 1998). Dazu wurden ca. 200 *A. thaliana*-Samen in einem geöffneten 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß in einen Exsikkator verbracht. Die Chlorgasentwicklung im Exsikkator wurde durch die Vermischung von 50 ml Natrium-Hypochlorit mit 1,5 ml HCl_{konz.} erreicht. Die Inkubationszeit in der Chlorgasatmosphäre betrug mindestens 180 bis maximal 300 min. Anschließend wurde das Saatgut bis zur weiteren Verwendung dunkel und trocken bei Raumtemperatur in geschlossenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

2.2.3 Steril-Anzucht auf ½ Murashige & Skoog (MS)-Medium

Steril-Anzuchten von *A. thaliana*-Pflanzen wurden auf Nährmedium nach MURASHIGE & SKOOG (1962) ausgebracht. Dazu wurden 2,2 g MS-Salze in H₂O_{bidest} gelöst und durch 0,55 % (w/v) 2-(N-Morpholino) Ethansulfonsäure (MES) gepuffert und mittels KOH bei pH 5,7 eingestellt. Anschließend wurde dieses Flüssigmedium mit 0,8 % (w/v) Agar versetzt und bei 125 °C für 15 min autoklaviert. Das sterilisierte MS-Medium wurde entweder direkt in Petrischalen (\varnothing 145 mm; Greiner, Essen) gegossen oder bis zur

Verwendung in sterilen Gefäßen in fester Form für maximal einen Monat aufbewahrt und bei Bedarf im Mikrowellengerät verflüssigt. Selektionsmittel, Pflanzenhormone oder sonstige Zusatzstoffe wurden unmittelbar vor dem Verteilen der Lösung auf Petrischalen (\varnothing 8 cm) bei einer Temperatur von maximal 60 °C zugegeben. Auf diesen MS-Agar-Platten wurden ca. 100 (vgl. 2.2.2), sterilisierte *A. thaliana*-Samen in regelmäßigen Abständen ausgebracht und für zwei Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert. Keimung und Anzucht erfolgte unter den in Tabelle 7 angegebenen KT-NL-Bedingungen.

2.2.4 Glutathion (GSH)-Behandlung

Zum Testen der Reaktion von auf Erde kultivierten (vgl. 2.2.1) *A. thaliana* WT- und KO-Pflanzen auf GSH wurden die Pflanzen in Anlehnung an BASHANDY *ET AL.* (2010) mit 0,4 mM GSH-Endkonzentration gewässert.

2.2.5 Gibberellinsäure (GA₃)-Behandlung

Die Behandlung von auf Erde kultivierten (vgl. 2.2.1) *A. thaliana* WT- und KO-Pflanzen mit GA₃ wurde in Anlehnung an WILSON *ET AL.* (1992) durchgeführt. Dazu wurde eine 0,1 mM GA₃-Lösung in 0,02 % Tween 20 einmal wöchentlich auf die entsprechenden Pflanzen gesprüht. Kontroll-Pflanzen wurden mit 0,02 % Tween behandelt.

2.2.6 Pollen-Vitalitätstest mittels Alexander-*Stain*-Methode

Die Alexander-*Stain*-Methode macht es möglich, gekeimte Pollen auf ihre Vitalität hin zu untersuchen (ALEXANDER, 1987). Dazu wurden Pollen von *A. thaliana* WT- als auch von KO-Pflanzen in Pollen-Nährlösung über Nacht (ÜN) bei 22 °C zum Keimen gebracht (BOAVIDA & McCORMICK, 2007). Anschließend wurden die gekeimten Pollen auf Objektträgern verbracht und mit Alexander-*Stain*-Lösung für 5 min inkubiert. Vitale Pollen erscheinen rötlich, während abgestorbene Pollen eine blau-grüne Färbung annehmen. Ausgekeimte Pollenschläuche verlagern ihr Zytosol in die Pollenschlauchspitze, sodass nur diese rötlich erscheinen.

Tabelle 8 Lösungen zur Alexander-Stain-Methode

Pollen-Nährlösung	5 mM CaCl ₂ 0.01 % (w/v) H ₃ BO ₃ 5 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 10 % (w/v) Saccharose pH 7.5.
Alexander-Stain-Lösung	10 ml 95%iger Ethanol 4 ml 1 % Malachite-Grün in 95% ethanol 5 ml 1 % Fuchsin-Rotin H ₂ O 0.5 ml 1 % Orange G in H ₂ O 2 ml Eisessig 25 ml Glycerol 5 g Phenol 5 g Chloral-Hydrat add. 47.5 ml H ₂ O

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Selektion von Bakterien

Zur Kultivierung wurden *E. coli* *Xl1blue*- oder *BL21*-Zellen unter Zusatz der entsprechenden Selektionsantibiotika (Tabelle 4) und aeroben Bedingungen in Flüssigkultur oder auf festem Medium (Tabelle 3) bei 37 °C ÜN angezogen. Aerobe Bedingungen der Flüssigkulturen wurden durch Verwendung von Gefäßen mit Schikanen und je nach Volumen durch den Einsatz von Roll- oder Horizontal-Schüttlern erreicht. *A. tumefaciens*-Zellen wurden für 36 h bei 30°C unter aeroben Bedingungen in YEB-Medium kultiviert.

2.3.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mittels der Rubidiumchlorid-Methode (HANAHAN, 1983). Dazu wurden *E. coli*-Zellen aus einer Glycerinkultur (GK) (vgl 2.3.18) über Nacht in 5 ml YT-Medium, welches mit dem zum *E. coli*-Stamm passenden Antibiotikum versetzt worden war, aerob angezogen. Ein Aliquot von 1,5 ml dieser Kultur wurde in mit 100 ml LB-Medium ohne Zusatz eines Antibiotikums überführt und aerob bis zu einer optischen Dichte (OD_{600 nm}) von 0,4-0,5 aerob angezogen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis und eine anschließende Sedimentation für 10 min bei 5000 xg und 4 °C. Die sedimentierten Bakterien wurden in 40 ml gekühltem TFB1-Puffer rückgelöst und für 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Sedimentationsvorgang wurde

wiederholt. Die Rücklösung der Bakterien erfolgte in TFB2-Puffer. Je 100 µl dieser Kultur wurden auf mittels flüssigem Stickstoff vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und dabei schockgefroren. Die so aliquotierten kompetenten *E. coli*-Bakterienzellen wurden anschließend bis zur ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 9 Zusammensetzung der TFB1- und TFB2-Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
TFB1-Puffer	30 mM Kaliumacetat, pH 5,8 (Essigsäure), 50 mM MnCl ₂ , 100 mM RbCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 15 % (v/v) Glycerin, sterilfiltriert
TFB2-Puffer	10 mM MOPS, pH 7,0 (NaOH), 10 mM RbCl ₂ , 75 mM CaCl ₂ , 15 % (v/v), Glycerin, autoklaviert

2.3.3 Herstellung chemisch kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurde zunächst eine Vorkultur des Stammes GV 3101 in 5 ml YEB-Medium für 36 Stunden aerob mit dem Antibiotikazusatz Rifampicin (Rif) bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurden mit dieser Kultur 200 ml YEB-Medium_{Rif} angeimpft, bis zu einer optischen OD₆₀₀ von 0,4-0,5 inkubiert und zentrifugiert (4 °C, 20 min, 2000 xg). Der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde mit gekühltem TE-Puffer gewaschen (10 mM Tris, pH 7,5 mit HCl, 1 mM EDTA) und erneut zentrifugiert (4 °C, 20 min, 2000 xg). Der resultierende Niederschlag wurde nach dem Entfernen des Überstandes in 20 ml YEB-Medium ohne Antibiotikazusatz aufgenommen. Je 500 µl der *A. tumefaciens*-Suspension wurden in mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.4 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Die Aufnahme von Fremd-DNA in Bakterienzellen wurde mittels Hitzeschocktransformation (COHEN *ET AL.*, 1972) durchgeführt. Dazu wurden 100 µl chemisch kompetente *E. coli*-Zellen verwendet. Diese wurden auf Eis aufgetaut und mit der entsprechenden Plasmid-DNA gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42 °C über 90 sec (XL1-Blue bzw. 20 sec Bei BL21DE3 pLysS) und eine erneute Inkubation für eine Minute auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml nicht selektiven YT-Mediums wurden die Zellen ein bis zwei Stunden bei 37 °C aerob angezogen. Die

Selektion erfolgte anschließend durch Ausplattieren auf Agarplatten, die mit entsprechenden Antibiotika versetzt waren.

2.3.5 Transformation von Plasmid-DNA in *A. tumefaciens*

Die Transformation von Plasmiden in *A. tumefaciens* erfolgte in Anlehnung an die Methode von HÖFGEN & WILLMITZER (1988). Dazu wurden 500 µl kompetente *A. tumefaciens*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei 37 °C für 5 min aufgetaut, mit 1 ml YEB-Medium versetzt und für 4 Stunden bei 28 °C und 250 rpm geschüttelt. Von der Bakteriensuspension wurden 200 µl auf Rif-Kan-YEB-Agarplatten ausgestrichen. Die Restkultur wurde bei 1000 xg und 25 °C für 5 min zentrifugiert. Vom Überstand wurde ca. 1 ml verworfen und das Sediment im Restansatz verflüssigt. Von diesem Ansatz wurden 100 µl auf Selektionsplatten ausplattiert und 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.3.6 Transformation von Plasmid-DNA in *A. thaliana* durch *A. tumefaciens*

Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte durch den *A. tumefaciens*-Stamm GV3101 mittels *floral dip* (CLOUGH & BENT, 1998). *A. thaliana* Col-0- und AtGRXS17-KO-Pflanzen wurden auf Erde angezogen und nach Entfernen des primären Blütenstandes zum Blühen gebracht. Durch die damit verbundene Brechung der Apikaldominanz wurde die synchrone Entwicklung mehrerer sekundärer Infloreszenzen gefördert. Nach ca. 7 Tagen konnten die Pflanzen zur Transformation genutzt werden. Zu diesem Zeitpunkt bereits gebildete Schoten wurden vor der Transformation entfernt.

Glaskolben mit je 250 ml YEB-Medium und mit entsprechendem Antibiotikazusatz wurden mit Agrobakterien einer Übernachtskultur übergeimpft. Für ca. 7 Stunden wurde diese Kultur aerob auf einem Horizontalschüttler bei 180 Upm und 28 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 kultiviert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 5000 xg . Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 500 ml einer sterilen 5%igen (w/v) Saccharose-Lösung aufgenommen und mit 0,05 % Silwet L-77 (Lehle-Seeds, Round Rock, USA) versetzt. Die Blütenstände der Pflanzen wurden für 20 sec in die Bakteriensuspension getaucht. Anschließend wurden die Pflanzen bis zu 24 Stunden bei hoher Luftfeuchte unter einer Wachstumshaube auf feuchtem Zellstoff und schwachem

Licht ($\sim 50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gelagert. Um die Transformationseffizienz weiter zu erhöhen, wurde das *floral dip* nach 5 Tagen wiederholt und die nach dem *Dippen* entstandenen Blütenstände wurden regelmäßig entfernt. Die Samen wurden geerntet und auf MS-Agarplatten mit dem Wirkstoff Phosphinothricin (40 $\mu\text{g/ml}$) selektioniert.

2.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde das Machery-und-Nagel-Pufferset verwendet, welches aus drei Lösungen (Lösung I, II und III) besteht und auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht. Die entsprechende Kultur wurde aerob über Nacht angezogen. Es folgte eine zweimalige Zentrifugation von je 1,5 ml Bakterienkultur mit 3000 xg . Die sedimentierten Bakterien wurden in 200 μl Lösung I resuspendiert und mit 200 μl Lösung II gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT folgte die Zugabe von Lösung III. Die Probe wurde zehnmal invertiert und nach 10 min Inkubationszeit auf Eis bei 15800 xg 20 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 450 μl Isopropanol überführt und 10 min mit 15800 xg zentrifugiert. Das durch die Zentrifugation gebildete Sediment wurde vom Überstand getrennt, mit 800 μl 80%igem Ethanol gewaschen und erneut bei RT mit 15800 xg für 10 min zentrifugiert. Es folgte eine 5-minütige Trocknung bei RT. Die Plasmide wurden in 50 μl Merck-Wasser gelöst.

2.3.8 Maxi-Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien

Für die Transformation der Blattprotoplasten waren Menge, Konzentration und Reinheit der Plasmid-Minipräparation zu gering, weshalb für diesen Teil eine spezielle Maxipräparations-Methode zur Plasmid-DNA-Gewinnung verwendet wurde. Hierzu wurden mehrere Plasmid-Isolierungsmethoden miteinander kombiniert.

X11 blue E. coli-Bakterien, die mit einem entsprechenden Plasmid transformiert worden waren, wurden in 250 ml TB-Medium mittels einer über Nacht kultivierten Bakterien-Vorkultur 1:50 verdünnt und bei 37 °C und 200 Upm für 8 Stunden kultiviert. Die Kultur wurde anschließend bei 3200 xg für 8 min in einem 50 ml Falcon-Gefäß mehrfach übereinander sedimentiert und in 9 ml Lösung I mit 450 μl Lysozym (100 mg/ml) suspendiert. Nach der Zugabe von 20 ml Lösung II wurde die Lösung 5 Mal vorsichtig invertiert und für 10 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde die Lösung mit 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 für 10 min in Eiswasser neutralisiert. Eine

anschließende Sedimentation der nicht benötigten Zellbestandteile bei 3200 *xg* ermöglichte die weitere Verwendung des Überstandes. Die im Überstand befindlichen Plasmide wurden durch 4 Lagen Miracloth filtriert, mit Isopropanol auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt, für 10 min bei 25 °C ausgefällt und bei 3200 *xg* für 30 min bei Raumtemperatur sedimentiert. Verflüssigt wurde der Niederschlag in 1,5 ml TE-Puffer, der anschließend mit demselben Volumen an 5 M Lithiumchlorid versetzt und für 30 min bei 3200 *xg* und zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde erneut mittels Isopropanol (100 %; 3 ml) ausgefällt, für 30 min bei 25 °C, 3200 *xg* sedimentiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen (15 min, 3200 *xg*, RT). In 600 µl TE-Puffer, welcher mit 20 µg/ml RNAase versetzt wurde, wurde das Sediment rückgelöst und die in dem Gemisch enthaltene RNA innerhalb einer Stunde bei 37 °C abgebaut. Es folgte eine schrittweise Zugabe von 400 µl PEG-Lösung und eine anschließende mindestens 10-minütige Inkubation in Eiswasser. Sedimentiert wurde der Ansatz bei 10000 *xg*, 4 °Celsius. Die Rücklösung erfolgte in 400 µl TE-Puffer, gefolgt von einer Phenol-Chloroform-Fällung. Dazu wurde zu 400 µl Plasmid-Lösung dieselbe Menge an Phenol/Chloroform gegeben, vermischt (30 sec Vortex) und für 5 min zentrifugiert (14000 *xg*). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform vermischt und erneut wie im vorangegangenen Schritt zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde einer Ammoniumacetat-Fällung (0,25faches Volumen [100 µl] 10 M Ammoniumacetat und doppeltes Volumen [1 ml] Ethanol, für 10 min bei RT) unterzogen. Einer weiteren 5-minütigen Zentrifugation (14000 *xg*) bei 4 °C und der anschließenden Reinigung des Niederschlags mittels 70%igem Alkohol (5 min, 10000 *xg*, RT) schloss sich die Rücklösung in 50-100 µl EB-Puffer an. Nach der Bestimmung der Konzentration (vgl. 2.3.12) standen die Plasmide für weitere Versuche zur Verfügung. Gelagert wurde die so gewonnene Plasmid-DNA bei 4 °C für maximal 14 Tage oder für einen längeren Zeitraum bei -20 °C.

Tabelle 10 Verwendete Puffer für die Maxi-Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lösung 1	50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM EDTA, autoklaviert
Lösung 2	0.2 M NaOH, 1.0% SDS, Autoklaviert
Lysozym	100 mg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
PEG Lösung	20% PEG 8000, 2.5 M NaCl, autoklaviert
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, autoklaviert
EB-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), autoklaviert

2.3.9 Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzengewebe

Zur DNA-Isolierung wurden 500 µl DNA-Extraktionspuffer in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß vorgelegt, mit 100 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertem Pflanzenpulver versetzt und vermischt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 4 °C mit 15800 *xg* wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort mit derselben Menge an Isopropanol vermischt. Für mindestens 60 min wurde die Probe bei -20 °C inkubiert und anschließend 10 min mit 15800 *xg* bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag bei RT getrocknet und in 100 µl Merck-Wasser aufgenommen.

Tabelle 11 Zusammensetzung des DNA-Extraktionspuffers

Bezeichnung	Zusammensetzung
DNA Extraktionspuffer	0,2 M Tris-HCl, 0,4 M LiCl, 25 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS

2.3.10 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe

Die Isolierung der Gesamt-RNA mittels *Tri-Reagenz* (Ambion, Carlsbad, CA) erfolgte weitestgehend nach Anleitung des Herstellers. Zum Einsatz kam 100 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenpulver aus unterschiedlichen Pflanzengewebe. Rückgelöst wurde die isolierte RNA in 50 µl Diethylpyrocarbonat-Wasser (DECP-H₂O). Der RNA-Gehalt wurde photometrisch ermittelt (vgl. 2.3.12). Nach dieser Bestimmung wurden 5 µg RNA einem DNA-Abbau mittels DNase I (5 U/µl) (Machery & Nagel, Düren) unterzogen und mittels PCR auf DNA-Kontaminationen untersucht. Gelagert wurde die RNA bei -80 °C wenn die Verwendung innerhalb von ein bis zwei Wochen erfolgte, länger in flüssigem Stickstoff oder bei -20 °C in einer Natriumacetat -Fällung (vgl. 2.3.11).

2.3.11 Präzipitation von DNA oder RNA

Zur Präzipitation von DNA oder RNA wurde Natriumacetat verwendet. Zu der entsprechenden DNA/RNA wurden $\frac{1}{10}$ des Volumens 3 M Na-Acetate (pH 5,0) und 3 Volumina Ethanol_{abs} gegeben und vermischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Nucleinsäure-Fällung bei -20 °C gelagert. Zur weiteren Verwendung wurde das Gemisch mit 15800 *xg* für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die sedimentierten Nucleinsäuren wurden mit einer 70%igen Ethanol-DEPC-H₂O-Lösung

durch eine 10 min andauernde Zentrifugation bei 15800 xg gewaschen. Auch dieser Überstand wurde verworfen. Die RNA bzw. DNA wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend, je nach gewünschter Konzentration, in DEPC-H₂O rückgelöst.

2.3.12 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Die Absorption (A) von wässrigen DNA- und RNA-Lösungen wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch im Abgleich gegen 5 mM Tris-HCl (pH 7,8) bestimmt. Ein Wert von $A_{260} = 1$ entspricht bei einer Schichtdicke von einem cm bei doppelsträngiger DNA einer Nukleinsäurekonzentrationen von 50 $\mu\text{g/ml}$ und 40 $\mu\text{g/ml}$ bei RNA. Die Lösungen wurden auf Verunreinigungen photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm und 230 nm untersucht. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm gibt Auskunft über mögliche Verunreinigungen durch aromatische Aminosäuren. Reine Isolierungen von DNA ergeben ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 2,0, die von RNA ein Verhältnis von 1,8. Der Quotient aus den Extinktionen von A_{260} und A_{230} gibt an, ob Verunreinigungen durch Phenole, Salze oder Kohlenhydrate vorliegen (LOTTSPREICH & ENGELS, 2006).

2.3.13 DNA-Restriktion

Endonukleasen können an spezifischen Erkennungssequenzen DNA schneiden. Diese Eigenschaft wird zur Vorbereitung von DNA-Fragmenten und Vektoren für eine anschließende Ligation oder zur Analyse bereits erstellter Plasmide verwendet. Die Restriktionen wurden nach Protokollen der Firma Fermentas unter der Zuhilfenahme der Internetseite <http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest> durchgeführt.

2.3.14 Synthese von cDNA

Es wurde jeweils 5 μg isolierter Gesamt-RNA (vgl.2.3.10) einer Pflanzenprobe in einer cDNA-Synthese eingesetzt. Die Durchführung mit dem *RevertAid H Minus First Strand cDNA-Synthese Kit* erfolgte nach Vorschrift des Herstellers (Fermentas, St.Leon-Roth).

2.3.15 Insertion von DNA-Sequenzen in Vermehrungsvektoren

Zur Vermehrung wurden von cDNA amplifizierten Sequenzen (vgl. 2.3.19) in die T-Überhangsvektoren pGEM-T-easy oder der *Blundend*-Vektor pJET mittels T4-Ligase nach Anleitung des Herstellers eingefügt. Das Verhältnis von Vektor zu Insert lag bei 1 zu 5. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend bei 75 °C inaktiviert.

Tabelle 12 Ansatz für eine Ligation (20µl)

Menge	Bezeichnung
4 µl	5 x Puffer
1,5 µl	T4-Ligase (200 U/µl)
5 : 1	Verhältnis Insert zu Vektor
ad 20 µl	H ₂ O

2.3.16 Insertion von DNA-Sequenzen in Überexpressionsvektoren

Zur Herstellung rekombinanter Proteine wurden die jeweiligen geschnittenen DNA-Fragmente (vgl. 2.3.13) über Restriktionsschnittstellen in die Überexpressionsvektoren pET16b mittels T4-Ligase (Fermentas, St. Leon-Roth) inseriert (vgl. 2.3.16).

2.3.17 DNA-Sequenzierung

Sequenzanalysen von doppelsträngiger DNA wurden als Auftragssequenzierungen durch die Firma *Seqlab* (Göttingen) oder alternativ von der Firma *Starseq* (Mainz) durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzdaten wurde mit Hilfe des Programms *Clone Manager Suite 7* (*Scientific & Educational Software Cary, USA*) durchgeführt.

2.3.18 Erstellung von Glycerinkulturen

Zur Aufbewahrung von Bakterien über einen längeren Zeitraum dienen Glycerinkulturen. Zur Herstellung wurden 500 µl einer Bakterienkultur mit 500 µl 80%igem sterilem Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.3.19 Amplifizierung von Gen-Sequenzen mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (MULLIS *ET AL.*, 1986) wurde zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Sequenzen verwendet. Für die PCR kamen je nach Anwendung verschiedene Polymerasen zum Einsatz. Zur Genamplifikation mit anschließender Klonierung

(vgl. 2.3.15) wurden Polymerasen mit *Proofreading* verwendet, um Fehler in den Sequenzen zu minimieren. Für analytische Anwendungen wurde die Polymerase *Dreamtaq*[®] (Fermentas, St. Leon-Roth) eingesetzt. Die PCR wurde nach Standard-Protokollen der Hersteller durchgeführt und hinsichtlich der Anlagerungstemperaturen der verwendeten Primer optimiert. Ein verwendetes Standard-Protokoll ist in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13 Standard PCR-Ansatz und Protokoll

Pipettier-Ansatz		PCR Verlaufs-Protokoll		
2 µl	10 x PCR- Puffer (ohne MgCl ₂)	Initiale Denaturierung	94 °C	1 min
1,2 µl	MgCl ₂ (25 mM)	Denaturierung	94 °C	30 sec
0,2 µl	dNTP`s (10 mM)	Primer- <i>Annealing</i>	xx °C	30 sec
2 µl	<i>forward</i> -Primer (10 µM/µl)	Elongation	72 °C	xx sec
2 µl	<i>reverse</i> -Primer (10 µM/µl)	Finale <i>Elongation</i>	72 °C	10 min
0,25 µl	Taq-Polymerase (10 U/µl)	Endtemperatur	10 °C	(∞)
1 µl	Matrize (cDNA)			
ad 20 µl	H2O			

2.3.20 qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde verwendet um Transkriptmengen in verschiedenen Geweben und an bestimmten Zeitpunkten an *A. thaliana* WT- und KO-Pflanzen zu ermitteln und zu vergleichen. Dazu wurde aus diesen Pflanzen RNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben (vgl. 2.3.14). Diese cDNA enthielt ausschließlich die Gensequenzen, die zur Erntezeit transkribiert in den Pflanzengewebe vorlagen. Menge und Zusammensetzung der mRNA sind spezifisch für Zeitpunkt, Gewebe und das Pflanzenmaterial. Bei der qRT-PCR wird während der PCR-Reaktion direkt die Menge an amplifizierten DNA-Fragmenten mittels Fluoreszenz detektiert. Die hierfür benötigten Primer wurden so erstellt, dass deren Schmelztemperaturen ähnlich waren und der abgegriffene Genbereich jeweils eine vergleichbare Basenpaarlänge aufwies. Da es bei der PCR zu einer zyklischen Verdopplung der amplifizierten Fragmente kommt, kann man den Eintritt in die exponentielle Phase bestimmen, der abhängig von der eingesetzten *template*-Menge ist. Je früher dieser Zyklus erreicht wird desto mehr *template* für dieses Gen ist ursprünglich vorhanden gewesen. Zum Einsatz kam das Gerät *MylQ Single-Color Real-Time PCR Detection System* von BioRad. Als Reaktionsansatz wurde der zweifach konzentrierte *iQ[™] SYBR[®] Green Supermix* der Firma BioRad verwendet. Normalisiert wurden die Transkriptmengen gegen das *housekeeping*-Gen für Ubiquitin 11 (Ubq 11, At4g05050).

Tabelle 14 Standard-Ansatz für die qRT-PCR

Bezeichnung	Volumen	Endkonzentration
<i>template</i> cDNA	1,0 µl	
2 x iQ™ SYBR® Green Supermix	12,5 µl	1 x
<i>forward</i> -Primer (10 µM)	0,75 µl	300 nM
<i>reverse</i> -Primer (10 µM)	0,75 µl	300 nM
Merck-H ₂ O	10,0 µl	
Gesamtvolumen	25 µl	

Die Anzahl der Kopien wurden ermittelt, indem Verdünnungsreihen von Plasmiden eingesetzt wurden, deren Konzentration durch photometrische Bestimmungen bekannt war. Diese Plasmide enthielten Sequenzen der zu untersuchenden Gene. Auf diese Weise konnte die ermittelte Fluoreszenz der zu untersuchenden Transkripte der Anzahl der Kopien zugeordnet werden. Die Transkripte der verschiedenen zu untersuchenden cDNAs wurden mit der Fluoreszenz der Plasmide abgeglichen. Am Ende jeder qRT-PCR wurde eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt, um abzusichern, dass auch wirklich das zu untersuchende Gen den Anstieg der Fluoreszenz verursacht hat. Ein standardmäßig verwendetes Protokoll für einen qRT-PCR Ansatz ist in Tabelle 14 angegeben, das Standard-Programm in Tabelle 15.

Tabelle 15 Standard-RT-qPCR-Programm

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung und <i>Taq</i> -Polymerase-Aktivierung	96 °C	3 min	
Denaturierung	96 °C	30 sec	40 Zyklen
Primer-annealing	55 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Denaturierung	96 °C	1 min	80 Temperaturschritte
Schmelzkurvenanalyse	60 °C	1 min	
Temperaturerhöhung von je	0,5 °C	10 sec	
Maximale Temperatur	100 °C		

2.3.21 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von DNA-Fragmente wurden, je nach der erwarteten Länge des DNA-Stranges, 1-2,5%ige Agarose-Gele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte nach SAMBROOK & RUSSEL (2001). Vor dem Beladen der Agarosegel-Taschen wurden 20-50 µl Probe mit jeweils 1/5 des 6-fach konzentrierten Ladepuffers (Fermentas, St. Leon-Rot), vermischt. Als Marker diente je nach Fragment-Größe der *GeneRuler™ 1 kb DNA ladder™* oder der *GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Plus™* (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V, für 35 bis 45 min in

0,5x TBE- oder TAE-Puffer. Die DNA-Fragmente wurden durch 20-minütiges Färben der Gele in einer 0,1%igen Ethidiumbromid-Lösung bei UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) sichtbar gemacht. Dokumentiert und analysiert wurde die DNA-Verteilung im Gel mittels *Gel-Doc-System* und der *Quantity One 1-D Analysis Software* der Firma BioRad (München).

Tabelle 16 Zusammensetzung eines 1%ige Agarose-Gels sowie TAE- und TBE-Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
5x TBE-Puffer (pH 8,5)	900 mM Tris, pH 8,5, 900 mM Borsäure, 25 mM EDTA
50x TAE-Puffer (pH 8,0)	2 M Tris, 1 M Essigsäure, 25 mM EDTA
1%iges Agarose-Gel	1 g Agarose, 100 ml 0,5x TBE- bzw. 1x TAE-Puffer

2.3.22 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch Gelelektrophorese getrennten DNA-Fragmente wurden mittels eines sterilen Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mit dem *Nucleo Spin Extract Kit* (Macherey und Nagel, Düren) nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt.

2.3.23 Einführung einer Punktmutation in ein Gen-Vektorkonstrukt

Ziel der *in vitro*-Mutagenese war es, eine Punktmutation in ein Vektor-Genkonstrukt einzuführen, um einen Austausch von Aminosäuren auf Proteinebene zu verursachen. Dazu wurde ein bereits vorhandenes Vektor-Genkonstrukt aus einem DAM⁺ *E. coli*-Stamm isoliert und als Matrize (maximal 25 ng) in die PCR eingesetzt. Als Polymerase kam die *PfuTurbo DNA polymerase*TM (Stratagene, Santa Clara, USA) zum Einsatz. Weiter wurden *Primer* verwendet, die in ihrer Sequenz an der entsprechenden Stelle die gewünschte Fehlpaarung verursachten. Nach Abschluss der PCR erfolgte ein Abbau der als Matrize eingesetzten Plasmide mittels der Nuklease *DpnI* (Fermentas, St.Leon-Rot). Die neu synthetisierten Plasmide mit der entsprechenden Mutation wurden transformiert und anschließend sequenziert (vgl. 2.3.4).

2.3.24 Identifizierung von T-DNA-Insertions-Linien mittels PCR

Der Nachweis einer T-DNA-Insertion im Genom von *A. thaliana* erfolgte mittels PCR. Zur Identifizierung der T-DNA wurde zuvor isolierte genomische DNA (2.3.9) der zu testenden und vorselektionierten Pflanzen als Matrize eingesetzt. Für die PCR wurde der für die

T-DNA spezifische *Primer Lba1* verwendet. Dieser bindet 363 Basenpaare (bp) vor Ende der *left-border (LB)* an die T-DNA und ist in Richtung des *LB*-Endes orientiert (5'-3'). Der genspezifische *Primer* wurde so erstellt, dass er in den Abschnitt der genomischen DNA bindet, der vorher mittels der TAIR-Datenbank *Sequence-viewer* (<http://www.arabidopsis.org/servlets/sv>) identifiziert wurde. Wenn ein Produkt der vorher bestimmten Größe amplifiziert wurde, konnte von einer T-DNA-Insertion in wenigstens einem der Allele des diploiden Chromosomensatzes an der vorausgesagten Position ausgegangen werden.

2.3.25 Nachweis von homozygoten T-DNA-Insertions-Transformanten mittels PCR

Die DNA der in 2.3.24 positiv getesteten Pflanzen wurde einer weiteren PCR unterzogen, um homozygote Pflanzen zu identifizieren. Dazu wurden zwei genspezifische Primer erstellt, die den Bereich umschließen, in dem die T-DNA inseriert ist. Wenn ein Produkt in der Größe des DNA-Abschnitts ohne T-DNA-Sequenz amplifiziert werden konnte, war davon auszugehen, dass diese Pflanzen heterozygot waren. Weil die Länge der inserierten T-DNA mit 4300 bp zu lang ist, um korrekt von der eingesetzten *Dream-Taq*-Polymerase (Fermentas, St.Leon-Rot) in der gewählten Elongationszeit amplifiziert zu werden, konnte von homozygoten Pflanzen ausgegangen werden, wenn kein Amplifikat erhalten wurde. Es folgte anschließend die Verifizierung mittels cDNA von homozygot getesteten T-DNA-Insertions-Pflanzen mittels qRT-PCR (0), um eventuelle Transkripte des unterbrochenen Gens ausschließen zu können.

2.3.26 *In situ*-Hybridisierung (ISH)

Zur spezifischen Detektion von mRNA in geschnittenem Pflanzengewebe wurde die *In situ*-Hybridisierung (ISH) verwendet. Alle Arbeiten zur ISH erfolgten unter Anleitung von Nora Gutsche in der Arbeitsgruppe (AG) Botanik von Prof. Dr. Sabine Zachgo (Osnabrück). Ebenso wurden die weiter unten aufgeführten Protokolle und verwendeten Geräte freundlicherweise von der AG Zachgo zur Verfügung gestellt.

2.3.26.1 Anfertigung von Schnittpräparaten

Die Pflanzengewebe wurden mittels einer 4%iges Para-Formaldehyd-Phosphatpuffer-Lösung (0,1 M, pH 7,6;) fixiert. Die Einbettung in Paraffin (Paraplast Plus; Fluka, Neu-Ulm) erfolgte mittels Einbettautomat (TP 1020, Leica, Solms). Dazu wurden die Pflanzengewebe schrittweise mittels verschiedener Ethanol-H₂O_{DEPC}-Gemische (30:70 / 50:50 / 70:30/ 100:0) dehydratisiert. Zuletzt wurde das 100%ige Ethanol durch das organische Lösungsmittel Histo-Clear (Biozym, Hessisch Oldendorf) ersetzt. Anschließend wurden die Pflanzengewebe in 60 °C warmes flüssiges Paraffin eingelegt, mittels Unterdruck ÜN entgast und anschließend in flüssigem Paraffin ausgerichtet. Mit Hilfe eines Mikrotoms (RM 2125 RT, Leica, Solms) wurden Schnitte (ca. 7 µm) aus erkalteten Paraffinblöcken angefertigt und geeignete Schnitte mittels eines auf 42 °C temperierten Wasserbades (H₂O_{DEPC}) auf Objektträger (SuperFrost®Plus-Objektträger, Menzel, Braunschweig) aufgezogen und für 24 h bei 42 °C getrocknet.

2.3.26.2 Synthese und Test der RNA-Sonden

Zur Detektion der Transkripte in den Pflanzenschnitten wurden komplementäre Dioxigenin (DIG)-markierte RNA-Sonden benötigt. Dazu wurden mittels T7-RNA-Polymerase (Roche, Mannheim) PCR-Fragmente des gesuchten Transkripts in RNA umgeschrieben. Zur Markierung der RNA wurden der Reaktion DIG-markierte-Uridintriphosphate (DIG-UTPs) hinzugesetzt, die zusammen mit anderen Nukleosidtriphosphaten (NTPs) in die hier synthetisierte RNA eingebaut wurden. Die PCR-Matrize wurde anschließend durch das Enzym Dnase I (Roche, Mannheim) abgebaut, die verbleibende DIG-markierte-RNA-Sonde wurde mittels Ammonium-Acetat ÜN bei -20°C präzipitiert. Der Nachweis für eine erfolgreiche Synthese erfolgte mittels *Dot Blot Assay* immunchemisch mit einem gegen das in der RNA enthaltene DIG gerichtete Serum. Dazu wurde jeweils 1 µl in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) auf eine *Hybond*-Membran (Amersham HybondTM-N⁺, GE Healthcare, München) aufgetragen. Die immunologische Detektion der DIG erfolgte durch einen DIG-Antikörper, der an das Reporter-Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Die Alkalische Phosphatase setzt Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) zu einem blauen Formazan um. Anhand der Verdünnungsstufen ließ sich die Qualität der erstellten DIG-RNA-Sonde abschätzen. Vor der Hybridisierung der

mit Gewebeschnitten versehenen Objektträger mit der DIG-RNA-Sonde mussten diese vom Paraffin befreit werden. Dazu wurden die Objektträger den in Tabelle 19 aufgelisteten Inkubationsschritten unterzogen und getrocknet. Der Hybridisierungsmix (vgl. Tabelle 20) wurde mittels Flexi-Strip (BiWex; Tilburg, NL) auf die Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen versehen. Anschließend wurden diese Präparate zusammen mit durch 4-fachen SSPE angefeuchtetem *Whatman*-Papier, ÜN bei 50 °C in einer mit RNase-Zap (Roth, Karlsruhe) behandelten Feuchtekammer inkubiert.

Tabelle 17 Verwendete Puffer für die ISH

Bezeichnung	Zusammensetzung
Färbepuffer	100 mM Tris, pH 9,5 (HCl); 100 mM NaCl; 50 mM MgCl ₂
ISH-Puffer 1	100 mM Tris, pH 7,5 (HCl); 150 mM NaCl
20-fach SSPE	300 mM NaCl, 200 mM, NaH ₂ PO ₄ , 20 mM EDTA
Entwicklungslösung	9 ml Färbepuffer NBT, 13,5 µl DMF, 5,4 µl BCIP, 13,5 µl
5-fach NTE	50 mM Tris, pH 7,5 (HCl), 5 mM EDTA, 2,5 mM NaCl

Tabelle 18 Protokoll zur Durchführung des Dot-Blot-Assays

Dauer	Verwendete Puffer
5 min	0,2 M NaOH
5 min	2-fach SSPE
5 min	ISH-Puffer 1 / 0,1% Tween
20 min	ISH-Puffer 1 / 0,1% Tween + 0,5% Blocking Agent
60 min	Anti-DIG Fab Fragment-Antikörper (1:3000)
5 / 10 / 15 min	ISH-Puffer 1 / 0,1% Tween
5 min	Färbepuffer
10 – 20 min	Entwicklerlösung

Tabelle 19 Protokoll zur Vorbereitung und Hybridisierung der Proben

Dauer	Verwendete Puffer
5/ 5/ 5 min	Histo-Clear (Biozym; 100%)
5 min	Histo-Clear : Ethanol (1:1)
5/ 5/ 2/ 2/ 2 / 2 / 2 min	Ethanol (100 % 95 % 85 % 70 % 50 % 30 %)
2 min	NaCl (0,85 %)
10/ 10 sec	DEPC-H ₂ O
20 min	2-fach SSPE 70°C
20 min	1 µg/ml Proteinase K in 1-fach TE-Puffer (pH 7,5), 37°C
5 min	2-fach SSPE
5 min	NaCl (0,85 %)
5/ 5/ 5min	Ethanol (70 %/ 95 %/ 100 %)

Tabelle 20 Pipettierschema des Hybridisierungsmixes (pro Objektträger)

Menge	Zusammensetzung
75 µl	deionisiertes Formamid
9 µl	NaOH (5 M)
6 µl	50-fach TE-Puffer (pH 7,0)
3 µl	50-fach Denhardt's (Roth)
30 µl	Dextransulfat/Natriumsalz (50%)
1,5 µl	polyA (10 mg/ml)
3,75 µl	tRNA (20 mg/ml)
X µl	Sonde
ad 150 µl	DEPC-H ₂ O

Nach der Hybridisierungsreaktion erfolgten mehrere Waschschriffe (vgl. Tabelle 21) in verschiedenen Puffern und bei verschiedenen Temperaturen, um unspezifische Bindungen der Sonde und somit Hintergrundfärbungen zu verhindern. Durch eine RNase-Behandlung wurde nicht gebundene RNA entfernt. Die immunologische Detektion der

hybridisierten DIG-Proben erfolgte durch den hinzugegebenen DIG-Antikörper (s.o.). Anschließend wurden die Proben in die Entwicklungslösung (vgl. Tabelle 17) gelegt und ÜN inkubiert. Bei ausreichender Färbung wurde die Farbreaktion durch Waschen in H₂O gestoppt. Die Objekte wurden mikroskopiert und das Expressionsmuster wurde mittels Kamera (DFC490, Leica, Solms) dokumentiert.

Tabelle 21 Protokoll zum Verlauf der Waschschritte

Dauer	Temperatur	Verwendete Puffer
5/ 5 min	25 °C	3-fach SSPE
20/ 20 min	50 °C	3-fach SSPE
5/ 5 min	25 °C	1-fach NTE
30 min	37°C	1-fach NTE III + 80 µl RNase A
5/ 5 min	25 °C	1-fach NTE
30 min	52°C	1,5-fach SSPE
30/ 30 min	52°C	0,3-fach SSPE

Tabelle 22 Protokoll zur Detektion

Dauer	Verwendete Puffer
5 min	Puffer 1
30 min	Puffer 1 / 0,5% BA
30 min	Puffer 1 / 1% BSA + 0,1% Tween
60 min	Puffer 1 / 1% BSA + <i>Anti-DIG Fab Fragment</i> (1:3000)
10 15 20 20 min	Puffer 1 / 0,1% Tween
5/ 5 min	<i>staining</i> Puffer/ 0,1% Tween

2.3.27 Isolierung von Blattprotoplasten aus *A. thaliana*

Die Herstellung von Blattprotoplasten erfolgte in Anlehnung an die Methode von SEIDEL *ET AL.*(2004). Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Von 4 bis 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden Blätter mittels Skalpell abgeschnitten. Diese wurden mit der Unterseite nach oben auf eine glatte Unterlage gelegt und mittels Klebeband (Autoklavierband) festgeklebt. Durch das Abziehen des Klebebandes in einem flachen Winkel wurde die untere Epidermis vom Blatt entfernt. Das Blatt wurde mit der eröffneten Seite nach unten in eine mit Isolierungslösung gefüllte Petrischale gelegt und dort bis zur weiteren Verwendung belassen. Durch den Austausch der Isolierungslösung gegen eine Zellwand-abbauende Enzymlösung und Inkubation für 40 min bei 24 °C (leicht bewegt ~30 Upm, Horizontal-Schüttler) wurden die Protoplasten aus dem Mesophyll-Verband herausgelöst. Die Protoplasten wurden 2 min bei 70 xg sedimentiert und der Überstand wurde durch 10 ml Enzymlösung ohne Enzym ersetzt, ohne das Sediment

aufzuwirbeln. Es folgten zwei weitere Sedimentationen für je 2 min bei 70 *xg*. Dabei wurde jeweils der Überstand ausgetauscht. Zuerst gegen 10 ml W5-Lösung und anschließend gegen 6 ml W5-Lösung. Die resuspendierten Protoplasten wurden für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert und einer weiteren Zentrifugation bei 70 *xg* unterzogen. Der Überstand wurde gegen 4 ml MMG-Lösung ausgetauscht und die Protoplasten in dieser Lösung suspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Protoplasten in einem verdunkeltem Eisbad mindestens für 20 min aufbewahrt. Nach jedem der vorangegangenen Schritte erfolgte eine lichtmikroskopische Qualitätsprüfung auf Intaktheit der Protoplasten.

2.3.28 Transformation von Plasmid-DNA in *A. thaliana* Blatt-Protoplasten

Für die Transformation wurden je 200 μl der wie unter 2.3.27 beschrieben isolierten Protoplasten verwendet. Plasmid-DNA (80-100 μg) (vgl.2.3.8) in einem maximalen Volumen von 20 μl wurde in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 200 μl Protoplastensuspension durch Auftropfen vermischt. Weitere 220 μl PEG-Lösung wurde auf die gleiche Weise hinzugegeben. Es folgte eine 15-minütige Inkubation und eine anschließende Verdünnung der PEG-Lösung durch die Zugabe von insgesamt 1,5 ml W5-Medium. Diese Zugabe erfolgte in zwei Schritten, unterbrochen durch eine 15-minütige Inkubationszeit. Entfernt wurde die PEG-Lösung durch Sedimentation der Protoplasten bei 100 *xg* für 3 min und den Austausch des Überstands durch weitere 2 ml W5-Medium. Die Protoplasten wurden ÜN bei 25 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend mikroskopiert (vgl. 2.3.29).

Tabelle 23 Lösungen zur Isolierung und zur Transformation von *A. thaliana* Blattprotoplasten

Bezeichnung	Zusammensetzung
Isolierungslösung	0.4 M Mannitol, 20 mM KCl, 20 mM MES-KOH (pH 5.7), 10 mM CaCl ₂ ,
W5-Lösung	154 mM NaCl, 125 mM CaCl ₂ , 5 mM KCl, 2 mM MES, 5 mM Glucose, pH
PEG-Lösung	40% PEG 4000, 0.2 M Mannitol, 100 mM CaCl ₂
MMG-Lösung	0.4 M Mannitol, 15 mM MgCl ₂ , 4 mM MES-KOH (pH 5.7)
Enzymlösung	Isolierungslösung 1,5 % (w/v) Cellulase Onuzaka R-10, 0,4 % (w/v)
Alle Lösungen wurden sterilfiltriert	

2.3.29 Mikroskopie von transformierten Blattprotoplasten am Fluoreszenzmikroskop

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurden zwei verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Zum einen wurden *in vivo*-Lokalisationstudien von verschiedenen Proteinen durchgeführt. Dazu wurden *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten mit speziellen Pflanzentransformations-Vektoren transient transformiert. Diese Vektoren enthielten neben dem zu untersuchenden Gen eine im Leseraster ligierte Gensequenz des grün-fluoreszierenden-Proteins (GFP). Nach erfolgreicher Transformation in Mesophyll-Protoplasten liefert dieses Protein bei entsprechender Anregung durch Licht der Wellenlänge 395 nm ein spezifisches Signal und lässt so Rückschlüsse auf den subzellulären Aufenthaltsort der fusionierten Proteine zu. Zur Ermittlung von Protein-Protein-Interaktionen wurde die bimolekulare Fluoreszenzmikroskopie (BiFC) verwendet. Diese Technik entspricht der vorangegangenen, jedoch sind die Proteine nur mit Teilssequenzen des gelb-fluoreszierenden-Proteins (YFP) fusioniert. Erst bei einer gemeinsamen Transformation der verschiedenen Plasmide und spezifische Interaktionen der beiden zu untersuchenden Proteine, können die beiden YFP-Proteinfragmente fusionieren und liefern bei entsprechender Anregung ein Signal. Zur Vorbereitung wurden Objektträger mit einem Ringlochverstärker (Avery Dennison Zweckform GmbH, Holzkirchen) beklebt, der als ca. 50 -100 µm hoher Abstandshalter zwischen Objektträger und Deckglas diente. Es wurden 15 µl der transformierten Protoplasten-Suspension (vgl. 2.3.28) auf den präparierten Objektträger pipettiert, mit einem Deckgläschen versehen und mikroskopiert. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Studien wurde das *Confocal Laser Scanning Microscope* LSM 510 META und der dazugehörige Software (LSM 5, Carl Zeiss AG, Jena) verwendet und wie in Tabelle 24 angegeben eingestellt. Die Aufnahmen erfolgten unter Verwendung einer 20-, 40- oder 63-fachen Vergrößerung.

Tabelle 24 Konfiguration des c-LSM

Bezeichnung	Einstellung
Exzitationsstrahlung	514 nm-Laserlinie des Argon/2-Lasers
Hauptfarbenteiler	HFT 458/514
1. NebenfARBenteiler	NFT 635 VIS
2. NebenfARBenteiler	NFT 545
Detektionskanal ChS1 (Detektion der Autofluoreszenz)	Emissionsfilter KP 651-704
Detektionskanal Ch3 (Detektion des YFP)	Emissionsfilter BP 535-590
Detektionskanal ChD (Durchlicht)	aktiviert

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen

Zur heterologen Expression von Proteinen wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS verwendet. Dieser wurde vorher mit einem Expressionsvektor-Konstrukt transformiert, der mit der gewünschten cDNA ausgestattet war. Der verwendete Stamm besitzt einen durch Isopropyl- β -D-Galaktopyranosid (IPTG) induzierbaren lacUV5-Promotor, der die Expression einer T7-RNA-Polymerase reguliert. Durch die Zugabe von IPTG zu einer wachsenden Kultur wird eine T7-RNA-Polymerase exprimiert. Das vorher in den pET-Vektor klonierte Gen unterliegt der Kontrolle eines T7-Promotors. Somit werden die Transkription und die Expression des klonierten Gens gestartet. Weiter besitzt der pET16-Vektor eine Sequenz, die für eine N-terminale Sequenzerweiterung (*His-tag*) codiert und zur späteren Reinigung der Proteine mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie dient (vgl. 2.4.2). Zur Durchführung der Expression wurden zunächst 500 ml YT-Medium mit einer Vorkultur im Verhältnis von 1:50 unter Zusatz der entsprechenden Selektionsantibiotika beimpft. Die Bakterienkultur wurde bei 37 °C unter aeroben Bedingungen bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,6 angezogen. Nach dem Erreichen dieser optischen Dichte erfolgte zur Dokumentation die Entnahme einer 0-Stunden-Probe. Die Expression des Zielproteins wurde durch die Zugabe von IPTG induziert. Die Inkubationstemperatur von 37 °C wurde nach einer Stunde auf 30 °C gesenkt, um die Anreicherung des Proteins in *inclusion bodies* (Einschlusskörperchen) zu minimieren. Nach weiteren 1,5 Std. erfolgte zunächst die Entnahme einer weiteren Probe (2,5-Std.-Probe) und daraufhin die Zell-Ernte durch Zentrifugation für 15 min bei 5200 xg und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde entweder direkt zur Proteinreinigung eingesetzt (vgl. 2.4.2) oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.2 Reinigung von Proteinen mit *His-tag* aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen

Zur Reinigung von exprimierten Proteinen (vgl. 2.4.1) wurde das *Purification of Polyhistidine-tagged Proteins-Kit* (Protino[®] Ni-TED 2000; Macherey & Nagel; Düren) nach Vorgaben des Herstellers verwendet. Es erfolgte eine Probenentnahme nach jedem Reinigungsschritt, die zur Kontrolle auf ein SDS-Gel (vgl. 2.4.6) aufgetragen wurde.

2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976). Die Absorption wurde 15 min nach Zusammenbringen der Einzelkomponenten bei 595 nm photometrisch gegen eine Probe ohne Protein im SPECORD 50 Photometer (Analytik Jena; Jena) bestimmt. Die Zusammensetzung des Bradfordreagenz ist in Tabelle 25 aufgelistet.

Tabelle 25 Ansatz zur Bestimmung des Proteingehalts mittels Bradfordreagenz

Ansatz		Bradfordreagenz
Probe	x μ l	50 mg Coomassie-Brilliantblau G 250
Bradfordreagenz	500 μ l	10 ml 95 % Ethanol (v/v)
H ₂ O	ad. 1 ml	175 ml 85%ige o-Phosphorsäure
		ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}

2.4.4 Entsalzen von Proteinen-Lösungen

In Abhängigkeit vom Volumen der Probe erfolgte das Entsalzen von Proteinlösungen über *Protein Desalting Spin Columns* (Pierce, Rockford, USA) oder über NAP™-25-Gelfiltrationssäulen (GE Healthcare, München) nach Anleitung des Herstellers. Die *Protein Desalting Spin Columns* wurden bei Probenvolumina von bis zu 120 μ l verwendet, wohingegen die NAP™-25-Säulen bei Probenvolumina von bis zu 2,5 ml verwendet wurden.

2.4.5 Aceton-Fällung

Zur Präzipitation von gelösten Proteinen wurden diese mit dem 3fachen Volumen an eisgekühltem 100 % (v/v) Aceton versetzt und für 20 min bei -20 °C inkubiert. Durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 5200 xg wurden die Proteine sedimentiert, der Überstand verworfen und die Proteine nach einer 5-minütigen Trocknungszeit bei RT im gewünschten Volumen und Puffer rückgelöst.

2.4.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden elektrophoretisch der Größe nach mittels diskontinuierlicher, denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (LAEMMLI, 1970). Die vollständige Denaturierung der Proteine erfolgte vor dem Lauf durch Versetzen mit $\frac{1}{5}$ ihres Volumens an 6-fach-Gelladepuffer und 10-minütiges Erhitzen auf

95 °C. Disulfidbrücken wurden durch die Zugabe von $\frac{1}{10}$ des Volumens an 1 M Dithiotreitol (DTT) reduktiv aufgespalten. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte bei 25 mA pro Gel mit 0,5x-SDS-Laufpuffer. Zur Größenbestimmung diente der Proteinstandard *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas Life Sciences, St.Leon-Rot). Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese mittels Coomassie-Brilliant-Blue (Tabelle 28) für 30-60 min gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde entfernt, indem das SDS-Gel in Entfärbelösung inkubiert wurde.

Tabelle 26 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

Bezeichnung	Zusammensetzung
Trenngel (12%ig)	11,69 % (w/v) Acrylamid, 0,31 % (w/v) Bisacrylamid, 300 mM Tris, pH 8,8 mit HCl, 0,08 % (w/v) SDS, 0,03 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), 0,02 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
Sammelgel (5%ig)	4,92 % (w/v) Acrylamid, 0,08 % (w/v) Bisacrylamid, 125 mM Tris, pH 6,7 mit HCl, 0,1 % (w/v) SDS, 0,08 % (v/v) TEMED, 0,03 % (w/v) APS

Tabelle 27 Zusammensetzung des SDS-Gelladepuffers und des SDS-Laufpuffers

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x SDS-Laufpuffer	192 mM Glycin, 1 % (w/v) SDS, 25 mM Tris, pH 8,3 mit HCl
6x SDS-Gelladepuffer	62,5 mM Tris, pH 6,8 mit HCl, 10 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

Tabelle 28 Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung und Entfärbelösung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliantblau G 250, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

2.4.7 Herstellung von Protein-Rohextrakt aus *A. thaliana*-Pflanzen

Zu Herstellung des Pflanzen-Protein-Rohextrakts für Interaktionsstudien wurden 6-8 *A. thaliana*-Pflanzen in 20 ml Extraktionspuffer bei 4 °C gemörsert, durch Miracloth gefiltert und für 10 min bei 6000 xg und 4 °C im SS34-Rotor zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in einer Ultrazentrifuge für 50 min bei 4 °C und 100.000 xg zentrifugiert. Die Proteinmenge im Überstand wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt, mittels SDS-Gel überprüft und für Interaktionsstudien verwendet.

Tabelle 29 Zusammensetzung Extraktionspuffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	1 ml 1 M Bicin, pH 7,8 mit NaOH 8 ml 1 M Saccharose 10 ml 100 mM NaCl 1 ml H ₂ O _{dest} 10 µl Proteaseinhibitor 10 µl Pefablock

2.4.8 AtGRXS17-Interaktionsstudien an einer Ni²⁺-NTA-Säule

Für die Verwendung musste das gereinigte rekombinante AtGRXS17-Protein (vgl. 2.4.1) zunächst in 20 mM Bicin (pH 7,8) vorliegen. Dazu wurde mit Hilfe einer Nap-25-Säule (Pharmacia Biotech) nach Vorgaben des Herstellers die vorhandene Pufferlösung in 20 mM Bicin pH 7,8 getauscht. Insgesamt 3 mg Protein wurden mittels His-tag an 0,5 ml Ni²⁺-NTA-Säulenmaterial gebunden und ÜN bei 4 °C inkubiert. Die Säule wurde mit 20 mM Bicin pH 7,8 gewaschen. Anschließend wurde Protein-Rohextrakt (vgl. 2.4.7) mit einem Gesamtproteingehalt von ca. 30 mg auf die Säule gegeben. Als Kontrolle wurde eine simultan verwendete weitere Ni²⁺-NTA-Säule ohne gebundenes AtGRXS17-Protein mit

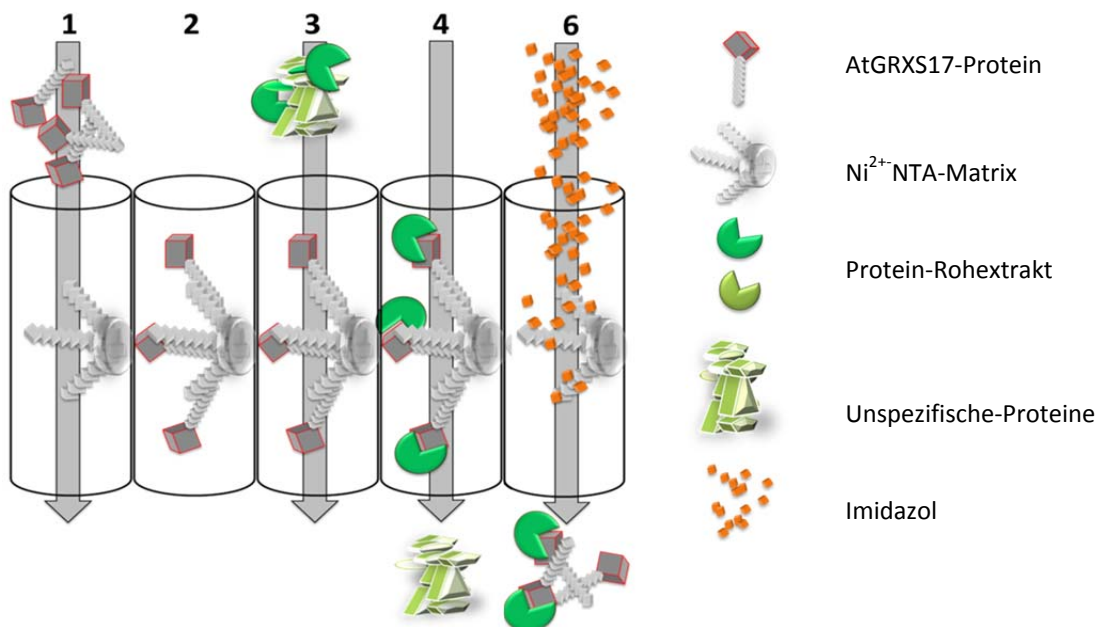


Abb. 8: AtGrxS17-Interaktionsstudien an einer Ni²⁺-NTA-Säule. 1-2. Bindung der AtGRXS17-Proteine über Histidin. 3. Bindungen der Proteine aus dem *A. thaliana*-Rohextrakt an die AtGRXS17-Proteine. 4. Waschfraktionen zum Entfernen unspezifischer Bindungen. 6. Elution der AtGRXS17-Proteine zusammen mit Interaktionspartnern aus dem Rohextrakt.

Protein-Rohextrakt beladen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Std. folgten die in Tabelle 30 zusammengefassten Wasch- und Elutionsschritte (Abb. 8). Die Eluate der einzelnen Wasch-Schritte wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Weiter wurde die Zusammensetzung der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine mit Hilfe der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie identifiziert (vgl. 2.4.9).

Tabelle 30 Zusammensetzung und Menge der Waschpuffer in den einzelnen Waschschr

Waschschritt	Zusammensetzung des Waschpuffers	Menge
W1	20 mM Bicin, pH 7,8 mit KOH	10 ml
W2	20 mM Bicin, pH 7,8 mit KOH	10 ml
W3	20 mM Bicin, pH 7,8 mit KOH	4 ml
W4	20 mM Bicin, pH 7,8 mit KOH	10 ml
W5	20 mM Bicin, pH 7,8 mit KOH + 150 mM DTT	4 ml
W6	20 mM Bicin, pH 7,8 mit KOH	10 ml
W7	1 M Imidazol	4 ml

2.4.9 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Durchführung der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) wurde freundlicherweise von Dr. Stefan Walter (Universität Osnabrück, AGM) übernommen. Zur Vorbereitung wurden die Proben mit 10 µl Acetonitril, 30 µl H₂O_{dest.}, 50 µl 200 mM Tris (pH 8,5 mit HCl) und 10 µl Trypsin (gelöst in 10 mM HCl) ÜN bei 20 °C inkubiert. Durch den Trypsin-Verdau wurden die in den Proben enthaltenen Proteine, abhängig von Lage und Anzahl der Trypsin-Schnittstellen, in Fragmente von bestimmter Masse zerlegt. Diese Peptide wurden mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HPLC) durch eine C₁₄-Säule getrennt und direkt massenspektrometrisch nach dem Masse/Ladungsverhältnis getrennt. Aus den spezifischen Signalmustern dieser Daten konnten die Aminosäuresequenzen der Fragmente bestimmt werden. Bei einem Abgleich mit der Datenbank *Mascot-Search* wurden Proteine identifiziert, die die entsprechenden Aminosäurefragmente nach einem Trypsin-Verdau beinhalten.

2.4.10 Eisen-Schwefel-Cluster-Inkorporation

Die *in vitro*- Einlagerung von Eisen-Schwefel-Zentren wurde, wie in LILLIG ET AL. (2005) beschrieben, im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Carsten Berndt am Karolinska-Institut in Schweden durchgeführt. Dazu wurde gereinigtes AtGRXS17 und Mutanten dieses Proteins in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 5,8; 300 mM NaCl) eingefroren und in diesem Zustand auf Trockeneis versendet.

2.4.11 Histochemische Lokalisierung der β -Glucuronidase-Aktivität

Für die histochemische Färbung wurden unterschiedliche Gewebe von atgrxs17::GUS-Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien verwendet. Die Pflanzenteile wurden zuerst mittels 24-ml-Einwegspritzen (Henke Sass Wolf, Tuttlingen) und ca. 15 ml Färbelösung (ohne X-Gluc) Vakuum-infiltriert bis kleine Blasen aus dem Gewebe aufstiegen. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde die für den ersten Schritt verwendete Lösung durch 5 ml Färbelösung mit X-Gluc (1 mM; Fermentas, St. Leon-Rot) ersetzt und es wurde wie vorher ein Unterdruck erzeugt. Es folgte eine Inkubation ÜN im Dunkeln bei 37 °C. Durch mehrmaliges Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das Pflanzenmaterial entfärbt. Zur Dokumentation wurde ein Binokular oder ein Mikroskop mit Kameraaufsatz verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer sind in Tabelle 31 aufgelistet.

Tabelle 31 Zusammensetzung der Färbelösung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Färbelösung	50 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,0) 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,2 % (v/v) Triton X-100 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$

2.5 Bioinformatische Methoden

2.5.1 Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen

Zur Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen wurde das frei erhältliche Programm *BioEdit* verwendet. Dazu wurden Sätze von Aminosäuresequenzen der zu vergleichenden Proteinfamilien oder homologer Proteine von verschiedenen sequenzierten Organismen aus unterschiedlichen Datenbanken zusammengetragen. Diese Sequenzen wurden zuerst mit der im BioEdit-Programm enthaltenen Applikation *Clustal W* einem *Alingment* unterzogen. Weiter wurden die Sequenzen mit dem ebenfalls in BioEdit enthaltenen Phylogenie-Programm *Phylip* (FELSENSTEIN, 1985) prozessiert. Dabei wurde die PAM-Matrix mit 1000 *bootstrapping*-Wiederholungen verwendet. Mit dem Programm *Neighbor* wurde dann mittels der *Neighbor-Joining*-Methode ein

unbewurzelter Baum erstellt und mit Hilfe der Internetseite <http://mobyli.pasteur.fr/> in ein vektorbasiertes graphisches Format (.svg) gebracht.

2.5.2 Sequenzanalysen und Primerdesign

Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Genen und Proteinen von *A. thaliana* wurden über die Datenbank der *Arabidopsis Information Resource* (TAIR)-Seite (www.arabidopsis.org) oder die der *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) ermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Primer zur Amplifikation als auch zur Sequenzierung von Gensequenzen wurden mittels des frei erhältlichen Programms Primer 3 <http://primer3.sourceforge.net/releases.php> erstellt. Mutageneseprimer wurden über das QuickChange® Primer Design Programm (<http://www.stratagene.com/sdmdesigner/default.aspx>) anfertigt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte durch das *Clone Manager Suite*-Programm (Version 7.1) der Firma Sci Ed Central (Cary, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Analysen von AtGRXS17

3.1.1 Phylogenetische Untersuchungen von GRXS17 aus photosynthetisch aktiven Organismen

Ähnlichkeitsanalysen von Proteinen geben Aufschluss über deren evolutive Verwandtschaftsbeziehungen. Zufällige, generativ stabile Mutationen in der Basenreihenfolge sind Teil der evolutiven Entwicklung. Aus den Mutationen resultieren veränderte Aminosäurezusammensetzungen, die die Eigenschaften der Proteine modifizieren können. Vorteilhafte Mutationen machen Proteine effektiver und steigern den reproduktiven Erfolg des Individuums. Durch den Vergleich von Konsensus-Sequenzen homologer Proteine unterschiedlicher Organismen können die für die Funktion wichtigen Sequenzabschnitte von den variableren Bereichen unterschieden werden. Ursprünglichere Organismen besitzen evolutiv gesehen zumeist ursprünglichere Variationen von Proteinen. Für eine Funktion notwendige Sequenzabschnitte sind stark konserviert. Anhand dieser vergleichenden Untersuchungen können verwandtschaftliche Beziehungen des zu untersuchenden Proteins abgeleitet werden. Das AtGRXS17 ist eine Kombination aus vier Domänen. Auf die N-terminalen Monothiol-Thioredoxin-Homologie-Domäne (Trx-HD) folgen drei Monothiol-Glutaredoxin-Homologie Domänen (Grx-HD I-III) (vgl. 1.1.4.2). Die Kombination von einer Trx-HD und drei Grx-HD ist für dieses Protein erst für die höheren Pflanzen charakteristisch. Ob diese Domänenkombination bei allen höheren Pflanzen anzutreffen ist und aus welcher der zwei vorhanden C-terminalen Grx-HD die dritte hervorgegangen ist, wurde in diesem Abschnitt überprüft. Dazu wurden alle verfügbaren Aminosäuresequenzen von GRXS17-Proteinen aus verschiedenen photosynthetisch aktiven Organismen mittels öffentlich zugänglichen Sequenz-Datenbanken zusammengetragen (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>). Mittels der Applikation *ClustalW* wurden die Sequenzen zuerst nach Ähnlichkeit sortiert und anschließend durch das Programm *Phylip* in einen phylogenetischen Stammbaum umgesetzt (vgl. 2.6.1). Die Aminosäuresequenzen wurden miteinander verglichen und in einem Stammbaum dargestellt (vgl. 2.5.1). Auch die mögliche Bildung von Unterfamilien der GRXS17 durch Genduplikation wurde auf diese Weise für die verschiedenen

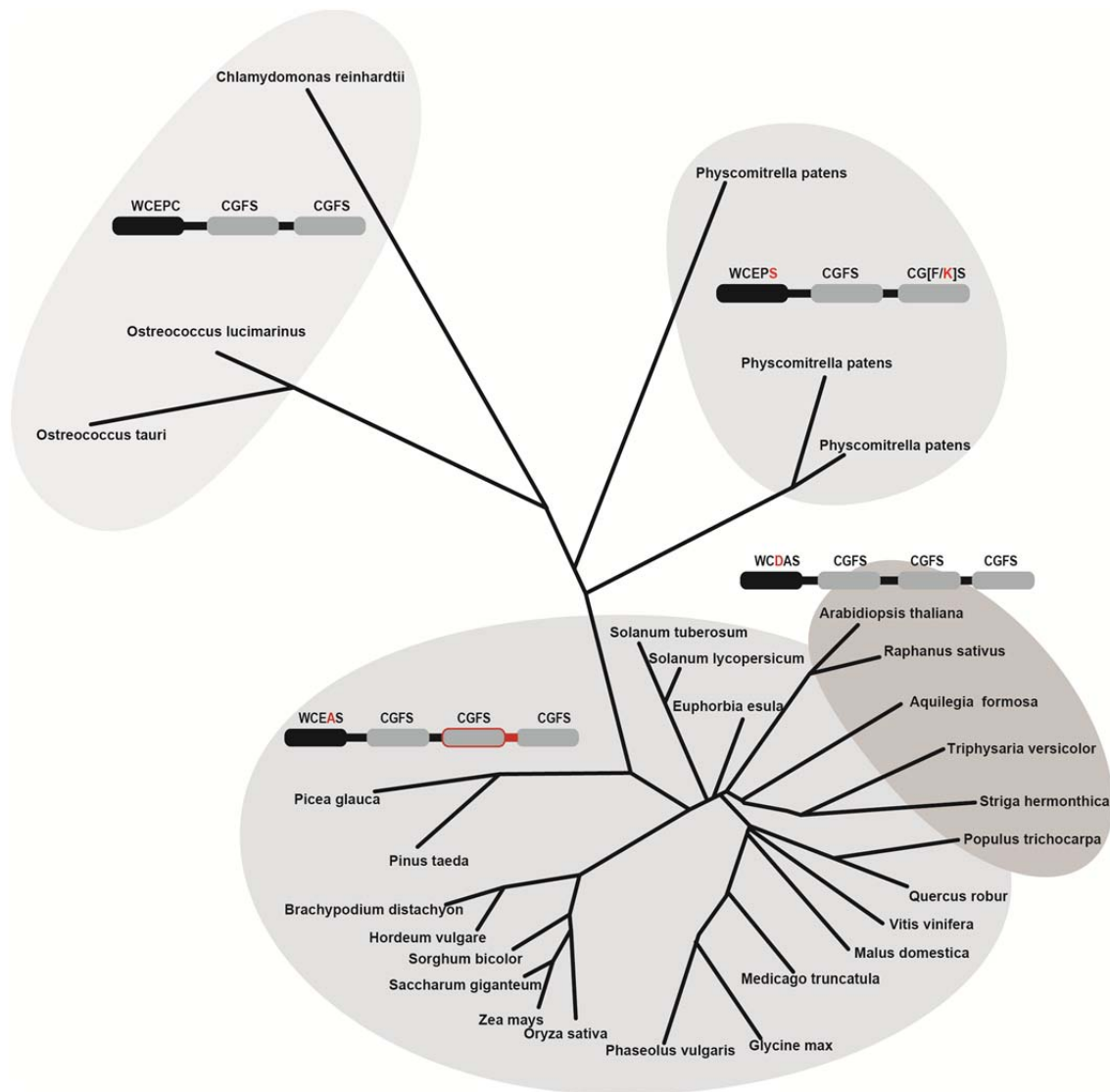


Abb. 9: Stammbaum der GRXS17-Proteine aus photosynthetisch-aktiven Organismen, deren Genom bekannt ist. Die Sequenzen gruppieren sich nach ihrer evolutiven Verwandtschaft in drei Hauptgruppen (grau unterlegt). Neben diesen Gruppen sind jeweils die Anzahl der Domänen sowie die Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums angegeben, die sich alle Proteine teilen. Evolutive Veränderungen wurden mit roter Farbe markiert. Die größte Gruppe weist eine Unterteilung auf, in der sich das AtGRXS17 befindet (dunkel grau).

Organismen geklärt. Berücksichtigt wurden bei der Identifizierung von GRXS17-Proteinsequenzen nur diejenigen, die eine Trx-HD gefolgt von mindestens zwei Grx-HD beinhalteten. Aus insgesamt 65 sequenzierten und aufgrund der Grx-HD Domänenduplikation verschieden gut annotierten Organismen weisen 29 diese für die GRXS17-Proteine eindeutigen Domänen-Kombinationen auf. In den anderen Organismen sind nur unvollständige, auf Fehler bei der bioinformatischen Annotierung zurückzuführende Sequenzen identifizierbar. Der auf dem *Alignment* der positiv identifizierten GRXS17 basierende Stammbaum (Abb. 9) verdeutlicht die Gruppierung der Proteinsequenzen verwandter Organismen.

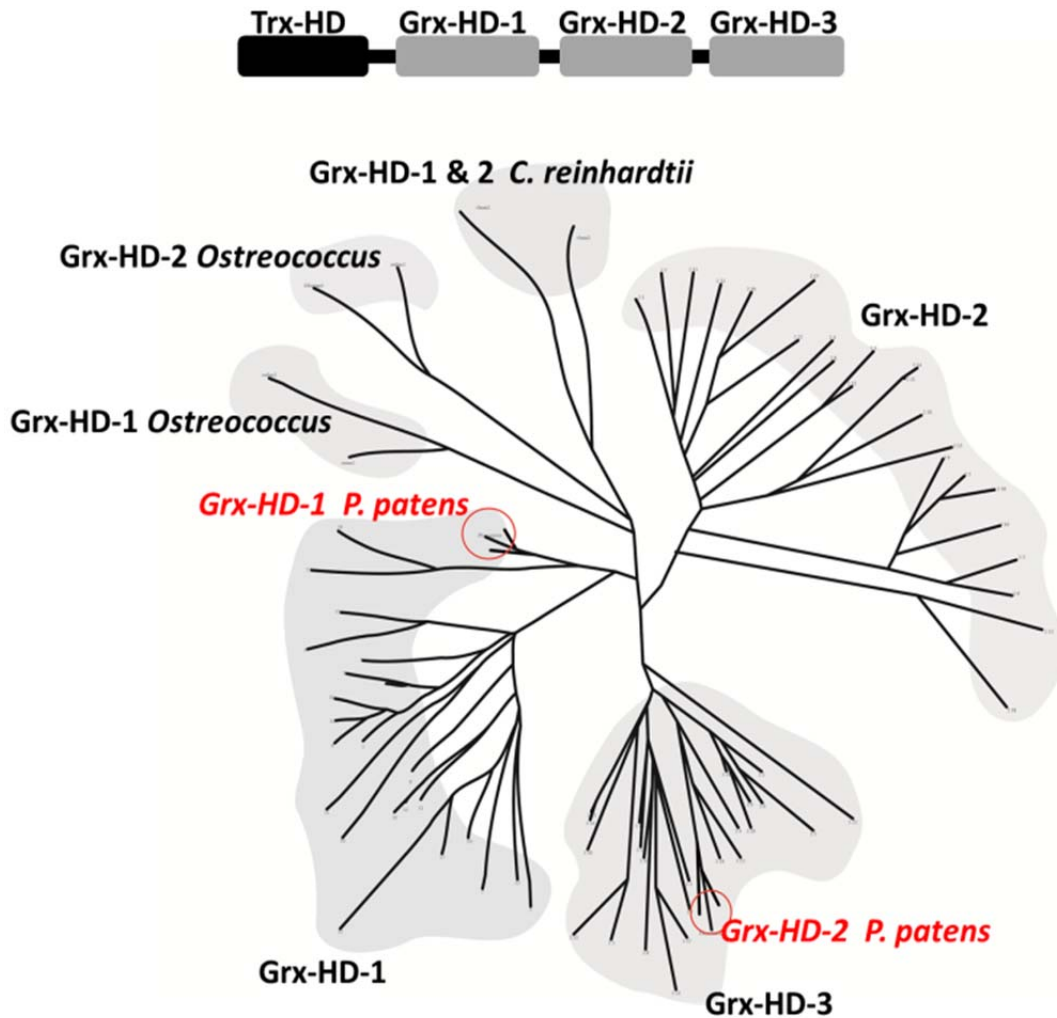


Abb. 10: Analyse der Grx-HD-Sequenzen. Die einzelnen GRX-HD-Sequenzen der höheren Pflanzen gruppieren sich nach ihrer Position, an der sie in den Proteinen angeordnet sind. Dieser Befund unterstreicht den hohen Grad an Ähnlichkeit der einzelnen Grx-HD. Nur die ursprünglicheren Organismen bilden eigene Gruppen, deren Grx-HD ähnlicher zueinander sind als zu den anderen Grx-HD. Die Grx-HD der *P. patens* gruppieren ihre Grx-HD I zu den GRX-HD I der höheren Pflanzen, während sich Grx-HD II zu den Grx-HD III der höheren Pflanzen gruppiert. Damit wird deutlich, dass die Grx-HD II in höheren Pflanzen die jüngste Grx-HD ist und zwischen den beiden ursprünglicheren Grx-HD I und Grx-HD III inseriert wurde.

Die deutlichsten Unterschiede der GRXS17-Proteine ergeben sich aus der Anzahl ihrer Domänen und der Veränderung der Aminosäurezusammensetzung in den aktiven Zentren. Die aktiven Zentren der Grx-HD bleiben mit dem Monothiolsequenzmotiv CGFS weitestgehend stabil. Auch die Anzahl der GRXS17-Gensequenzen bleibt in den Genomen der untersuchten Organismen mit einer Ausnahme ohne Duplikation. Die Aminosäuresequenz der Trx-HD verändert sich von der Sequenz WCEPC der Grünalgen, über WCEPS der Moose, zu WCEAS der höheren Pflanzen. Diese bilden eine Untergruppe mit dem Sequenzmotiv WCDAS, zu der auch das hier in dieser Arbeit näher untersuchte AtGRXS17 gehört. Die ursprünglicheren Organismen wie die Grünalgen (Chlorophyta)

Ostreococcus tauri, *Ostreococcus lucimarinus* und *Chlamydomonas reinhardtii* haben eine Domänen-Zusammensetzung aus N-terminalen Trx-HD und zwei C-terminalen Monothiol-Grx-HD (Abb. 7), die auch für nicht photosynthetisch aktive mehrzellige Organismen typisch ist (COUTURIER ET AL., 2009; ALVES ET AL., 2009). Der modulare Aufbau der GRXS17 von *Physcomitrella patens* (Bryophyta) entspricht dem der ursprünglicheren Variante mit einer Trx-HD und zwei Grx-HD. Das Genom von *P. patens* bildet mit seinen drei homologen Varianten des grxs17-Gens eine Ausnahme. Für die höheren Pflanzen konnten für alle untersuchten GRXS17 neben der Trx-HD drei Grx-HD identifiziert werden. Die dritte Grx-HD ist im Laufe der Evolution durch die Duplikation einer der beiden vorhandenen Grx-HD-Sequenzen entstanden. Alle drei Sequenzen der Grx-HD weisen jeweils untereinander eine Identität von 62 % bis zu 68 % auf. Somit sind diese Grx-HD zueinander ähnlicher als zu anderen Monothiol-Grx mit denen die einzelnen Grx-HD bis zu 54 % identisch sind (AtGrxS14). Um die Grx-HD zu identifizieren, die in den höheren Pflanzen dupliziert wurde, und um festzustellen aus welcher der ursprünglichen Grx-HD diese hervorgegangen ist, wurden die Grx-HD der untersuchten Organismen (s.o.) einzeln miteinander verglichen. Dazu wurden mit den 81 Grx-HD (Grx-HD I, Grx-HD II & Grx-HD III) der 29 GrxS17-Proteine ein *Alignment* durchgeführt. Aus den gewonnenen Daten wurde der in Abb. 10 abgebildete Stammbaum generiert (vgl. 2.5.1). In diesem Stammbaum bilden die Grx-HD-Sequenzen I & II der Chlorophyta jeweils eine eigene Gruppe, deren Grx-HD-Sequenzen zueinander ähnlicher sind als zu denen der anderen Grünalgen oder höheren Pflanzen. Die Bryophyta mit ihrem ursprünglichen Aufbau des GRXS17 aus einer Trx-HD und zwei Grx-HD gruppieren sich mit ihrer Grx-HD I zu denen der Grx-HD I der höheren Pflanzen, sodass davon auszugehen ist, dass die Grx-HD I nicht in ihrer Position verschoben wurde. Die Grx-HD II der Bryophyta dagegen gruppieren sich zu den Grx-HD III der höheren Pflanzen. Hieraus wird deutlich, dass die Insertion der Genduplikation zwischen den Sequenzen der Grx-HD I und Grx-HD III die wahrscheinlichste Variante ist. Aus welcher der vorhandenen Grx-HD (I/III) die Grx-HD II der höheren Pflanzen hervorgegangen ist, ist anhand der analysierten Sequenzen nicht abschließend zu klären, da Grx-HD II sowohl zur aus Grx-HD I als auch der aus Grx-HD III gebildeten Gruppe einen ähnlich weit entfernten Abstand aufweist (Abb. 10).

Das GRXS17 kommt in den Genomen der höheren Pflanzen jeweils nur einmal vor. Alle untersuchten GRXS17-Proteine sind auf Ebene der Aminosäuren hoch konserviert. In den höheren Pflanzen ist eine zusätzliche Grx-HD typisch, die zwischen den beiden

ursprünglicheren Grx-HD durch Domänenduplikation inseriert wurde. Um Prozesse, die die Transkription der mRNA von *AtGRXS17* regulieren, zu untersuchen, werden im nächsten Abschnitt die Elemente der *atgrxs17*-Promotorsequenz näher betrachtet.

3.1.2 Promotoranalysen von *AtGRXS17*

Die Initiierung der Transkription ist über ein komplexes kombinatorisches System aus Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich geregelt. Die Position der RNA-Polymerase wird durch die an den Promotorbereich gebundenen Transkriptionsfaktoren beeinflusst und de- bzw. stabilisiert. Je vorteilhafter die Position der Polymerase ist, desto schneller kommt es zur Initiierung der mRNA-Synthese. Dies ermöglicht eine höhere Wechselzahl der Polymerasen, sodass es zu einer größeren Menge an mRNA kommt. Verschiedene Klassen von Transkriptionsfaktoren sind bisher beschrieben, die sowohl der Transkription förderlich sind als auch eine inhibitorische Funktionen haben können. Durch die Komposition von verschiedenen Bindestellen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren ergibt sich eine große Anzahl an spezifischen (fein)-regulatorisch wirkenden Möglichkeiten zur Anpassung der Transkriptmenge. Um die Kombination von Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich von *AtGRXS17* zu ermitteln, wurde mittels der Internet-Applikation *AthaMap* (http://www.athamap.de/search_gene.php) (BULOW *ET AL.*, 2010) die Sequenz des Promotorbereichs des *tGRXS17*-Gens mit bekannten Binderegionen abgeglichen. Für die Promotorsequenz wurde die Distanz von -1350 bp bis +50 bp ausgehend vom Startcodon des *tGRXS17*-Gens bis zum Beginn des UTRs des in der gleichen Richtung orientierten Folgens (At4g04953) gewählt. Hierbei sind neben den Bindestellen für klassische Transkriptionsfaktoren auch für den Promotorbereich untypische Bindestellen für kleine RNA-Fragmente identifiziert worden. Die identifizierten Bindestellen für die dort potentiell bindenden Transkriptionsfaktoren bzw. kleinen RNAs sowie deren Trivialnamen und deren Zugehörigkeit zu Transkriptionsfaktor-Familien sind in Tabelle 32 zusammengestellt. Neben der Anzahl der Bindestellen ist die Relation zum durchschnittlichen Vorkommen im *A. thaliana*-Genom bezogen auf die gewählte Basenpaarstrecke angegeben. Auffällig ist die überdurchschnittlich hohe Anzahl an Bindestellen für kleine RNAs mit insgesamt neun verschiedenen *small*-RNAs und miRNAs, die an 258 Sequenzabschnitten in der Promotorregion von *tGRXS17* potentiell binden können. Dies entspricht einer sechsfach

höheren Bindekapazität für kleine RNAs im Promotorbereich von *tGRXS17* gegenüber der durchschnittlichen Verteilung im Genom von *A. thaliana*. Die vergleichsweise selten

Tabelle 32 Bioinformatisch ermittelte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren und verschiedene kleine RNAs. Neben dem Trivialnamen sind die Zugehörigkeit der Transkriptionsfaktoren zu den entsprechenden Familien sowie die Anzahl der Bindestellen im Promotorbereich des *AtGRXS17* und die errechnete Anzahl der potentiellen Bindestellen im Genom von *A. thaliana* und deren Quotient angegeben.

Trivialname	Familie	Anzahl der Bindestellen (1*)	Theor. Anz. der Bindestellen im <i>A. thaliana</i> Genom (2*)	Verhältnis (1*/2*)
MIR408	MIR408	1	0,0028	356,69
HY5	bZIP	2	0,04	47,15
smallRNA(i2)	small RNAs	58	2,93	19,76
STF1	bZIP	2	0,16	12,48
smallRNA(i)	small RNAs	46	4,19	10,97
smallRNA(fl3)	small RNAs	47	5,89	7,98
smallRNA(l2)	small RNAs	4	0,62	6,44
CDC5	MYB	1	0,2	5,03
smallRNA(si3)	small RNAs	32	8,09	3,95
TaNAC69(2)	NAC	2	0,53	3,77
smallRNA(le3)	small RNAs	19	5,28	3,6
O2	bZIP	10	2,99	3,35
AtSPL8	SBP	6	2,52	2,38
TSS	- other	1	0,43	2,35
AtSPL3	SBP	3	1,28	2,34
TGA1	bZIP	2	0,92	2,17
HOX2a_HOX2a	- other	6	3,04	1,97
HAHB4	HD-ZIP	3	1,56	1,92
MADS_MADS	- other	1	0,53	1,88
AGL15	MADS	8	4,52	1,77
smallRNA(se3)	small RNAs	8	5,72	1,4
GT1	Trihelix	32	24,76	1,29
TGA1a	bZIP	3	2,44	1,23
ZmHOX2a(1)	HD-HOX	16	12,99	1,23
smallRNA(s)	small RNAs	3	2,74	1,09
AGP1	GATA	2	1,86	1,07

auftretende Bindestelle für die miRNA miR400 erzielt einen besonders hohen Wert. Neben den Binderegionen für kleine RNAs sind 147 potentielle Bindestellen für 17 verschiedene Transkriptionsfaktoren vorhanden, die jeweils zu einem der sieben verschiedenen Transkriptionsfaktor-Familien der bZIP, MYB, NAC, SBC, MADS, HD-HOX

und GATA gehören. Die Auswirkungen dieser Kombination an Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Promotorbereich von *tGRXS17* wurden in weiteren Analysen anhand von Array-Datenbanken miteinander verglichen. Statistisch gesehen kommt diese Bindestelle nur 0,0028 Mal pro 1400 bp vor. Die Bindestellen für die *small RNA (i2)*, *small RNA (i)*, *small RNA (fl3)*, *small RNA (l2)* sind mit einzelnen stark erhöhten Raten von bis zum 20-fachen der durchschnittlichen Bindestellen im *Arabidopsis*-Genom nachzuweisen.

3.1.3 *In silico*-Transkriptmengenanalysen

Die Mikroarray-Technologie hat die Analyse der simultan vorhandenen Gesamt-Transkriptmengen revolutioniert. Die bisher von vielen verschiedenen Arbeitsgruppen erzeugten Daten wurden in Bibliotheken zusammengefasst, aus denen Transkriptionsprofile extrahiert oder co-regulierte Transkriptmengen für verschiedene Gene und/oder Versuchsansätze *geclustert* werden können.

In dieser Arbeit wurden drei Array-Datenbanken verwendet um Erkenntnisse hinsichtlich der Transkriptmengen von *tGRXS17* unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen, in verschiedenen Geweben und unter wechselnden abiotischen Bedingungen zu erhalten. Dazu wurden die Daten für das *tGRXS17*-Transkript aus den drei verschiedenen Datenbanken extrahiert. Die Internetseite des Max Planck Instituts in Tübingen (www.weigelworld.org) und die der Universität von Toronto (www.bar.utoronto.ca) sind frei zugänglich. Die Datenbank *Genevestigator* (www.genevestigator.com) wurde in der kostenlosen Basis-Version genutzt. Aus der Datenbank *Weigelworld* konnten 396 Array-Datensätze für das Gen *tGRXS17* extrahiert werden. Die in der Abb. 11 A dargestellten Datensätze sind gegen die durchschnittlichen Transkripthöhen aller sich auf dem Array-Chip befindlichen Gene normalisiert. Von diesem durchschnittlichen Wert weicht die Transkriptmenge des *tGRXS17* in drei Fällen signifikant ab (Abb. 11 B). Diese Abweichungen sind jedoch auf die Verwendung von *GA1-3-knock-out*-Pflanzen (KOORNNEEF & VAN DER VEEN; 1980) (1), auf die Verwendung von Samen (2) oder von

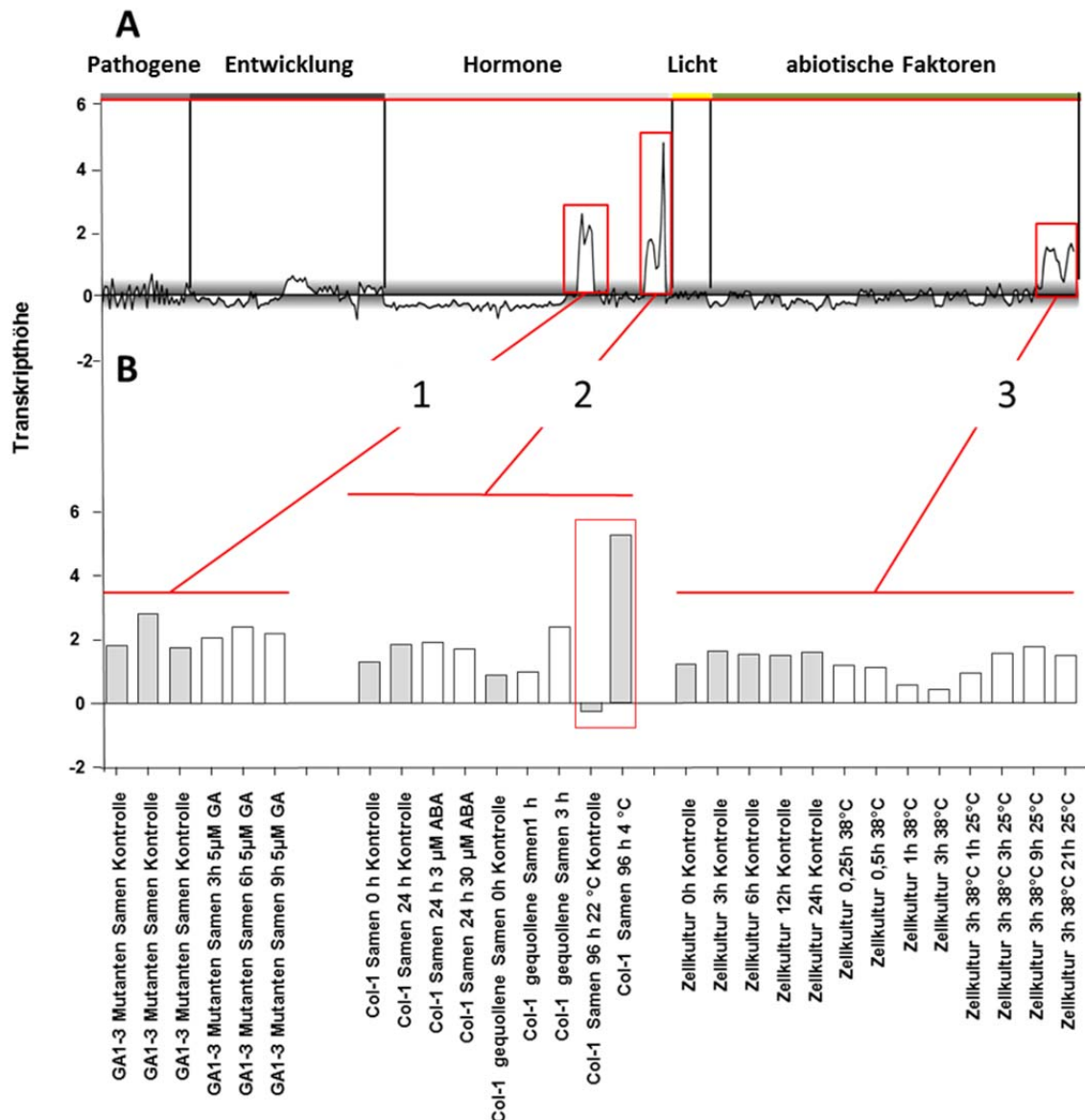


Abb. 11: Plot von aus 396 Arrays ermittelten Transkriptmengen von *atgrxs17* der Datenbank *Weigel World* (A). Null bedeutet, dass die Transkriptmenge sich nicht vom Durchschnitt aller anderen auf dem Array-Chip befindlichen Transkriptmengen unterscheidet. Abweichungen von +/- 1 ergeben eine Verdopplung bzw. Halbierung der Transkriptmenge von *atgrxs17*. Die Daten wurden anhand der für die Arrays angegebenen Versuchsbedingungen sortiert: Pathogene, Entwicklung, Hormone, Licht und weitere abiotische Faktoren. Transkriptmengen, die um mehr als eine Größenordnung von der durchschnittlichen Transkriptmenge abweichen, wurden genauer untersucht (B 1, 2 & 3).

Zellkulturen (3) als Ausgangsmaterial zurückzuführen oder methodisch bedingt erhöht, da auch die entsprechenden Kontrollen um dasselbe Maß erhöht sind. Dementsprechend können die erhöhten Transkriptmengen nicht auf die gewählten Versuchsbedingungen Gibberellinsäure (1), Abscisinsäure (2) oder Temperaturerhöhung (3) zurückzuführen sein. Die einzige signifikante Abweichung ergibt sich für den Wert bei Samen die 96 Stunden lang bei 4 °C inkubiert wurden (2, roter Kasten), der jedoch aus einem Einzelexperiment

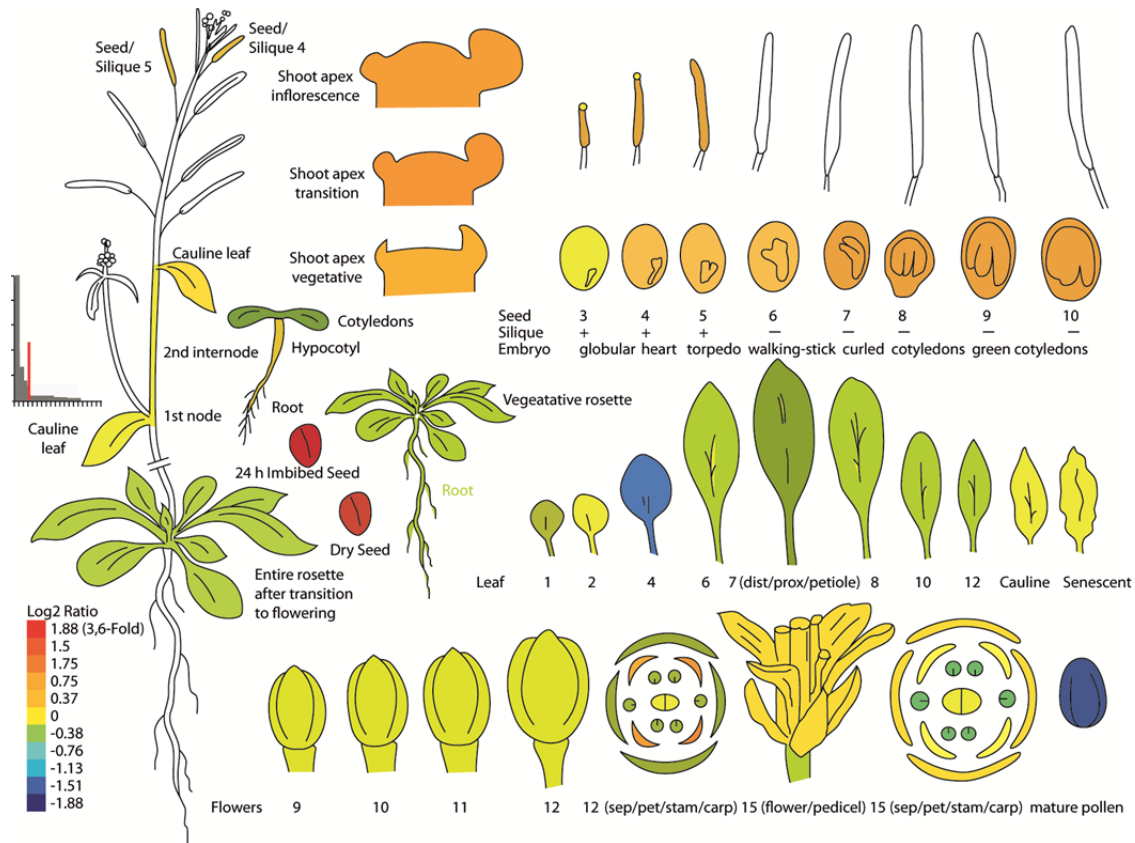


Abb. 12: Darstellung der durch Array-Analysen ermittelten gewebespezifischen Transkriptmengen des *atgrxs17*-Gens der Datenbank *The Bio-Array Resource for Plant Biology* (BAR; <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) in verschiedenen Entwicklungsstadien. Normalisiert wurden die hier dargestellten Transkriptmengen gegen jeweils den Durchschnitt der auf dem Array Chip ermittelten Gesamt-Transkriptmengen aller Gene. Vergleichsweise hohe Transkriptmengen sind rot, niedrige blau und neutrale gelb eingefärbt.

stammt und methodisch besser abgesichert werden müsste. In der Datenbank *The Bio-Array Resource for Plant Biology* (BAR; <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) kann ebenfalls die Verteilung und Menge von Transkripten ermittelt werden. Das Besondere an dieser Datenbank ist die gewebespezifisch visualisierte Zuordnung der Transkripte, die einen präziseren Eindruck der Verteilung von Transkriptmengen im Gewebe liefert (YADAV ET AL., 2009). Wie schon in der vorherigen Analyse wurde der Abgleich gegen die durchschnittliche Transkriptmenge aller auf dem Array befindlichen Gene normalisiert. Stark erhöhte *tGRXS17*-Transkriptmengen konnten bei trockenen und gequollenen Samen detektiert werden. Eine verstärkte Transkription ist in verschiedenen Stadien der meristematischen Zellverbände des Apex, in den Schoten und den sich entwickelnden Samen zu verzeichnen. In sich entwickelnden Pollen und im vierten Blattpaar der Arabidopsis-Pflanzen ist *tGRXS17* vergleichsweise gering transkribiert. Alle anderen untersuchten Gewebe weisen keine signifikanten Abweichungen zu den

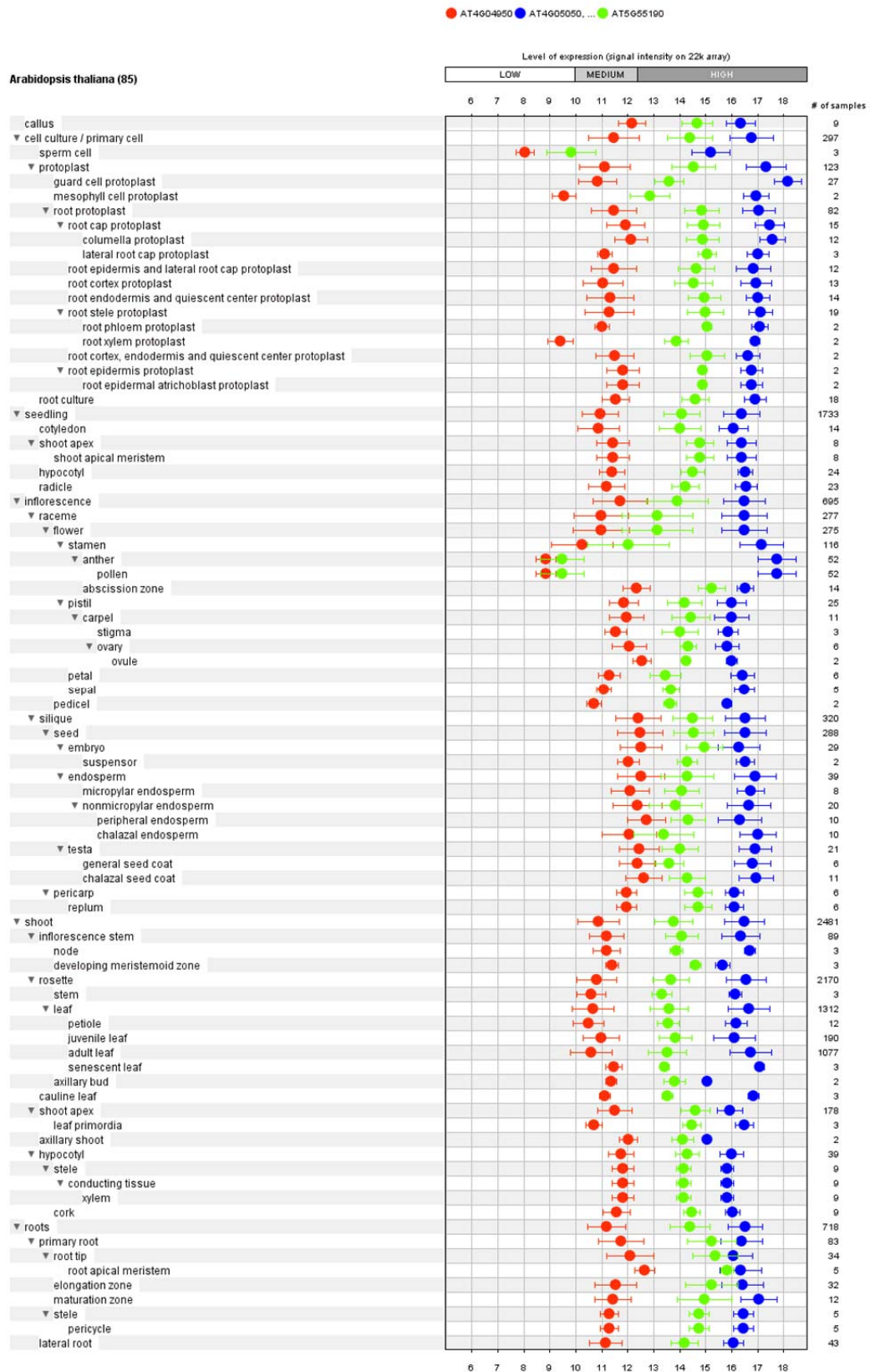


Abb. 13: Vergleich von Transkriptmengen mittels der Genevestigator-Datenbank. Mittels der Genevestigator-Datenbank wurden die Transkriptmengen von *AtGRXS17* (rot) mit dem *Ras-related nuclear protein 3* (*ran3*; *At5g55190*; grün) und Ubiquitin 11 (*ubq11*; *At4g05050*; blau) in verschiedenen Geweben verglichen. Auffällig ist, dass die Transkriptmengen von *atgrxs17* in allen Geweben auf einem stabilen niedrigen Niveau vorliegen. Auftretende Schwankungen sind vergleichbar mit denen der *house-keeping*-Gene-Transkriptmengen von *ran3* und *ubq11*.

durchschnittlichen Transkriptmengen aller Gene auf. Die Genevestigator-Datenbank (www.genevestigator.com) beinhaltet ein Arraydaten-Repertoire von mehr als 7000 verschiedenen Array-Experimenten. In dieser Arbeit wurde die kostenfreie Version der Webseite verwendet. Eine Normalisierung der Daten erfolgte in dieser Version nicht. Es wurden daher die in relativen Einheiten gemessenen Rohdaten der Transkripthöhen für das *tGRXS17* verwendet. Im direkten Vergleich der *tGRXS17*-Transkriptmengen mit den als „housekeeping“-Genen bekannten *UBIQUITIN 11* (*UBQ 11*; At4g05050) und *ras-RELATED NUCLEAR PROTEIN 3* (*RAN3*; At5g55190) ist die Transkriptmenge von *AtGRXS17* in allen 7180 Array-Daten ähnlich konstant. In Abb. 13 ist ein repräsentativer Plot der Transkriptmengen in verschiedenen *A. thaliana*-Gewebe für die drei untersuchten Gene logarithmisch aufgetragen. Die Transkriptmenge des *AtGRXS17* ist diesen Daten zufolge wie ein auf geringem Niveau transkribiertes housekeeping-Gen reguliert.

Die bioinformatischen Analysen der Datenbank *Waigel-World* und *Genevestigator* ergeben für das *AtGRXS17* ein einheitliches, konstantes Bild von einem auf niedrigem Niveau, aber kontinuierlich gebildeten Transkript. Widersprüchliche Transkriptmengen ergaben sich aus den Daten der BAR-Datenbank für gequollene Samen. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass diese Werte durch die Normalisierungen gegen die Gesamt-Transkriptmengen stammen könnten. Da die Rohdaten auf der BAR-Internetseite nicht zugänglich sind, wurde die Transkriptmenge dieser Gewebe in einem anderen Versuchsansatz mittels quantitativer-Real-Time PCR (qRT-PCR) zusammen mit weiterem *A. thaliana* Geweben näher untersucht.

3.2 Molekularbiologische Analysen von *AtGRXS17*

3.2.1 Transkriptmengenanalyse von *AtGRXS17*-mRNA mittels qRT-PCR

Die qRT-PCR ermöglicht es, eine quantitative Bestimmung von Transkriptmengen für unterschiedliche Gewebeproben durchzuführen. Ein quantitativer Nachweis erfolgt durch den Abgleich der Signale der Proben gegen Signale aus Kontrollreaktionen, bei denen die eingesetzte *template*-Menge bekannt ist (vgl. 2.3.20). In dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um die bioinformatisch gewonnenen Informationen zu den *AtGRXS17*-Transkriptmengen (vgl. 3.1.3) mit den Transkriptmengen der in dieser Arbeit eingesetzten Pflanzen zu vergleichen. Ein weiterer Aspekt war die Bestimmung der Transkriptmengen von WT-Pflanzen, die parallel zu *AtGRXS17* T-DNA-Insertions-*knock-out*-Pflanzen im LT angezogen wurden. Diese bilden unter diesen Bedingungen einen spezifischen Phänotyp aus (vgl. 3.5). Außerdem sollten die *AtGRXS17*-Transkriptmengen in gequollenen Samen bestimmt werden. Alle Transkriptmengen, die mittels qRT-PCR für *AtGRXS17* in WT *A. thaliana*-Pflanzen ermittelt werden konnten, sind vergleichbar mit den in den Array-Datenbanken vorhandenen Daten und auf einem sehr niedrigen Niveau angesiedelt. Die Transkriptmengen von *AtGRXS17* in Schoten, Blüten, Wurzeln, Blättern und für 24 Stunden in Wasser gequollenen Samen sind insgesamt sehr niedrig. Auch die für diese Untersuchungen gewählte „house keeping“-Gen-Kontrolle *UBIQUITIN 11* (*UBQ 11*; At4g05050) bleibt verglichen mit den Array-Daten (Abb. 13) in einem für dieses Gen typischen Bereich. Für *UBQ 11* konnten in den verschiedenen Geweben ca. hundert Mal mehr Transkripte als für *AtGRXS17* ermittelt werden. Für die in Wasser gequollenen Samen ist jedoch deutlich weniger Transkript von *UBQ 11* nachweisbar, während *AtGRXS17* auf einem für das *AtGRXS17* typischem Niveau bleibt (Abb. 14, roter Kasten). Dies bestätigt die Vermutung, dass die Gesamt-Transkriptmenge in gequollenen Samen niedriger ist als in anderen Geweben und so das *AtGRXS17*-Transkript im Verhältnis höher erscheint. WT-Pflanzen, die unter den Bedingungen angezogen werden, unter denen die T-DNA-Insertions-*knock-out*-Pflanzen einen spezifischen Phänotyp ausbilden, haben keine veränderten *AtGRXS17*-Transkriptmengen.

Die Transkriptmengen von *AtGRXS17* sind auch in den qRT-PCR Analysen von WT-Pflanzen konstant auf einem sehr niedrigen Niveau nachweisbar. Es konnte in keinem der untersuchten Gewebe oder unter veränderter Lichtperiode ein deutlicher Anstieg der Transkriptmenge verzeichnet werden. Diese Daten decken sich mit dem aus den Array-

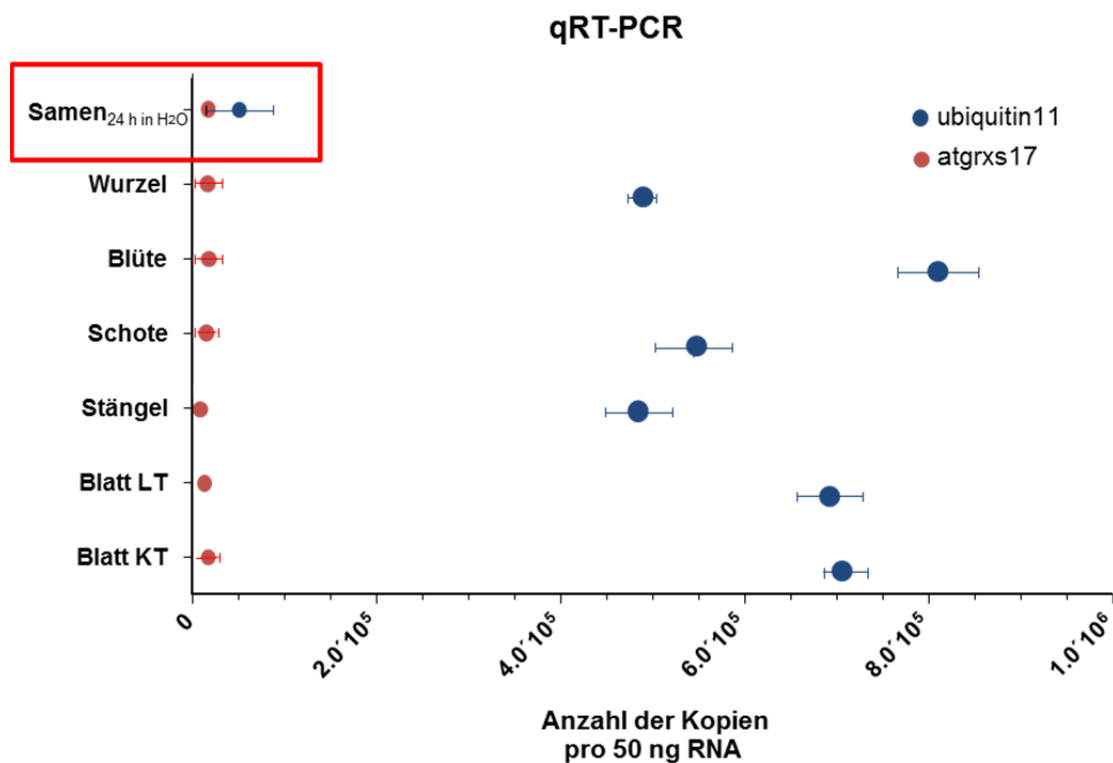


Abb. 14: Durch quantitative-Real-Time PCR (qRT-PCR) ermittelte Transkriptmengen aus verschiedenem *A. thaliana* WT-Gewebe. Aufgetragen ist die ermittelte Anzahl der Transkripte des AtGRXS17- und des *housekeeping*-Gens UBIQUITIN 11 (*UBQ 11*; At4g05050) aus 50 ng RNA. Alle ermittelten Transkriptmengen, bis auf die für das Ubq 11 in gequollenen Samen (roter Kasten), bewegen sich in den für die Gene typischen Größenordnungen.

Daten gewonnenen Gesamtbild. Um die Aktivität des *atgrxs17*-Promotors in Pflanzengewebe zu untersuchen, wurde der *AtGRXS17*-Promotor mit dem β -GLUCURONIDASE-Reportergen (*GUSb*; früher *UIDa*) fusioniert und stabil in *A. thaliana* WT-Pflanzen transformiert, um diese mittels Färbereaktion zu analysieren (3.2.2).

3.2.2 Herstellung und Untersuchung von *grxs17*_(prom)::*GUS* Pflanzen

Zur Analyse der gewebespezifischen Transkription von *AtGRXS17* wurde die Aktivität des *atgrxs17*-Promotors (*atgrxs17*_{prom}) *in vivo* untersucht. Hierfür wurde der *atgrxs17*-Promotor mit dem Reportergen der β -GLUCURONIDASE (*GUSb*) des pGPTV-Vektors fusioniert (Abb. 15 A). Durch Agrobakterium vermittelte Transformation der T-DNA des *atgrxs17*_{prom}::*gusb*-pGPTV-Vektors konnte der Fusionsbereich stabil in *A. thaliana*-Pflanzen transformiert werden (vgl. 2.3.6). Die Enzymaktivität der β -GLUCURONIDASE und damit der Ort der Promotoraktivität, wird in den entsprechenden Geweben durch die

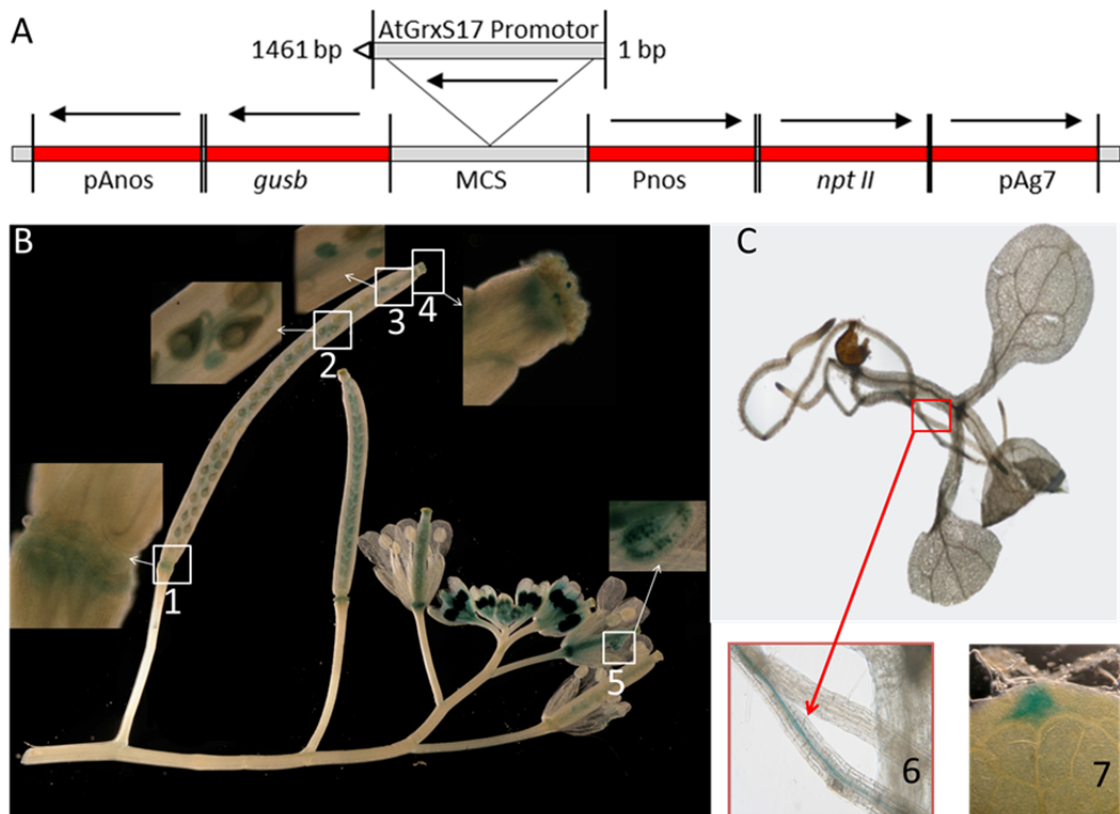


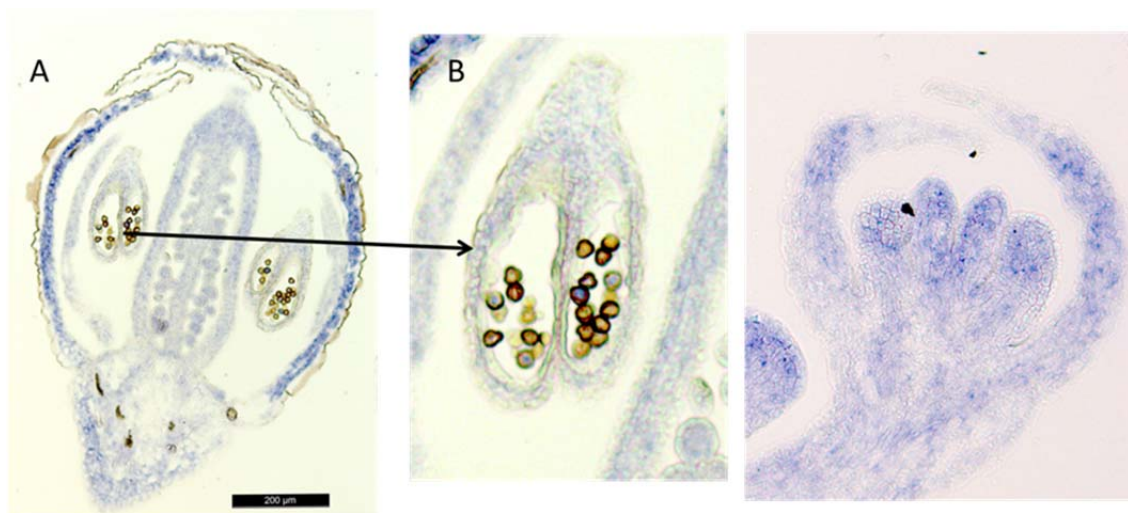
Abb. 15: Nachweis von der Enzymaktivität der β -Glucuronidase in verschiedenen Pflanzengeweben von stabil transformierten WT-Pflanzen unter der Kontrolle des *atgrxs17*-Promotors (*atgrxs17_{prom}*). (A) Schematischer Aufbau des stabil in WT-Pflanzen transformierten Konstrukts, bestehend aus *atgrxs17_{prom}* mit fusioniertem *gusb*-Gen und verschiedenen für die T-DNA-Insertion und Selektion in Pflanzen wichtigen Bereichen der MCS des pGPTV-BAR Vektors. (B) Vollständiger Blütenstand mit durch die β -Glucuronidaseaktivität (Farbreaktion) nachgewiesener *atgrxs17*-Promotoraktivität (B 1) Farbreaktion an dem Abszission-Bereich der Schoten. (B 2 u 3) Deutliche Farbreaktion in sich entwickelnden und abgestorbenen Samenanlagen. (B 4) Ausgekeimte Pollen auf der Narbe. (B 5) Färbung der reifen Pollen. (C 6) Keimling mit deutlicher Farbreaktion im oberen Teil der Wurzel. Weiterhin wurde die Promotoraktivität in den Hydathoden der Blätter (C 7) nachgewiesen.

Umsetzung von X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure) in das violette 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl sichtbar. Die stärkste Aktivität des *atgrxs17_{prom}* ist in verschiedenen Stadien von sich entwickelnden Pollen zu verzeichnen, die die Stamina blau erscheinen lassen. Mit fortschreitender Reifung nimmt diese Färbung zu, bis die reifen Pollen die Staubgefäße verlassen (Abb. 15 B). Ausgekeimte gefärbte Pollen sind auf den Stigmata der Blüten nachweisbar (Abb. 15 B 4). In Schoten befindliche undifferenzierte Samen (Abb. 15 B 2) sowie verkümmerte Samenanlagen (Abb. 15 B 3) als auch eine Zone im Abszission-Bereich der differenzierten Schoten (Abb. 15 B 1) besitzen erhöhte signifikante Promotoraktivitäten. Ebenso ist in den Hydathoden der Blätter (Abb. 15 C 7) und im oberen Abschnitt der Hauptwurzel (Abb. 15 C 6) eine deutliche Promotoraktivität vorhanden. Die Promotoraktivität ist in den untersuchten Geweben auf mehrere kleine Bereiche begrenzt. Großflächige oder gleichmäßig verteilte Bereiche mit

Promotoraktivität konnten in diesen Experimenten nicht nachgewiesen werden. Veränderungen der Lichtperiode oder Lichtintensitäten konnten die detektierte Promotoraktivität nicht steigern (Daten nicht gezeigt). Da in diesem Versuchsansatz die Promotoraktivität durch die Aktivität der β -Glucuronidase und nicht die tatsächliche Verteilung des *AtGRXS17*-Transkripts detektiert wird, wurde eine weitere Analyse mittels *in situ*-Hybridisierung (ISH) vorgenommen.

3.2.3 *In situ*-Hybridisierungs (ISH)-Analysen von *AtGRXS17*-mRNA

Die *in situ*-Hybridisierung (ISH) ermöglicht es, geringe Transkriptmengen und deren räumliche Verteilung mittels markierter *antisense*-RNA-Sonden in Gewebeschnitten nachzuweisen (vgl. 2.3.26). Für diese Untersuchungen wurde Blütenmaterial gewählt, da neben der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen erhöhten Promotoraktivität in den Blütenpollen, bei phänotypischen Untersuchungen an *AtGRXS17* T-DNA-Insertion-*knock-out*-Pflanzen Defekte in der Blütendifferenzierung ermittelt worden waren (vgl. 3.5.2). Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung von Mitarbeitern (Nora Gutsche) der Abteilung Botanik (Universität Osnabrück) durchgeführt. In den untersuchten Blütenorganen ergaben sich für das Transkript des *AtGRXS17*-Gens reproduzierbare



Sepalen	++++	Karpelle	++	Samenanlage	++
Petalen	++	Primordium	++	reifende Mikrospore	++
Stamina	++	Konnektiv	+	Mikrospore	+++

Abb. 16: *In situ*-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis von *AtGRXS17*-mRNA in *A. thaliana*-Blütengewebe. In der Tabelle unter der Abbildung sind die Ergebnisse der ISH für das *AtGRXS17* aus weiteren Versuchen gemittelt. Es ergab sich ein für das *AtGRXS17* typisches Verteilungsmuster. Die Symbole stehen für wenig + bis ++++ für eine besonders starke Detektion.

Färbemuster (Abb. 16). Die Ergebnisse sind für je drei unabhängige Hybridisierungen unter der Abb. 16 zusammengefasst. Bei jeder Untersuchung wurden jeweils vier bis sechs Schnitte eines Blütenstandes untersucht. In einem Blütenstand befanden sich Blüten in verschiedenen Stadien, sodass diese simultan untersucht werden konnten. Die ISH ergab für die untersuchten Gewebe ein weitestgehend einheitliches Transkriptmuster. Bewertet wurden die Intensität der Färbung mit + für eine leichte, bis ++++ für eine starke Färbung. Das deutlichste Signal an detektiertem Transkript von *AtGRXS17* tritt in den Sepalen auf. Die Signale in undifferenzierten als auch reifen Pollenkörnern (Mikrosporen) sind uneinheitlich. In reifen Mikrosporen kann nur mRNA detektiert werden, wenn diese angeschnitten sind, an intakten Mikrosporen konnte kein Signal detektiert werden. In reifenden Pollen sind entweder durchschnittliche oder vereinzelt sehr starke Färbungen zu beobachten. In den Primordien können Regionen ausgemacht werden, die eine erhöhte Farbreaktion zeigen. Alle weiteren untersuchten Gewebe sind von einer gleichmäßigen Färbung geprägt. Es konnte eine erhöhte Sensitivität der ISH für die Detektion von *AtGRXS17*-mRNA im Vergleich zu den *atgrxs17::gusB*-Analysen nachgewiesen werden. *AtGRXS17*-mRNA ist in allen untersuchten Blütenorganen relativ gleichmäßige nachweisbar. Die erhöhten Signale in den Mikrosporen korrespondieren mit den Ergebnissen der *atgrxs17::gusB*-Analysen. Die Verteilung des AtGRXS17-Proteins auf die Zellkompartimente wurden im Kapitel 3.2.4 anhand von *ATGRXS17-GFP* Vektor-Konstrukten, die transient in Mesophyll-Protoplasten exprimiert wurden, analysiert.

3.2.4 Subzelluläre Lokalisation von AtGRXS17 in transient transformierten Protoplasten

Die zelluläre Lokalisation des putativen zytosolischen AtGRXS17 wurde mittels des *GREEN FLUORESCENT PROTEIN* (GFP) Reportergens *in vivo* experimentell ermittelt. Dazu wurde ein CaMV 35S prom::*ATGRXS17*::pGfp2-Vektor-Konstrukt erstellt und in isolierte Mesophyll-Protoplasten transient transformiert (vgl. 2.3.28). Positiv transformierte Protoplasten emittierten aufgrund der Expression des AtGRXS17-GFP-Konstruktes bei einer Anregung von 395 nm ein spezifisches Signal von 509 nm. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigte eindeutige Signale sowohl im Zytosol als auch im Zellkern (Abb. 17), sodass von der zellulären Lokalisation von AtGRXS17 in diesen beiden Kompartimenten ausgegangen werden kann. Die Lokalisation von AtGRXS17 im Zellkern ist ungewöhnlich. Bei Analysen der Aminosäuresequenz konnte kein

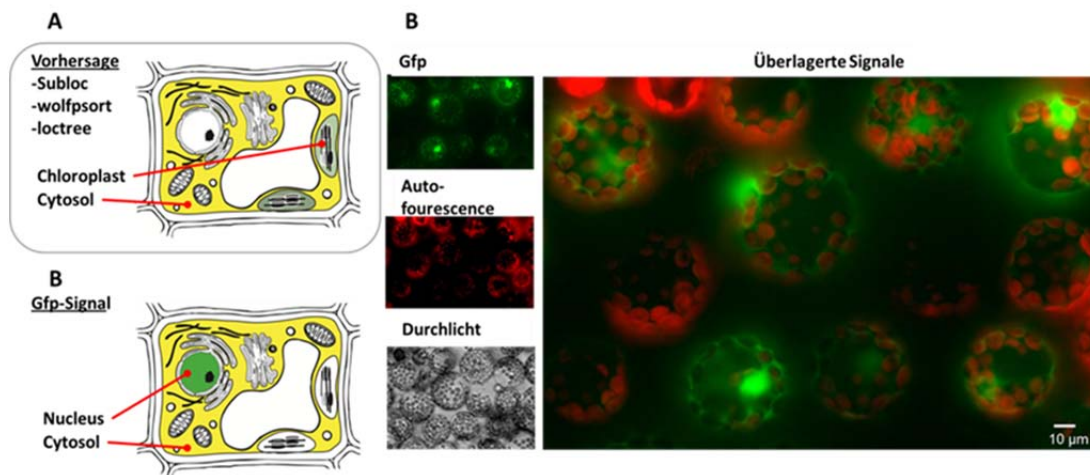


Abb. 17: Vorhersage und Experimente zur Lokalisation von AtGRXS17 in *A. thaliana*. In (A) sind die bioinformatisch mittels *Cell eFP Browser* (www.bar.utoronto.ca/cell_efp/cg-bin/cell_efp.cgi) bestimmten zellularen Lokalisation von AtGRXS17 abgebildet. (B) visualisiert die durch in (C) tatsächlich ermittelte Verteilung von AtGrxS17 in aus *A. thaliana* WT-Pflanzen isolierten und mit dem AtGRXS17-pGfp2-Vektor transient transformierten Mesophyll-Protoplasten. Deutlich zu erkennen sind die fluoreszenzmikroskopisch visualisierten Signale im Zytosol und im Zellkern.

Kernlokalisations-Signal für das AtGRXS17 gefunden werden (Nicht gezeigt). Auch mittels bioinformatischer Vorhersagen wurde das AtGRXS17 aufgrund einer fehlenden NLS und/oder anderer Transitsequenzen im Zytosol und mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit für die Chloroplasten bestimmt (http://bar.utoronto.ca/cell_efp/cg-bin/cell_efp.cgi). Die chloroplastidäre Lokalisation konnte mit diesem Experiment eindeutig widerlegt werden konnte

Neben der NLS-vermittelten Kernporenpassage sind weitere Mechanismen bekannt, mit denen Proteine in den Zellkern gelangen können. Neben der Erzeugung eines Homodimers durch den eine NLS-like Erkennungsstelle generiert werden kann, sind *hitchhiker*-Interaktion mit Proteinen beschrieben, durch deren NLS-Sequenz der Transit in den Zellkern ebenfalls möglich ist. Um diese und weitere Eigenschaften des AtGRXS17 zu charakterisieren, wurden in weiteren Untersuchungen (Kap. 3.3) die biochemischen Eigenschaften des AtGRXS17-Proteins untersucht.

3.3 Charakterisierung der Proteineigenschaften von AtGRXS17

3.3.1 Proteinexpression von AtGRXS17 und Cystein-Austausch-Mutanten

Um proteinchemische Analysen durchführen zu können, wurde heterolog exprimiertes AtGRXS17-Protein hergestellt. Dazu wurde zunächst die Sequenz von cDNA amplifiziert, in den pET16b-Vektor inseriert, im Bakterienstamm *E. coli* BL21 plyS transformiert und exprimiert. Das rekombinante Protein kann aus diesen Zellen mittels zehnfacher Histidin-Sequenzweiterung bis zur vollständigen Homogenität gereinigt werden (vgl. 2.4.2). Um die molekularen Eigenschaften der einzelnen aktiven Zentren der verschiedenen Domänen (Trx-HD und Grx-HD) des AtGRXS17-Proteins näher zu charakterisieren, wurden Cystein-Austausch-Mutanten der einzelnen aktiven Zentren mittels „primer“-basierter Mutagenese generiert (vgl. 2.3.23). Es wurden sowohl AtGRXS17-Mutanten erzeugt, denen je ein Cystein in den aktiven Zentren fehlt (AtGRXS17xC-Typ) als auch AtGRXS17-Mutanten, bei denen nur je ein Cystein in den aktiven Zentren vollständig erhalten ist (AtGRXS17C-Typ). Alle neun für das AtGRXS17-Protein möglichen Kombinationen an Cystein/Serin-Austausch-Mutanten konnten heterolog exprimiert und gereinigt werden. Ein Überblick der erzeugten

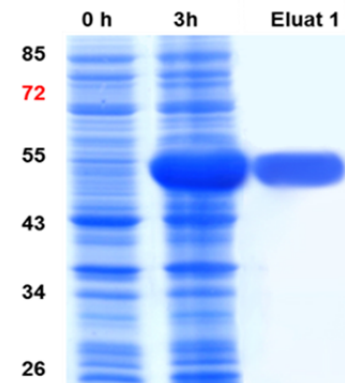


Abb. 18: Exemplarische Abbildung einer SDS-PAGE von verschiedenen Reinigungsschritten des AtGRXS17-Proteins. Die erste Spur gibt den Gesamtproteinextrakt von *E. coli* unmittelbar vor der Induktion mit IPTG zur AtGRXS17 Transkription wieder. Die zweite Spur enthält Gesamtprotein-extrakt der Zellen nach drei weitere Stunden Wachstum. Die dritte Spur enthält das gereinigte Eluat des AtGRXS17-Proteins, das bis zur vollständigen Homogenität gereinigt werden konnte.

Tabelle 33 Übersicht über die erstellten Cystein-Austausch-Mutanten von AtGRXS17. Ein o symbolisiert den ursprünglichen Zustand des Proteins, ein X den Austausch von einem Cystein zu einem Serin. Die Nummern in der obersten Zeile gibt die jeweilige Position des Cysteins im Protein an.

	C33	C179	C309	C416
AtGRXS17	o	o	o	o
AtGRXS17 xC1	X	o	o	o
AtGRXS17 xC2	o	X	o	o
AtGRXS17 xC3	o	o	X	o
AtGRXS17 xC4	o	o	o	X
AtGRXS17 C1	o	X	X	X
AtGRXS17 C2	X	o	X	X
AtGRXS17 C3	X	X	o	X
AtGRXS17 C4	X	X	X	o

Mutanten und der Position der Mutation ist in Tabelle 33 zusammengefasst. Exemplarisch ist in Abb. 18 ein SDS-Gel des Expressions-Erfolgs des AtGRXS17-Proteins gezeigt. Die Sedimente der *E. coli*-Zellen, in denen das AtGRXS17 oder dessen Mutanten exprimiert wurden, weisen mit einer Ausnahme (AtGRXS17C1) alle eine rot-braune Färbung auf, wie sie für [Fe-S]-Cluster beinhaltende Proteine typisch sind. Die Intensität der Färbung nimmt hierbei mit zunehmender Anzahl an eingebauten Mutationen und somit abnehmender Anzahl intakter Grx-Zentren ab. Diese Färbungen verblassen während des Zellaufschlusses zur Proteinfreisetzung innerhalb von fünf bis zehn Minuten. Unter nicht oxidierenden Bedingungen, durch Überschichtung mit dem Edelgas Argon, verläuft dieser Prozess verzögert ab (10-15 Min). Um zu überprüfen, ob es sich bei den Färbungen tatsächlich um [2Fe-2S]-Cluster handelt, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt (vgl. 3.3.2).

3.3.2 Nachweis von Eisen-Schwefel-Clustern [2Fe-2S] in AtGRXS17-Proteinen

Die Einlagerung von [2Fe-2S]-Clustern in verschiedenen Grx als Co-Faktoren wurde bereits in verschiedenen Publikationen für unterschiedliche Organismen dokumentiert (LILLIG *ET AL.*, 2005; ROUHIER *ET AL.*, 2009). Die bei der Protein-Expression des AtGRXS17 auftretende, unter aeroben Bedingungen rasch abnehmende, rot-bräunliche Färbung deutet auf eine Einlagerung von [2Fe-2S]-Clustern hin (vgl. 3.3.1). Es sollte deshalb geklärt werden, ob das AtGRXS17-Protein auch zu dieser [2Fe-2S]-Cluster-bindenden Gruppe der Grx gehört. Dazu wurden, im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Carsten Berndt (Karolinska Institut, Schweden), in die rekombinant exprimierten AtGRXS17-Proteine und den verschiedenen AtGRXS17-Cys/ Ser-Austausch-Mutanten AtGRXS17xC2,

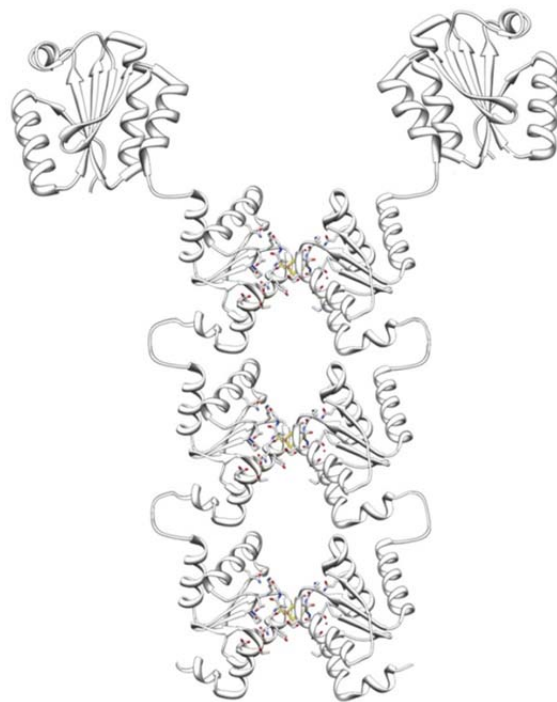
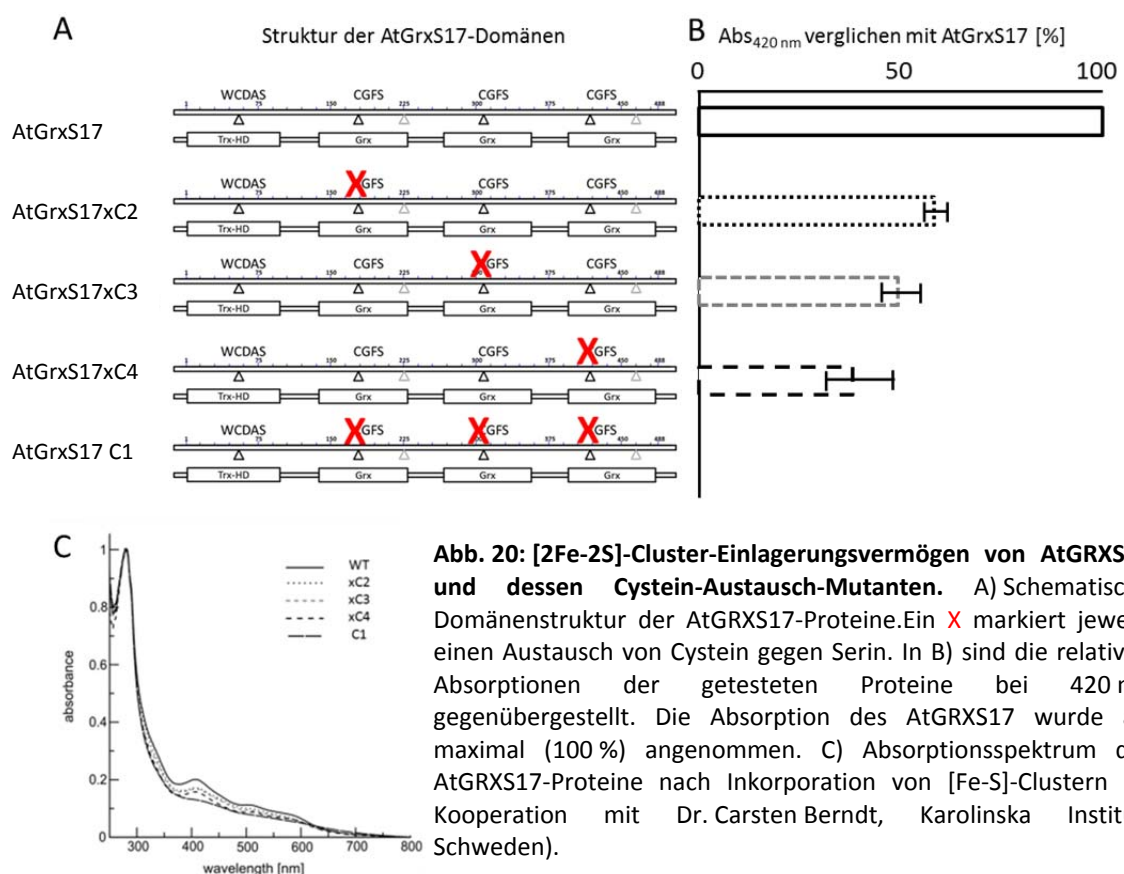


Abb. 19: Modell des AtGRXS17-Protein-Dimers. Hypothetisches Kopf-an-Kopf-Modell von zwei AtGRXS17-Proteinen mit [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung. Dieses Modell wurde aus den Daten des PDB-Eintrags 2E7P des GRXC1 aus Pappel und dem PDB-Eintrag des TRX h aus *A. thaliana* erstellt.

AtGRXS17xC3, AtGRXS17xC4 und AtGRXS17C1, nach der in LILLIG *ET AL.* (2005) beschriebenen Methode Schwefel-Zentren eingelagert. Eine deutliche Zunahme der Absorption bei 420 nm bestätigt die Einlagerung von [2Fe-2S]-Clustern für das AtGRXS17. Für die AtGRXS17-Cystein-Austausch-Mutanten xC2, xC3, xC4 kann eine um ca. ein Drittel geringere Absorption im Vergleich zum WT-Protein und somit ein geringerer Gehalt an [2Fe-2S]-Clustern festgestellt werden. Die Dreifach-GRX-HD-Mutante AtGRXS17C1 besitzt keine erhöhte Absorption bei 420 nm, was auf die Abwesenheit eines [2Fe-2S]-Cluster schließen lässt und sich mit dem bei der Expression beobachteten nicht verfärbten *E. coli*-Zell-Sediment deckt (vgl. 3.3.1). Aus diesen Experimenten ist zu schließen, dass nur die aktiven Zentren der GRX-HD bis zu drei [2Fe-2S]-Cluster einlagern können, während die Trx-HD nicht dazu beiträgt. Auch kann von diesen Experimenten auf die Orientierung des AtGRXS17 geschlossen werden. Bei einer Einlagerung von drei [2Fe-2S]-Clustern müssten die AtGRXS17 unter Beteiligung von sechs GSH erfolgen und Homodimere bilden. Bei einer antiparallelen Orientierung der AtGRXS17 wäre AtGRXS17xC3 die AtGRXS17-Mutante mit der höchsten Absorption, da zwei vollständige [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerungen möglich wären. Da aber alle drei AtGRXS17xC-Mutanten vergleichbare Absorptionen aufweisen, kann von einer Kopf-an-Kopf-Orientierung der AtGRXS17-



Dimere ausgegangen werden. Ob die Dimerisierung des AtGRXS17 durch die [2Fe-2S]-Cluster koordiniert wird, wie es für andere aus nur einer Domäne bestehenden [2Fe-2S]-Cluster-bindenden GRX typisch ist (vgl. 1.1.3), oder ob die AtGRXS17 auch ohne [2Fe-2S]-Cluster als Homodimer vorliegen, sollte in weiteren Versuchsansätzen untersucht werden (vgl. 3.3.3).

3.3.3 Größenbestimmung des rekombinanten AtGRXS17-Proteins

Bei den bisher beschriebenen Grx, die zu einer Einlagerung von [2Fe-2S]-Clustern fähig sind, kommt es zu einer [2Fe-2S]-Cluster abhängigen Dimerisierung der entsprechenden Grx-Monomere. Um festzustellen, in welchem oligomeren Zustand das rekombinant exprimierte AtGRXS17-Protein und dessen Mutante AtGRXS17 C1 vorliegt, wenn keine [2Fe-2S]-Cluster gebunden sind, wurde das AtGRXS17 mittels Größenausschlusschromatographie analysiert. Während der Gelfiltration wurde die Absorption bei 280 nm registriert. Anhand des Elutionsvolumens konnte anschließend auf das Molekulargewicht und somit auf den Aggregatzustand geschlossen werden. Zuvor wurde durch die Aufnahme des Absorptionsspektrums für AtGRXS17 und von dessen Mutante eine Einlagerung von [2Fe-2S]-Cluster ausgeschlossen. Die Positionen der Hauptpeaks entsprechen mit ca. 104 kDa in etwa der errechneten Größe der dimeren Form des AtGRXS17 von 111,2 kDa (<http://expasy.org/tools/protparam.html>). Ein zweiter, kleinerer Peak entspricht ca. 54 kDa und kann so der monomeren Form des AtGRXS17 zugeordnet werden. Aus diesen Daten geht hervor, dass das AtGRXS17 *in vitro* auch ohne [2Fe-2S]-Cluster ein Dimer bilden kann. Dieser Befund sollte mittels *bimolekularer Fluoreszenzkomplementation* (BiFC) *in vivo* bestätigt werden.

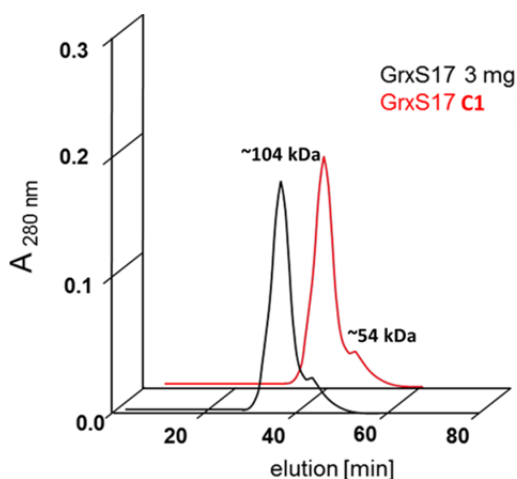


Abb. 21: Gelfiltration von AtGRXS17 und dessen mutierter Variante AtGRXS17 C1.

Je 3 mg der beiden Proteine wurden mit 100 mM DTTred für 30 min reduziert und chromatographisch getrennt. Die Elutionsprofile wurden bei einer Absorption von 280 nm aufgezeichnet. AtGRXS17 C1 hat im Gegensatz zu AtGRXS17 keine Cysteine in seinen Grx-HD und kann deshalb keine [2Fe-2S]-Cluster binden. Beide Proteine eluieren beim doppelten der errechneten Größe von der Säule, was auf eine [2Fe-2S]-Cluster-unabhängige Dimerisierung schließen lässt.

3.3.4 Analyse des dimeren Auftretens des AtGRXS17 *in vivo* mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Zur Analyse, ob das AtGRXS17-Protein auch *in vivo* ein Homodimer bilden kann, wurde die *bimolekulare Fluoreszenzkomplementation* (BiFC) verwendet. Mit dieser Technik lassen sich Protein-Protein-Interaktionen in intakten isolierten Blattprotoplasten nachweisen (WALTER *ET AL.*, 2004; BRACHA-DORI *ET AL.*, 2004; CITOVSKY *ET AL.*, 2006; BHAT *ET AL.*, 2006). Das BiFC-System besteht aus zwei Plasmiden, die entweder für die ersten 155 N-terminalen (pUC-Spyne) oder die letzten 83 C-terminalen (pUC-Spice) Aminosäuren des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP) codieren. In diese Vektoren wurde jeweils ein *AtGRXS17*-Gen vor den Sequenzabschnitt des *yfp*-Gen-Fragments inseriert und unter die Kontrolle des im Vektor vorhandenen 35S-Promotors gestellt (Abb. 22 A). Nach der Transformation und Expression der erstellten Plasmide kann eine Interaktion von mindestens zwei

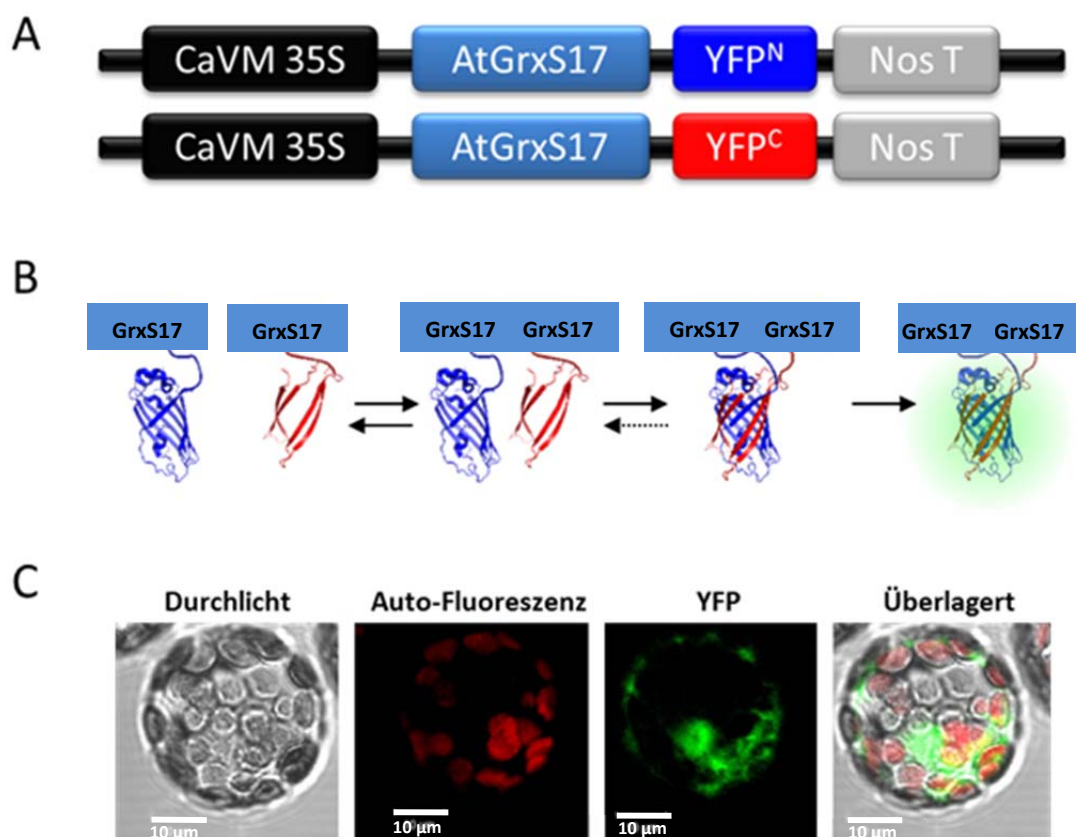


Abb. 22: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC). In A) ist ein schematischer Überblick über die Anordnung in der Multiplen-Cloning-Site der beiden zu transformierenden Vektoren angegeben. B) gibt das Funktionsprinzip der Interaktion wieder (JÄHNCHEN, 2006 modifiziert). In C) ist ein transformierter *A. thaliana* Mesophyll-Protoplast abgebildet. Die verschiedenen Kanäle geben das Durchlichtbild, die Auto-Fluoreszenz, das YFP-Signal der fusionierten Fragmente des YFP-Proteins und ein überlagertes Bild der einzelnen Kanäle wieder. Die Interaktionen der beiden AtGRXS17-Proteine sind sowohl im Zellkern als auch im Zytoplast nachweisbar.

AtGRXS17-Proteinen im Zytosol als auch im Zellkern der Protoplasten fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden (Abb. 22 C). Demnach ist die Bildung von Homodimeren des AtGRXS17 auch *in vivo* möglich. Da der dimere Charakter nicht über die [2Fe-2S]-Cluster koordiniert wird, wird vermutet, dass die Cysteine der AtGRXS17-Homodimere so positioniert sind, dass eine Oxidoreduktase-Aktivität möglich ist. Diese Fähigkeit sollte daher mittels Insulin-Assay näher untersucht werden (vgl. 3.3.5).

3.3.5 Nachweis einer Oxidoreduktase-Aktivität mittels Insulin-Assay

Der Insulin-Assay ist ein klassisches Experiment zur Bestimmung der Oxidoreduktase-Aktivität von Thiol-Disulfid-haltigen Proteinen. Proteine mit Oxidoreduktase-Aktivität katalysieren in diesem Assay die Reduktion der Disulfidbrücken des Insulins durch DTT_{red} , sodass eine Trübung des Ansatzes bei 650 nm photometrisch gemessen werden kann. Die bisher in der Literatur untersuchten Monothiol-Grx ohne C-terminale Sequenzmotiverweiterung besitzen keine Oxidoreduktase-Aktivität im Insulin-Assay. Durch den untypischen Aufbau aus einer Trx-HD- und drei Grx-HD-Domänen und die Bildung von Homodimeren sowie das Vorhandensein der C-terminalen Sequenzerweiterung GxxIGGCD am Ende der dritten Grx-HD ist eine sterische Nähe der aktiven Zentren und somit eine Oxidoreduktase-Aktivität nicht auszuschließen. Es sollte deshalb geklärt werden, wie sich AtGRXS17 in diesem Insulin-Assay verhält. Es wurde rekombinantes AtGRXS17-Protein für den Testansatz verwendet, welches kein [2Fe-2S]-Cluster gebunden hatte. Als Positiv-Kontrolle diente ein Testansatz mit Trx *h* aus Spinat. Als Negativ-Kontrolle wurden zwei Testansätze ohne zu testendes Enzym verwendet, die

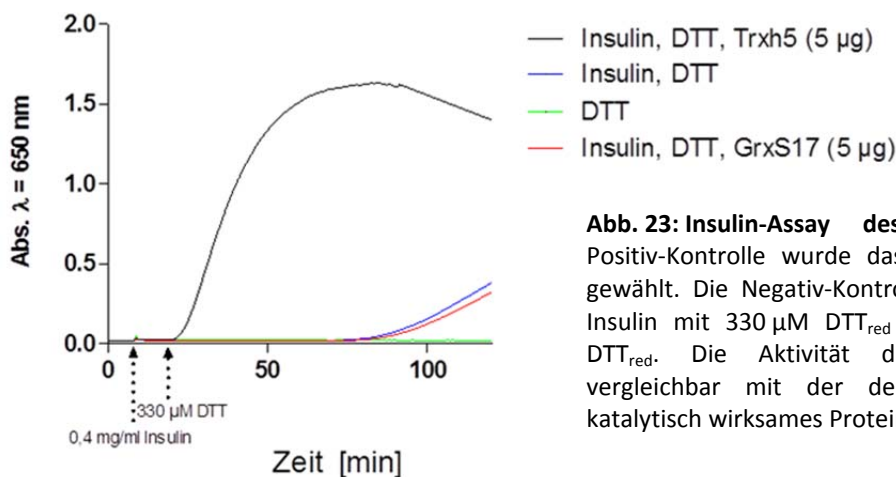


Abb. 23: Insulin-Assay des AtGrxS17. Als Positiv-Kontrolle wurde das Trx *h* aus Spinat gewählt. Die Negativ-Kontrollen bestehen aus Insulin mit 330 μM DTT_{red} oder nur 330 μM DTT_{red} . Die Aktivität des AtGrxS17 ist vergleichbar mit der der Kontrolle ohne katalytisch wirksames Protein.

neben Insulin entweder DTT oder kein DTT enthielten. Da die in Abhängigkeit von der Zeit gemessene Zunahme der Absorption des AtGRXS17-Test-Ansatzes geringer ist als die des Kontrollansatzes (DTT, ohne Trx), kann davon ausgegangen werden, dass auch AtGRXS17 unter den hier verwendeten Bedingungen keine Oxidoreduktase-Aktivität besitzt und somit nicht in der Lage ist, Disulfidbrücken von Zielenzymen zu reduzieren (Abb. 23). Um mögliche andere Funktionen des AtGRXS17 zu ermitteln, wurde in weiteren Versuchen nach Interaktionspartnern von AtGRXS17 gesucht (vgl. 3.4).

3.4 Funktionsanalyse des AtGRXS17

3.4.1 Interaktionsstudien mit dem rekombinanten AtGRXS17

Mittels eines „pull-down Assays“ ist es möglich, Protein-Protein-Interaktionen zu identifizieren. Ziel dieses Versuches war es, Proteine aus einem *A. thaliana*-Blattrohextrakt zu identifizieren, die potentiell mit AtGRXS17 interagieren können. Dazu wurde rekombinant hergestelltes AtGRXS17-Protein an das Säulenmaterial einer Ni²⁺-NTA-Säule über die N-terminale zehnfache-Histidin-Erweiterung des rekombinanten AtGRXS17 immobilisiert und mit pflanzlichem Rohextrakt inkubiert. Durch verschiedene Waschschrte wurden unspezifische Proteine entfernt. Das AtGRXS17 wurde nach den Waschschrten zusammen mit den gebundenen putativen Interaktionspartnern in einem Elutionsschritt (E) mittels des Histidin-Analogons Imidazol von der Ni²⁺-NTA-Säule verdrängt. In den gesammelten Fraktionen wurde die Gesamtproteinmenge bestimmt (Abb. 24, A). Der Ansatz mit gebundenem AtGRXS17-Protein (Test-Ansatz) unterscheidet sich deutlich von dem Kontroll-Ansatz ohne Protein. Bei der anschließenden Analyse der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE kann in den Kontroll-Ansätzen ab der

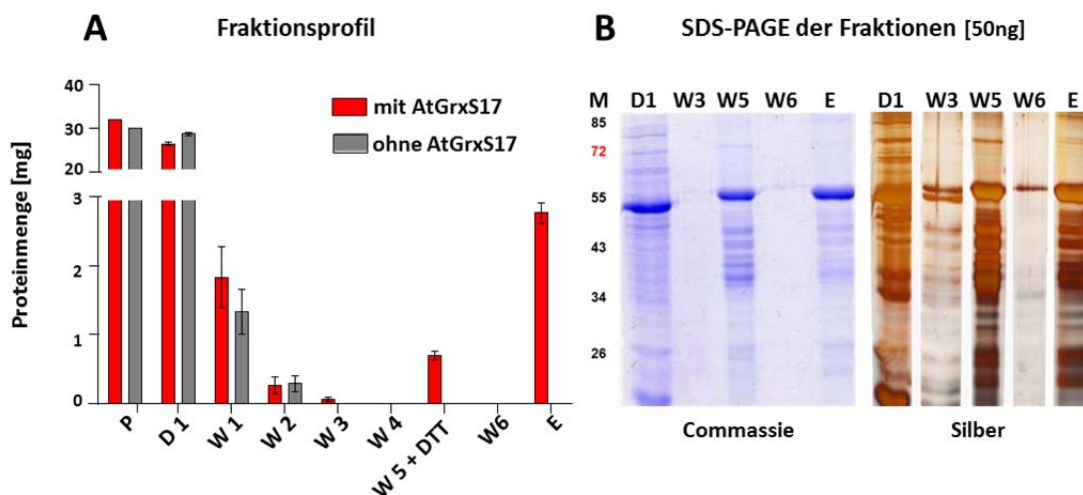


Abb. 24: Interaktionschromatographie an mit Histidinsequenzerweiterung (*His-Tag*) an Ni²⁺-NTA-immobilisiertem AtGrxS17-Protein. Das Diagramm (A) enthält die Gesamtproteinmengen der von der Nickel-NTA gewonnenen einzelnen Fraktionen. Eingesetzt wurden entweder 3 mg AtGrxS17-Protein und 30 mg *A. thaliana* Gesamtproteinextrakt (rot) oder als Kontrolle nur Gesamtproteinextrakt (grau). Die Waschlösungen W1-6 enthielten 20 mM Bicin pH 7,8. In der Fraktion W5 wurden zusätzlich 100 mM DTT_{red} zu der Waschlösung hinzugenommen. Der Waschschr W5 in dem 100 mM DTT enthalten war, sollte ursprünglich zum Aufspalten von Disulfidbrücken zwischen den Interaktionspartnern dienen. Die Fraktion E (Elution) enthielt 50 mM Imidazol. B) SDS-PAGE von mit je 50 ng Proteingemisch der gesammelten Fraktionen. Die Trennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch in 12%igen SDS-Gelen. Das abgebildete Gel wurde zuerst mit einer Coomassie und anschließend einer Silber-Färbung unterzogen. M: Molekulargewichtsmarker; D1: Durchlauf, W: Waschfraktionen von ungebundenen Rohextrakt; E: Elution von GrxS17 zusammen mit aus dem Proteinrohextrakt gebundenen Proteinen.

Waschfraktion W3 kein Protein mehr durch Färben mit Commassie-Brillant-Blue detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In den Fraktion W5 und E der Test-Ansätze kann dagegen eine deutliche Verteilung von Proteinen in unterschiedlichen Größen durch Färben mit Commassie-Briliant-Blue sichtbar gemacht werden. Durch eine anschließende Silber-Färbung der SDS-Gele kann auch in den Waschfraktionen W3 und W6 Proteinbanden sichtbar machen (Abb. 24, B). Je 50 µg des Proteingemisches der Fraktion W5 und der E-Fraktion wurden entnommen und die darin enthaltenen Proteine mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) identifiziert (vgl. 3.4.2).

3.4.2 Identifizierung von Trx-Interaktionspartnern durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Zur Identifizierung der potentiellen Interaktionspartner wurden je 50 µg der Waschfraktion W5 und der eluierten Fraktion E (vgl. 3.4.1) mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometers einer Aminosäuresequenzanalyse unterzogen. Mit dieser Methode kann die Aminosäureabfolge der enthaltenen typisierten Peptide exakt bestimmt werden (vgl. 2.4.9). Die Trennung der Proteine bzw. Peptidfragmente (50 µg) erfolgte mittels hydrophober Interaktionschromatographie und nachgeschalteter Analyse im Massenspektrometer. Die erhaltenen MS/MS-Spektren wurden mit dem Programm *Mascot-Search* (MatrixScience), in dessen Datenbank alle theoretischen nach einer Trypsin-Behandlung entstehenden Peptidfragmente von *A. thaliana* hinterlegt sind, auf Übereinstimmung geprüft.

Zum Ausschluss von möglicherweise falsch positiv identifizierten Interaktionspartnern wurden zwei verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt. Zum einen wurden parallel zu den Bindeversuchen Negativ-Kontrollen durchgeführt, die mittels einer Ni²⁺-NTA-Säule ohne immobilisiertes Protein durchgeführt wurden. In diesem Versuch konnten nach den ersten beiden Waschsritten keine Proteine nachgewiesen werden. Zum anderen wurden in einem weiteren Versuchsansatz Interaktionsstudien mit TRX y1_{C97S} (At1g76760) durchgeführt. Für TRX y1_{C97S} konnte eine eigene charakteristische Zusammenstellung an Interaktionspartnern ermittelt werden, die keine Übereinstimmungen mit dem Interaktionspartner-Profil von AtGRXS17 hat (Daten nicht gezeigt). Die insgesamt 26 identifizierten potentiellen Interaktionspartner für AtGRXS17 konnten durch Abgleich mit der TAIR Datenbank (www.arabidopsis.org) verschiedenen Proteinklassen und Funktionen zugeordnet werden. Die größte Gruppe ergab sich aus fünf Proteinen, die den Kinasen

zugerechnet werden. Die zweitgrößte Gruppe ist an metabolischen Prozessen beteiligt, jedoch gehören die Proteine unterschiedlichen Funktionsgruppen und Stoffwechselwegen an. Neben den Kinasen wurden auch Proteine nachgewiesen, die an regulatorischen Prozessen beteiligt sind, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, an den Entwicklungsprozessen beteiligte Proteine und Proteine mit Chaperon-Funktion. Auch eine Reihe von Proteinen, denen noch keine Funktionen zugeordnet werden konnten, sind in der Tabelle 34 aufgeführt. Sortiert sind die putativ mit AtGRXS17 interagierenden Proteine aufsteigend nach den Agi-Gennummern. Neben dem Trivialnamen sind in dieser Tabelle auch mögliche oder bereits nachgewiesene Funktionen, die Anzahl der Aminosäuren, das errechnete Molekulargewicht, die Anzahl der positiven Identifizierung von in 15 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen sowie der Bereich des ursprünglich in den Einzelversuchen ermittelten *Mascot Scores* und die sich aus den verschiedenen Versuchen errechneten Sequenzabdeckungen angegeben.

Die Auswahlkriterien für weitergehende Versuche ergaben sich in erster Linie aus den errechneten Abdeckungen der massenspektrometrischen Analysen. Aus diesen ging hervor, dass die Kinase At1g50570 mit einer errechneten Sequenzabdeckung von 68 % und der Transkriptionsfaktor NF-YC11 mit 59 % die höchsten Abdeckungen aufweisen. Aufgrund der aus der Literatur bekannten Interaktionen des homologen humanen Grx 3 (WITTE *ET AL.*, 2000) mit einer Calcium-unabhängigen Kinase (PKC θ ; Q04759|KPCT_HUMAN) (vgl.1.1.4.1) wurde die Sequenz der humanen PKC θ mit der in diesen *pull-down*-Versuchen gefundenen Kinasen verglichen. Keine der Kinasen wies eine erhöhte Ähnlichkeit zu der humanen PKC θ auf. Bei Vergleichen der Domänenzusammensetzung der humanen PKC θ und dem At1g50570 ergaben sich jedoch zwei kürzere Domänenbereiche (C2-Domänen) von ca. je 25 Aminosäuren, die eine Identität von 27 % und 28 % aufweisen und für die Interaktion mit AtGRXS17 verantwortlich sein könnten. Der Transkriptionsfaktor NF-YC 11 gehört zur den Transkriptionsfaktoren der CCAAT-Klasse. In Hefe konnte ebenfalls für einen CCAAT-Transkriptionsfaktor eine Interaktion mit einem der beiden homologe Vertreter von AtGRXS17, dem GRX4, nachgewiesen werden, sodass eine Interaktion auch hier wahrscheinlich erscheint und genauer untersucht werden sollte. Die Interaktionen der Kinase (At1g50570) und des Transkriptionsfaktor (NF-YC11) mit dem AtGRXS17 wurden im Folgenden mittels der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation zusammen mit dem AtGRXS17 weiter untersucht.

Tabelle 34 Zusammenstellung der mittels *pulldown*-Assay und anschließender massenspektrometrischer Analysen identifizierten Proteine. Angegeben ist neben den Agi-Nummern, die Häufigkeit der Identifizierung. Weiter wurden die Bereiche der erzielten *Mascot Scores* angegeben, der Trivialname und die berechnete Abdeckungen. Die Vorhersage der zellularen Kompartimente erfolgte mittels der Internet-Applikation *EFP-Browser* (http://bar.utoronto.ca/cell_efp/cgi-bin/cell_efp.cgi). Die Kompartimente (Komp.) wurde in der Tabelle folgendermaßen abgekürzt: K = Zellkern, Z = Zytosol, P = Plastiden, M = Mitochondrium, ER = Endoplasmatisches Retikulum, A = Apoplast, Peroxisomen = Pox. A.I gibt die Anzahl der Identifizierungen wieder. Abde. steht für Sequenz-Abdeckung. MW steht für das errechnete Molekulargewicht. Die Anzahl der Aminosäuren ist durch Anz. AS abgekürzt.

Gen-Nummer	A.I	Mascot score		Trivialname / Funktion	Komp.	Abde. [%]	MW [kDa]	Anz. AS
		von	bis:					
At4g04950	15	240,4	280,3	GrxS17	Z, P	90 %	53,11	488
At1g04730	14	13,4	15,3	CTF18 / ATPase Aktivität	K	14 %	107,99	943
At1g12900	3	8,9	15,2	GapA2/ Glykolyse	Z, P	11 %	41,03	238
At1g13440	9	22,3	48,6	GapC2 / Glykolyse	Z, K, P, M, Pox	41 %	33,9	338
At1g24510	6	14,2	33,9	TCP-1 / Chaperonaktivität	M, Z	33 %	51,14	535
At1g30750	3	6,1	15,2	k.A / k.A..	A, K, ER, M, P	7 %	22,21	212
At1g31230	3	8,2	9,1	AK-HSDH / k.A.	M, P, Z	6 %	99,39	911
At1g50570	13	30,6	56,2	k. A./ Kinase-Aktivität	K	68 %	42,15	388
At1g78780	4	11,9	15,3	k. A. / <i>pathogenesis-related family protein</i>	P,Z	21 %	26,94	238
At1g79280	9	5,2	7,0	<i>Nuclear pore anchor</i> (NUA) / Kerntransport	P,K	4 %	239,3	2115
At2g30110	8	7,3	9,7	ATUBA1 / k.A	P,Z	26 %	120,24	1080
At2g39960	5	36,2	43,1	<i>microsomale signal peptidase 25 kDa subunit</i> (SPC25) / k.A.	M, P, K	45 %	21,64	192
At3g12480	7	36,5	40,1	NF-YC11 / Transkriptions Faktor	K, M, P	59 %	32,29	293
At3g10340	4	13,2	18,6	<i>Phenylalanin Ammonium-Lyase 4</i> (PAL 4)	Z, P	12 %	76,71	707
At3g13460	6	19,5	21,2	<i>Evolutionarily conserved c-terminal region 2</i> (ECT2) / k.A.	P, K, Z	52 %	72,36	667
At3g15730	4	6,3	8,0	<i>phospholipase alpha 1</i> (PDDa1)/ k.A.	P, K, Z	8 %	91,84	810
At3g61950	3	11,2	16,5	k.A. / Transkriptionsfaktor-Aktivität	Z, K	16 %	42,84	358
At4g03350	2	9	11,2	<i>eternally vegetative phase 1</i> (EVE1)/ k.A.	K	11 %	22,79	263
At4g22030	5	16,9	20,2	Skp2-like / k.A	M, P, Z	12 %	70,08	626
At4g25860	11	21,4	46,8	k. A./ Oxysterol-bindendes Protein	Z	56 %	44,07	386
At4g31180	4	16,2	38,0	k. A./Aspartate tRNA ligase-like	P, Z	31 %	62,91	270
At4g32450	4	12,8	14,9	<i>Pentatricopeptide repeat</i> (PPR) /	K, M	37 %	60,53	537
At4g38710	4	12,2	13,1	k. A./ Translation initiation Factor	K	36 %	48,98	465
At5g11870	8	16,1	60,2	aPHC / k.A	P, M, A	28 %	29,81	270
At5g20830	4	16,4	18,3	<i>Sucrose synthase 1</i> (SUS1) / Metabolismus	M, Z	19 %	92,99	808
At5g26110	4	13,8	16,4	K.A. / <i>Ser-Thr-Prot Kinase like dom</i>	M, Z	34 %	25,13	226
At5g46570	5	22,1	46,8	<i>BR-signaling kinase 2</i> (BSK2) / Kinase	Z	41 %	54,97	492
At5g54050	8	17,3	56,2	PKC like /Beinhaltet eine Protein Kinase C Domäne	A, K	21 %	67,06	580

3.4.3 Fluoreszenzmikroskopische Analysen von AtGRXS17, NF-YC11 und der Kinase At1g50570

Zunächst wurden GFP-Lokalisationsstudien des At1g50570 und des NF-YC11 in transient transformierten Blattprotoplasten durchgeführt, um deren Lokalisation in der Zelle nachweisen zu können, und so zu klären, ob die hier gefundenen Proteine in den gleichen subzellulären Kompartimenten vorkommen wie das AtGRXS17. Zu diesem Zweck wurden zunächst die entsprechenden Sequenzen von cDNA amplifiziert, in den pGFP2-Vektor (CaMV 35S_{prom}::At1g50570-pGfp2-Vektor & CaMV 35S_{prom}::At3g12480-pGfp2-Vektor) kloniert und in isolierte Mesophyll-Protoplasten transient transformiert (vgl. 2.3.28). Beide Proteine konnten analog zu AtGRXS17 sowohl im Zytosol als auch im Kern nachgewiesen werden (Abb. 25). Anschließend wurde sowohl mit der Kinase At1g50570 als auch dem Transkriptionsfaktor NF-YC 11 ein Interaktionsnachweis mit AtGRXS17 mittels der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BIFC) durchgeführt (vgl. 3.3.4). Dazu wurden die Gen-Sequenzen *atnf-yc11* und *At1g50570* sowohl in den Vektoren pUC spine als auch in den Vektor pUC spice unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors kloniert.

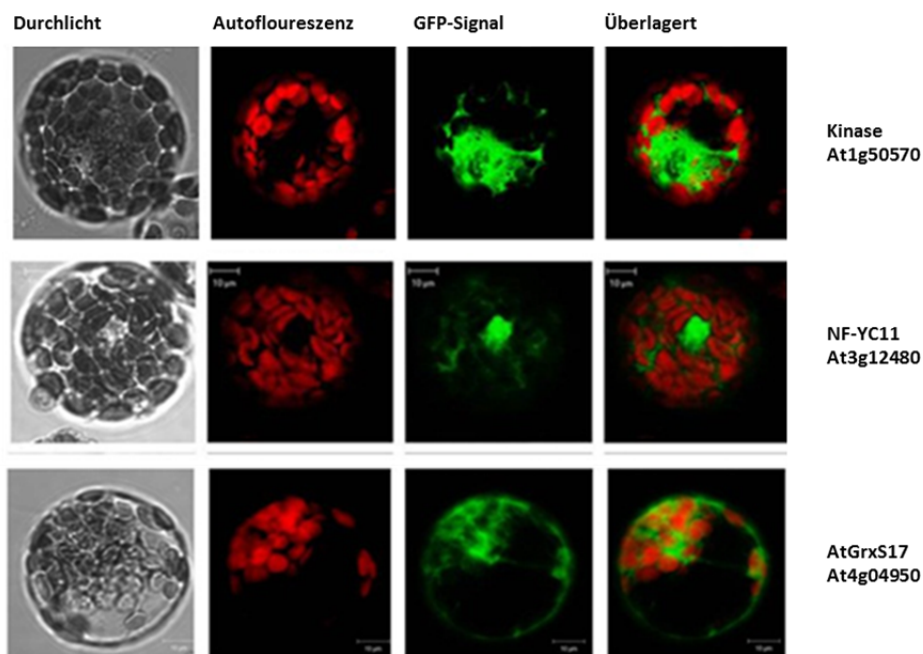


Abb. 25: Vergleich der Lokalisationen der Interaktionspartner At1g50570 (Kinase) und NF-YC 11 (At3g12480) mit AtGRXS17 (At4g04950) mittels GFP-Fusionsproteinen in isolierten *A. thaliana*-Mesophyll-Protoplasten. Zur Detektion der zellulären Lokalisation der Interaktionspartner von AtGRXS17 wurden die Konstrukte CaMV 35S ::At1g50570 & CaMV 35S ::At3g12480 in den pGfp2-Vektor kloniert und in isolierte *A. thaliana*-Mesophyll-Protoplasten transient transformiert. Alle Proteine können anhand ihres GFP-Signals im Zytosol und im Zellkern fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden.

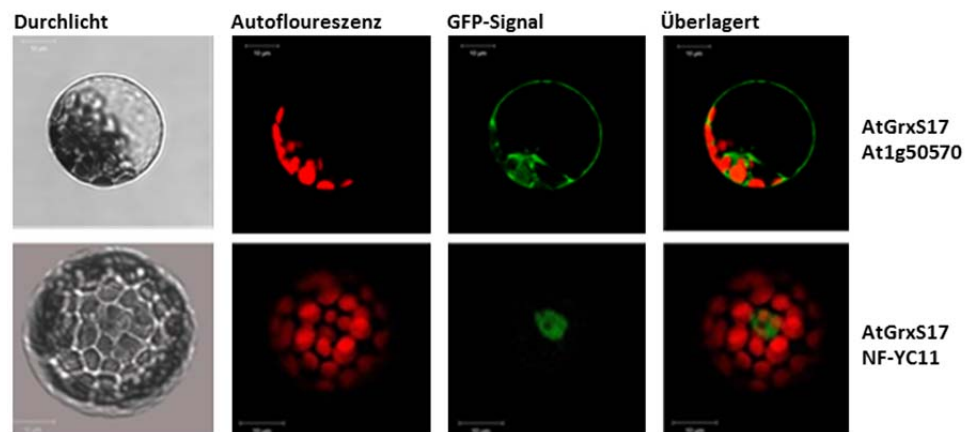


Abb. 26: BiFC-Analysen zur Interaktion von AtGrxS17 mit der Kinase At1g50570 und dem Transkriptionsfaktor NF-YC 11 (At3g12480). *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten wurden mit den entsprechenden Split-YFP-Vektoren transient transformiert. Die Interaktion der Kinase At1g50570 mit dem AtGRXS17 konnte mit dieser Methode sowohl im Zellkern als auch im Zytosol nachgewiesen werden. Bei den BiFC-Analysen von AtGRXS17 mit NF-YC11 wurde nach der transienten Transformation der Vektoren in die *A. thaliana*-Mesophyll-Protoplasten nur im Zellkern ein Signal detektiert.

Getestet wurden die Konstrukte, indem diese zusammen mit den vorher erstellten *AtGRXS17*-spine- oder *AtGRXS17*-spice-Vektoren wie in der Tabelle 35 angegebenen kombiniert und transient in isolierte Mesophyll-Protoplasten transformiert wurden (Abb. 26). Die entsprechenden Signale wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert (vgl. 2.3.29). Interaktionen von At1g50570 mit ATGRXS17 sind sowohl im Zytosol als auch im Zellkern nachzuweisen. Interaktionen von AtGRXS17 mit NF-YC11 können innerhalb der ersten zehn bis zwölf Stunden nach der Transformation nur im Zellkern registriert werden. Bei einer Inkubation von mehr als zwölf Stunden wurden vermehrt Interaktionen im Zytosol detektiert. Vermutlich gehen die Interaktionen im Zytosol dieser Kombination auf die Verwendung des CaMV 35S-Promotors für die einzelnen Vektor-Konstrukte zurück. Durch diesen wird in Abhängigkeit von der Zeit unverhältnismäßig viel Protein in den Protoplasten gebildet, welches vermutlich zu einer artifiziellen Interaktion der beiden Proteine im Zytosol führt.

Tabelle 35 Kombinationen der erstellten BiFC-Konstrukte, sowie Lokalisation der Interaktionen

Vektor	Kombination	pUC spine		AtGRXS17
		At1g50570	NF-YC11	
pUC spice	At1g50570	nicht untersucht		Zellkern/ Zytosol
	NF-YC11			Zellkern
	AtGRXS17	Zellkern/ Zytosol	Zellkern	Zellkern/ Zytosol

3.5 Funktionsanalysen von AtGRXS17 mittels T-DNA-Insertions-KO-Pflanzen

Um eine Aussage über die physiologische Rolle des Proteins AtGRXS17 *in vivo* treffen zu können, wurden *AtGRXS17*-Insertions-Mutanten (SALK_021301.56.00.x) des Ökotyps Columbia (KO-Pflanzen) auf Homozygotie untersucht. Diese KO-Pflanzen tragen eine inserierte T-DNA an Position 289 im zweiten Exon des *AtGRXS17*-Gens (Abb. 27 A). Homozygote KO-Pflanzen wurden durch Amplifikation von verschiedenen Produkten auf Basis ihrer genomischer-DNA identifiziert (Abb. 27 B). In homozygoten KO-Pflanzen kann mit genspezifischen, den T-DNA Insertions-Ort umgebenden Primern kein Produkt amplifiziert werden, da die Elongationszeit für die Gesamtstrecke (Gen + T-DNA) so kurz gewählt wurde, dass dies nicht möglich war (Abb. 27 B). Mittels Gen- und T-DNA-spezifischen Primern wurde ein Amplifikat von 670 bp erzeugt, das der berechneten

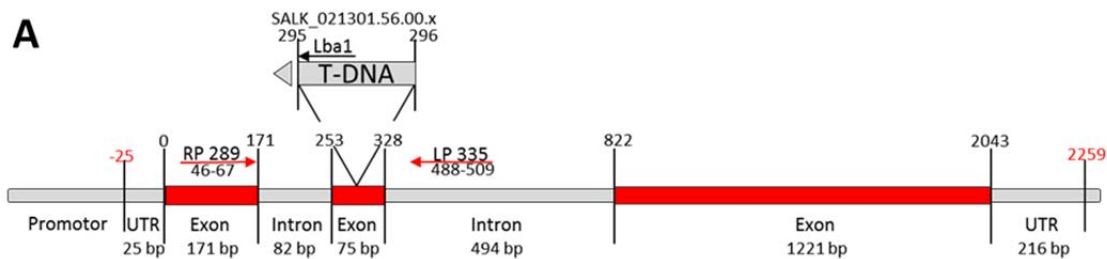
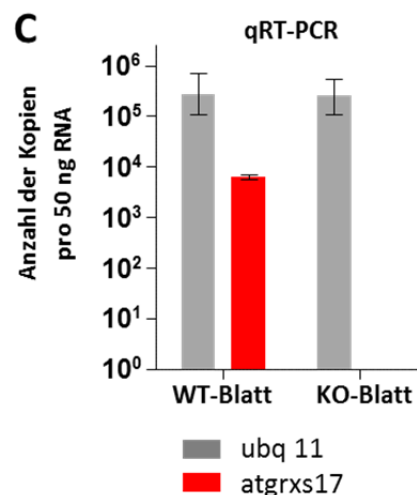
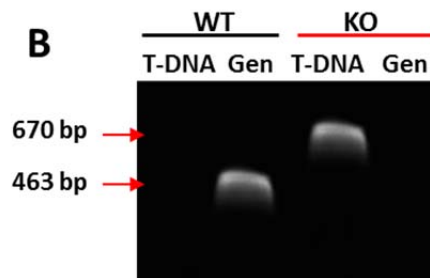


Abb. 27: Nachweis zur T-DNA-Insertion in das *AtGRXS17*-Gen in *A. thaliana*. In A) ist der T-DNA-Insertions-Ort im zweiten Exon des *atgrxs17*-Gens schematisch dargestellt. In B) ist der mittels PCR-Reaktion erbrachte Nachweis der T-DNA im *atgrxs17*-Gen von KO-Pflanzen dargestellt. Bei der Verwendung von genspezifischen, den Insertions-Ort umspannenden Primern in die PCR-Reaktion kann ein Produkt in der DNA von WT-, aber nicht in der von KO-Pflanzen amplifiziert werden (463 bp). Bei der Verwendung von einer Primerkombination, die einen genspezifischen Primer und einen für die T-DNA-spezifischen *Primer* beinhaltet, kann nur in KO-Pflanzen-DNA ein Amplifikat erzeugt werden (670 bp). Demnach tragen die hier verwendeten KO-Pflanzen eine homozygote T-DNA-Insertion im *atgrxs17*-Gen. In C) kann mittels qRT-PCR-Reaktion von KO-Pflanzen-cDNA kein Transkript des *atgrxs17*-Gens nachgewiesen werden, während in WT-Pflanzen ein Amplifikat erzeugt wird.



Voraussage für diese Kombination entspricht (Abb. 27 B). Aus diesen beiden Befunden konnte von einer homozygoten Insertion der T-DNA an der vom SALK-Institut angegebenen Position im Genom der Pflanzen ausgegangen werden. Mittels qRT-PCR konnte in weiteren Analysen kein Transkript des *AtGRXS17*-Gens in der cDNA der KO-Pflanzen nachgewiesen werden (Abb. 27 C). Es wurden Komplementationslinien der KO-Pflanzen erstellt, um die phänotypischen Abweichungen der KO-Pflanzen vom WT auf das Fehlen des *AtGRXS17* zurückführen zu können. Die Komplementationslinien beinhalteten eine durch *A. tumefaciens* vermittelte zufällige Insertion von T-DNA in das Genom der KO-Pflanzen, die die prozessierte *AtGRXS17*-Gensequenz unter der Kontrolle des 35S-Promoters beinhaltet. Es wurden mehrere Linien erzeugt, die sich unter allen in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsbedingungen im Erscheinungsbild nicht signifikant von den WT-Pflanzen unterscheiden. Somit ist gewährleistet, dass die hier identifizierten phänotypischen Abweichungen der KO-Pflanzen zum WT auf das Fehlen des *AtGRXS17*-Proteins zurückzuführen sind und die KO-Pflanzen nicht noch weitere Gendefekte durch mögliche mehrfache T-DNA-Insertionen besitzen.

3.5.1 *AtGRXS17*-T-DNA-Insertions-Pflanzen unter verschiedenen Lichtperioden

Die *AtGRXS17*-KO-Pflanzen entwickeln sich unter standardisierten Kurztag-Bedingungen (KT, vgl. 2.2.1) bei moderaten Lichtintensitäten von $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vergleichbar mit WT-Pflanzen. In keinem der Entwicklungsstadien können signifikante Abweichungen in der Pflanzenentwicklung festgestellt werden (Abb. 28). Im Gegensatz zur Anzucht im KT treten zwischen WT- und KO-Pflanzen unter Langtag-Bedingungen (LT) mit moderaten Lichtintensitäten ($120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) verschiedene signifikante Unterschiede in den Differenzierungsschritten in unterschiedlichen Organen der Pflanzen auf. Während sich die Kotyledonen der KO-Pflanzen vergleichbar zum WT entwickeln, weichen die folgenden Blätter hinsichtlich ihrer Entwicklung vom WT ab. Die Primärblätter der KO-Pflanzen entwickeln eine tief am Blattstiel ansetzende Lamina. Alle Folgeblätter bestehen aus einer Kombination von unregelmäßig veränderten Blattsymmetrien und ungleichmäßigen Verdickungen. Die Blühinduktion ist im Vergleich zu den WT-Pflanzen um 15 ± 6 Tage verzögert (Abb. 28). Die Blätter, die in diesem Zeitraum gebildet werden, sind stärker in

ihrer Differenzierung verändert als die Blätter, die während der vegetativen Phase gebildet werden. Einige dieser Blätter bilden Mischformen aus Blatt und Stängel (Abb. 29). Der erste Trieb und die erste Blüte sind bei pikierten KO-Pflanzen unter LT- Bedingungen immer undifferenziert (Abb. 29). Alle folgenden sekundären Seitensprosse bilden WT-Pflanzen vergleichbare in der Symmetrie gestörte, reproduktive Blüten (vgl. 3.5.2). Bei KO-Pflanzen, die sich gegenseitig beschatten, wie es bei KO-Pflanzen in Aussaattöpfen der Fall ist, können keine starken Blüten-Anomalien festgestellt werden. Auch der erste Trieb ist

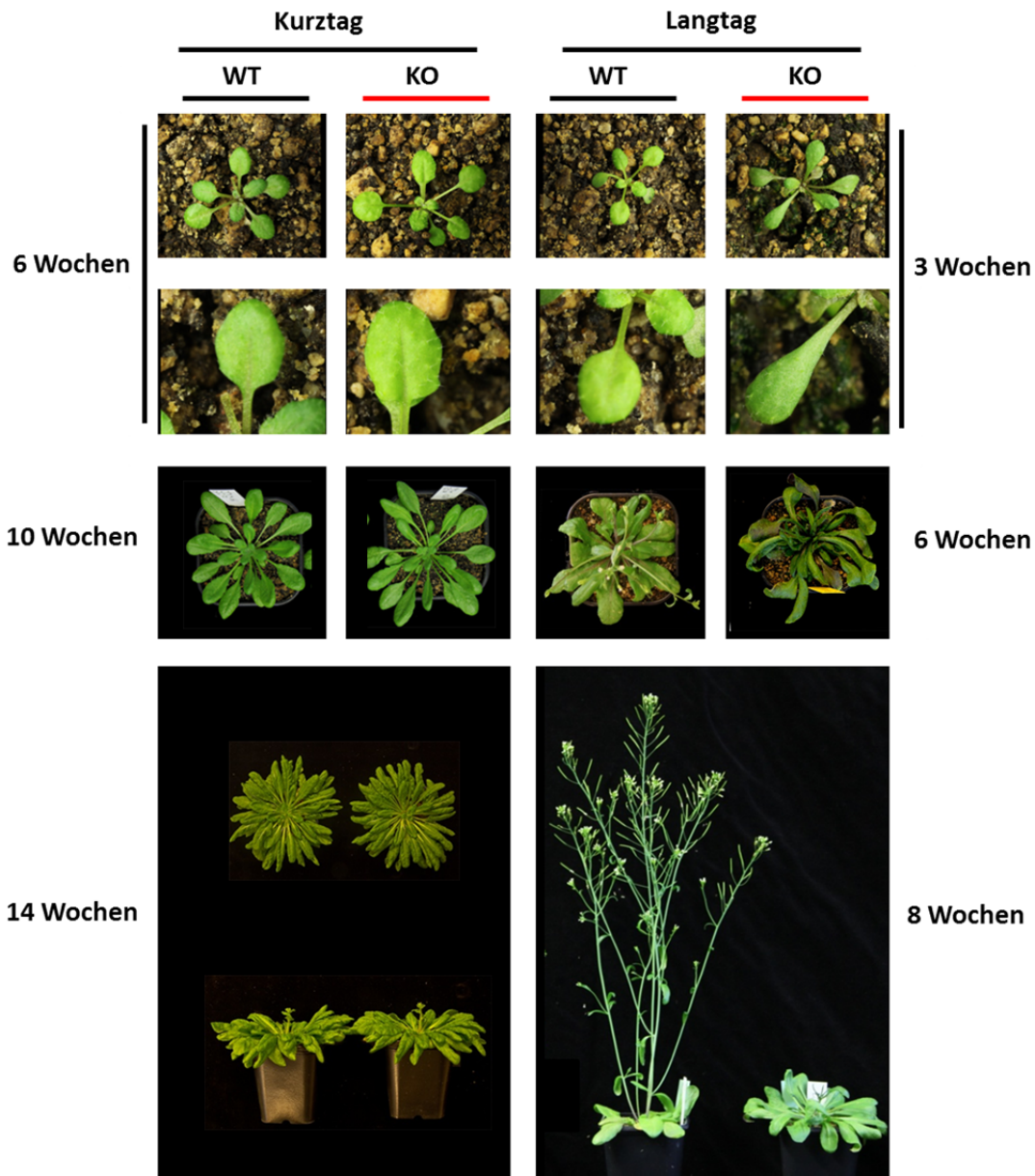


Abb. 28: Unter verschiedenen Lichtperioden gewachsene WT- und AtGrxS17-KO-Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien. Zu keinem Zeitpunkt kann während der Entwicklung der KO-Pflanzen im KT eine Abweichung zu den WT-Pflanzen festgestellt werden (links). Unter LT-Bedingungen (rechts) werden bei den KO-Pflanzen bereits in frühen Stadien Auffälligkeiten in der Blattmorphologie sichtbar. Diese steigern sich während der weiteren Entwicklung. Bei den AtGrxS17-KO-Pflanzen kommt es unter LT-Bedingungen zu einer um 15 ± 6 Tage verzögerten Blühinduktion.

vollständig und vergleichbar mit den Trieben der WT-Pflanzen. Die Verzögerung der Blühinduktion ist auch bei den in Aussaattöpfen kultivierten KO-Pflanzen um 15 ± 6 Tage verzögert (Abb. 30). Die Blütenstände der KO-Pflanzen, die pikiert werden, sind nach dem Erreichen der reproduktiven Phase im Vergleich zu denen der WT-Pflanzen kleiner (Abb. 31). Trotz einer ausgedehnteren Vegetationsdauer der KO-Pflanzen von zusätzlichen 5 ± 2 Wochen wird die Größe der WT-Pflanzen nicht erreicht. Bei einer Steigerung der Lichtintensitäten von $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bzw. $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kommt es zu einer, mit der Lichtintensität steigenden, stärkeren Ausprägung der gebildeten Phänotypen der KO-Pflanzen (Abb. 31 & Abb. 46). Die Blühinduktion ist bei den unter erhöhten Lichtintensitäten angezogenen im Vergleich mit WT-Pflanzen um 18 ± 5 Tage ($500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bzw. 22 ± 7 Tage ($1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) verzögert. Bei diesen Pflanzen ist eine zusätzliche Störung in der Blütendifferenzierung vorhanden, die bei KO-Pflanzen, die unter moderaten Lichtbedingungen ($120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogen werden, selten vorkommt (vgl. Abb. 30, F & G). Genauere Blütenanalysen, in denen auf das Erscheinungsbild unter verschiedenen Lichtintensitäten eingegangen wird, sind im Kap. 3.5.2 beschrieben.

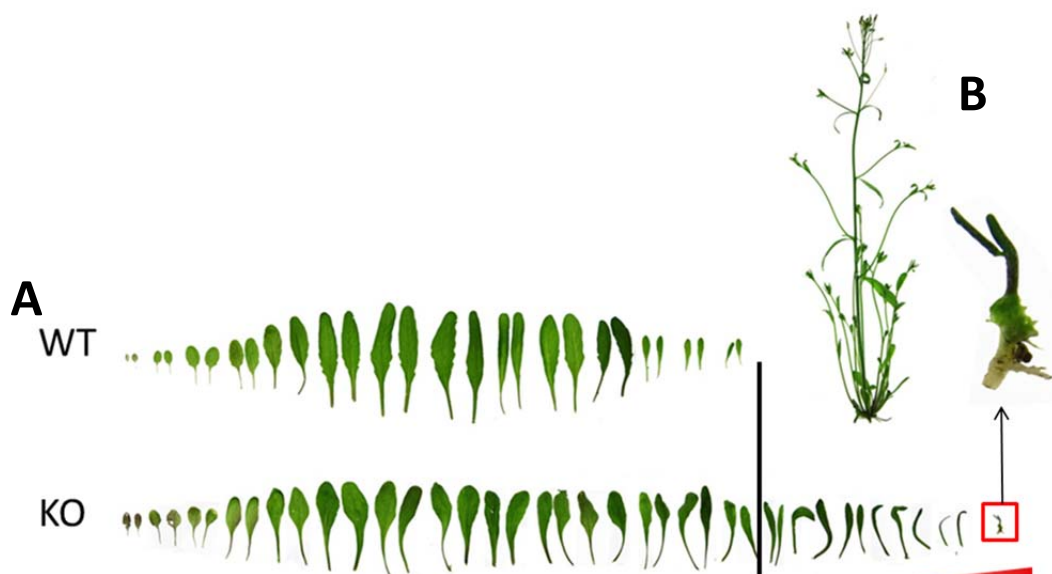


Abb. 29: Vergleich von neun Wochen unter LI-Bedingungen gewachsenen WT- und AtGrxS17-KO-Pflanzen. In A) sind die Anzahl und die ausgebildeten Blattformen von WT- und KO-Pflanzen gegenübergestellt. Der erste Spross der KO-Pflanzen ist unter LT-Bedingungen nicht entwickelt (B). Er ist in Originalgröße (roter Kasten) und vergrößert dargestellt. Die Blühinduktion der KO-Pflanzen dauert ca. 15 ± 6 Tage länger als bei WT-Pflanzen. In diesem Zeitraum (Trennstrich) entwickeln sich Blatt-Trieb-Mischformen (C 1, 2), bis der erste blütenlose Trieb gebildet wird (C3). Die Länge des Maßstabes entspricht jeweils 1 cm.





Abb. 30: Verspätete Blühinduktion von AtGrxS17-KO-Pflanzen in Aussaatöpfen unter LT-Bedingungen. Bei KO-Pflanzen, die unter LT-Bedingungen in Aussaatöpfen kultiviert werden, kommt es wie bei den pikierten Pflanzen zu einer Verzögerung der Blühinduktion. Anders als bei den pikierten KO-Pflanzen entwickeln jedoch die im Aussaatopf kultivierten KO-Pflanzen einen normal differenzierten ersten Spross, der vollständig differenzierte Blüten bildet (roter Kasten).



Abb. 31: Vergleich von 12 Wochen alten WT- und KO-Pflanzen unter verschiedenen Lichtintensitäten. Die Pflanzen wurden unter LT-Bedingungen und unterschiedlichen Lichtintensitäten angezogen (A & B bei $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; C bei $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Entwicklung von WT-Pflanzen unter Lichtintensitäten von $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ist vergleichbar mit WT-Pflanzen, die bei $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert werden und wurde deshalb nicht abgebildet. Auffällig ist die kleinere Wuchsform der beiden KO-Pflanzen (B & C) im Vergleich zu der WT-Pflanze (A). Die KO-Pflanzen bilden jeweils einen nicht differenzierten ersten Trieb aus (D & E). Bei den KO-Pflanzen, die einer erhöhten Lichtintensität ausgesetzt wurden, können verschiedene unregelmäßige Differenzierungsformen der Blüten beobachtet werden (F & G).

3.5.2 Blütenmorphologische Veränderungen der KO-Pflanzen

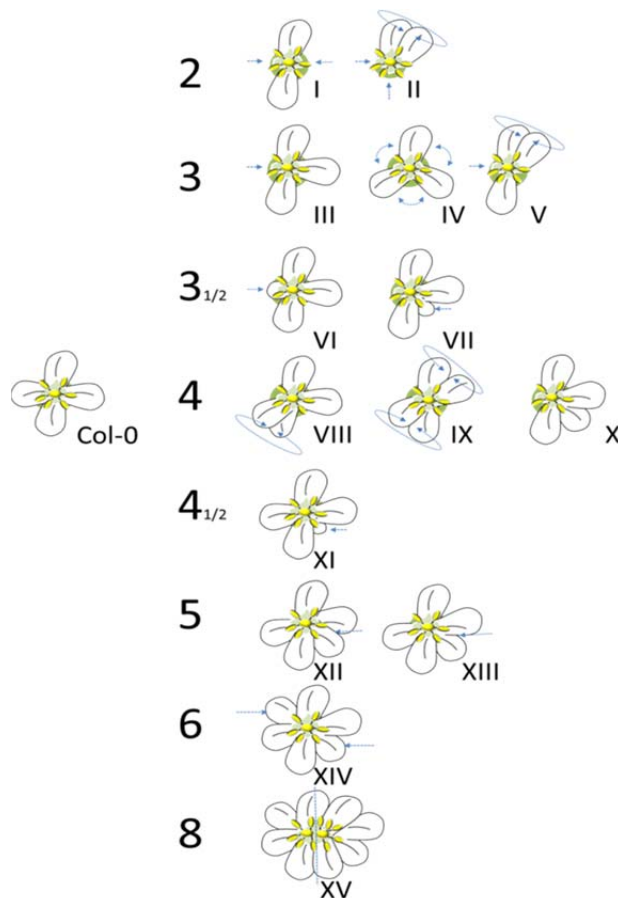


Abb. 32: Klassifizierungs-Schema der aufgetretenen Blüten-Variationen. Insgesamt konnten die für WT- und KO-Pflanzen registrierten Blüten in 16 verschiedenen Klassen eingeteilt werden. Sortiert wurde nach Anzahl der gebildeten Petalen und Grad der vorkommenden Asymmetrien.

Unter verschiedenen Lichtbedingungen wurde untersucht, ob die T-DNA-Insertion Auswirkungen auf die Blütendifferenzierung hat. Dazu wurden sowohl KO- als auch WT-Pflanzen unter KT- und LT-Bedingungen bis zur Blüte kultiviert. Nach der Blühinduktion wurden die Pflanzen alle drei Tage hinsichtlich der Blütenform und Anzahl der Petalen untersucht. Die verschiedenen Blüten-Variationen wurden nach dem in Abb. 32 abgedruckten Schema klassifiziert. Die Einteilung erfolgte zunächst nach der Anzahl der Petalen. Da die Anordnung der Petalen nicht einheitlich ist, wurden die Symmetrien der Blüten in Kombination mit der Anzahl der Petalen als weiteres Merkmal zur

Klassifizierung hinzugenommen. Außerdem wird zwischen differenzierten Blüten (Col-0) und nicht funktionsfähigen Blüten unterschieden. Insgesamt ergeben sich daraus 17 verschiedene Gruppen, nach denen die Blüten klassifiziert wurden. Für alle Pflanzen (WT- & KO-Pflanzen) können Blüten mit mindestens zwei bis maximal acht Petalen dokumentiert werden. Weiter kommt es unter LT-Bedingungen bei den KO-Pflanzen mit zunehmender Lichtintensität vermehrt zur Bildung von undifferenzierten Blüten (Abb. 33). Unter KT- und moderaten Lichtbedingungen treten zwischen WT- und KO-Pflanzen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Blütenformen auf. Bei Steigerung der Lichtintensität nehmen unter KT-Bedingungen die Asymmetrien bei den KO-Pflanzen

deutlich zu, während die WT-Pflanzen nur einen leichten Anstieg der Asymmetrien zu verzeichnen haben.

Unter LT-Bedingungen ist das Wachstum der WT- und der KO-Pflanzen bereits unter moderaten Lichtbedingungen unterschiedlich. Die asymmetrisch geformten Blüten haben bei den KO-Pflanzen einen wesentlich höheren Anteil als bei den WT-Pflanzen. In Abhängigkeit von der Steigerung der Lichtintensität ($500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ / $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kommt es bei den KO-Pflanzen zu einem signifikant erhöhten Anteil morphologisch abweichender Blüten und undifferenzierten Blüten.



Abb. 33: Nicht funktionsfähige Blüte eines Sekundärtriebes von einer AtGrxS17-KO-Pflanze. Kultiviert wurde die KO-Pflanze bei $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Bei dieser Lichtintensität sind 40 % der gebildeten Blüten ohne Funktion und in einem vergleichbaren undifferenzierten Zustand.

Bei einer Lichtintensität von $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sind mehr als 60 % der Blüten der KO-Pflanzen undifferenziert, während sich nur 10 % der Blüten ohne morphologische Abweichungen entwickeln. WT-Pflanzen entwickeln sich dagegen bei einer Steigerung der Lichtintensität unauffällig. Unter keiner Bedingung kann bei den WT-Pflanzen eine undifferenzierte Blüte beobachtet werden.

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob sich die veränderten Blütenformen auf den reproduktiven Erfolg der KO- im Vergleich zu WT-Pflanzen auswirkt (vgl. 3.5.3).

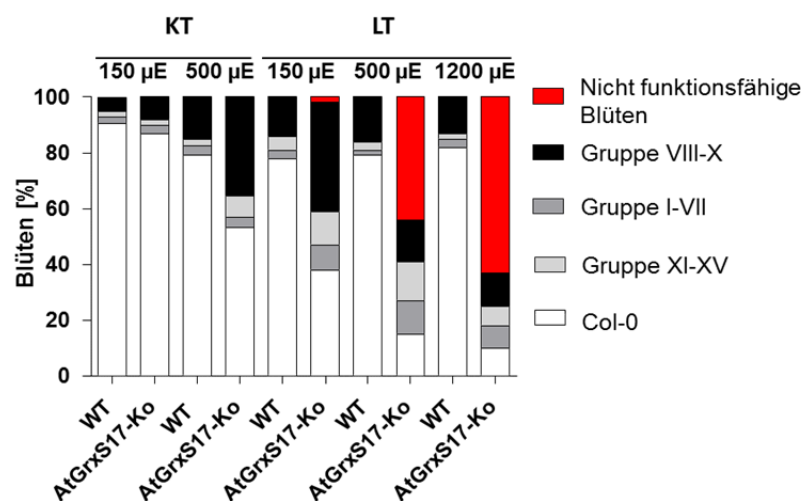


Abb. 34: Statistische Auswertung der beobachteten Blütenformen. Bei zunehmendem Stress durch die Steigerung der Lichtintensität ist sowohl unter KT- als auch unter LT-Bedingungen eine Zunahme an blütenmorphologischen Veränderungen zu beobachten. Die unter LT angezogenen KO-Pflanzen haben unter moderaten Lichtbedingungen im Vergleich zu WT-Pflanzen deutlich häufiger Veränderungen in der Blütenasymmetrie. Unter Starklichtbedingungen von $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sind bei den KO-Pflanzen kaum noch normal (Col-0) differenzierte Blüten zu identifizieren.

3.5.3 Reproduktiver Erfolg der KO- im Vergleich zu den WT-Pflanzen

Die Auswirkungen der Lichtintensitäten auf die Symmetrien und die Funktionsfähigkeit der Blüten bei den KO-Pflanzen führte zur Frage, ob die veränderten Blütenformen Auswirkungen auf die Anzahl und Qualität der gebildeten Samen haben. Dazu wurde die Anzahl der pro Pflanze gebildeten Schoten sowie die Samenmenge pro Schote unter den verschiedenen Anzuchtbedingungen erfasst. Außerdem wurde die Keimfähigkeit der Samen überprüft. Aus diesen Daten wurde errechnet, wie viele keimfähige Samen pro Pflanze unter der entsprechenden Bedingung zu erwarten sind. Unter KT-Bedingungen bei moderaten Lichtintensitäten ($120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sind geringe, aber nicht signifikante Unterschiede in der Fähigkeit zur Reproduktion zwischen WT- und KO-Pflanzen zu verzeichnen.

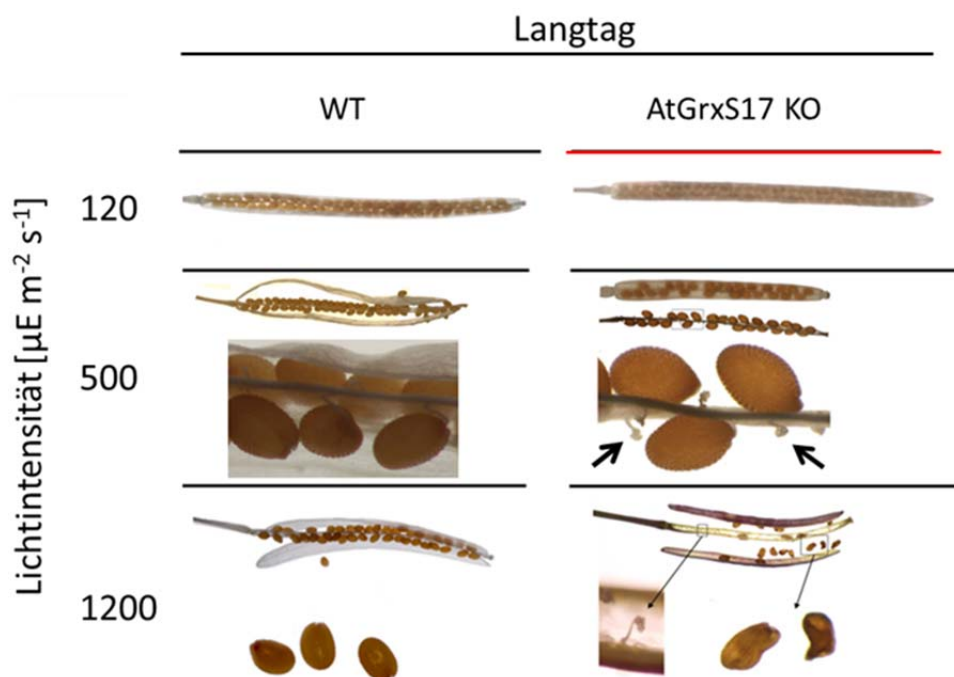


Abb. 35: Typische Schoten von WT- und KO-Pflanzen, die unter LT-Bedingungen und verschiedenen Lichtintensitäten kultiviert wurden. Bei einer Steigerung der Lichtintensität von $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sind bei den WT-Pflanzen keine Veränderungen in der Schotenentwicklung und Samenbildung zu beobachten. Eine weitere Steigerung der Lichtintensitäten auf $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ führt zu einer leichten Verringerung in der Anzahl der gebildeten Samen. Die Schoten von KO-Pflanzen, die bei $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultivierten wurden unterscheiden sich nicht von WT-Schoten. Eine Erhöhung der Lichtintensität auf $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hat zur Folge, dass es bei KO-Pflanzen vermehrt zu Samenausfällen und einer Verkürzung der Schotenlängen kommt während die WT-Pflanzen keine dieser Auffälligkeiten entwickeln. Bei einer Erhöhung der Lichtintensität auf $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kommt es zu einer starken Entwicklungsstörung der KO-Pflanzen, welche sowohl die Schotenentwicklung als auch die beinhaltenden Samen betrifft. Samen, die gebildet werden, weisen Schädigungen auf und es kommt zu einem massiven Samenausfall.

Im LT ist ein starker Einfluss von Lichtintensität und Lichtperiode auf die Reproduktionsfähigkeit der Pflanzen festzustellen. Unter dieser Lichtperiode geht mit der Steigerung der Lichtintensität sowohl die Anzahl der Schoten als auch die in den verbliebenen Schoten vorhandene Menge der Samen zurück. Ein signifikanter Rückgang der keimfähigen Samen, ist ausschließlich bei Samen von KO-Pflanzen zu verzeichnen, die unter sehr starken Lichtintensitäten angezogen wurden ($1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Diese Faktoren summieren sich auf, sodass für die *AtGRXS17*-KO-Pflanzen eine wesentlich geringere Anzahl an keimfähigen Samen pro Pflanze errechnet werden konnte. Auch die WT-Pflanzen werden durch die erhöhten Lichtintensitäten ab $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in ihrer Reproduktionsfähigkeit signifikant beeinträchtigt. Bei $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sind rein rechnerisch ca. 210 Samen pro KO-Pflanze und ca. 23000 Samen pro WT-Pflanzen keimfähig. Da in den vorangegangenen Untersuchungen zur *AtGRXS17*-Transkriptmenge eine erhöhte Menge in den Pollen von GUS-Pflanzen (vgl. 3.2.2) verzeichnet werden konnte, wurde untersucht, ob

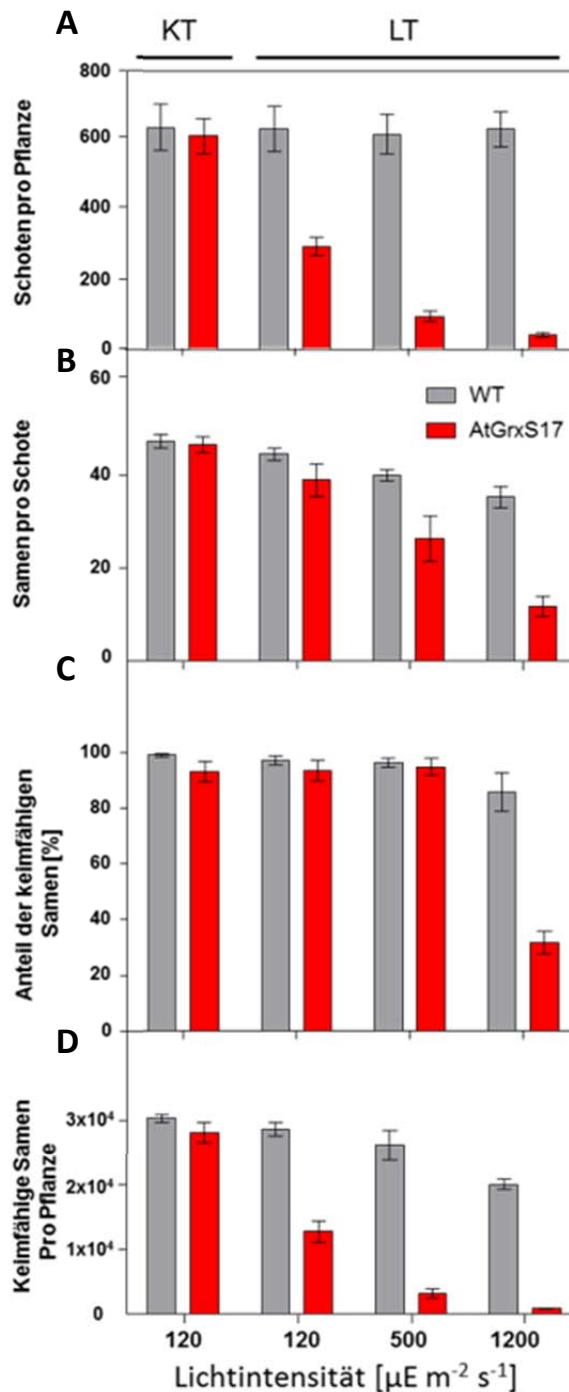


Abb. 36: Reproduktionsfähigkeit von WT- und KO-Pflanzen unter LT-Bedingungen. Zusammengefasst sind die Ergebnisse von den statistisch erfassten Mengen an Schoten pro Pflanze (A), Samen pro Schote (B), Anteil der keimfähigen Samen an der Gesamtmenge der Samen (C) und die aus diesen Daten errechneten keimfähigen Samen pro Pflanze (D) unter den entsprechenden Lichtintensitäten.

die verringerte Menge an Samen pro Schote mit der Vitalität der KO-Pflanzenpollen zu erklären sein könnte. In diesem Zusammenhang wurden mittels der Alexander-Stain-Methode (vgl. 2.2.6) ausgekeimte Pollen auf ihre Vitalität hin untersucht. Zum Einsatz kamen Pollen von WT- und KO-Pflanzen, die unter den gleichen Lichtintensitäten und -perioden angezogen worden waren, wie die für die Messung des reproduktiven Erfolgs herangezogenen Pflanzen. Unter keiner der getesteten Bedingungen waren Unterschiede in der Vitalität von WT- zu KO-Pollen vorhanden (Daten nicht gezeigt).

3.5.4 Revertierbarkeit des Phänotyps durch Vernalisierung und GA-Behandlung

Die generative Phase kann in *A. thaliana*-Pflanzen über vier verschiedene Wege eingeleitet werden. Neben dem photoperiodischen Weg gibt es weitere Signalkaskaden durch die die Blühinduktion ausgelöst werden kann. Dazu zählt der autonome Weg, der durch innere Faktoren gesteuert wird, die Vernalisierung, bei der die Blühinduktion über kalte Temperaturen erreicht wird und einen, der durch das Phytohormon Gibberellinsäure (GA) ausgelöst werden kann. Die einzelnen Wege führen jeweils zur Blühinduktion, greifen aber an unterschiedlichen Regulationspunkten in die Sprossbildung ein, sodass regulative Prozesse, die sich aus der Photoperiode ergeben, durch Vernalisierung oder GA-Gabe umgangen werden können. In den beiden folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob der Blühzeitpunkt der KO-Pflanzen im LT durch Vernalisierung oder GA mit dem des WT synchronisiert werden kann.

Vernalisierung ist eine Möglichkeit, um den Blühzeitpunkt von der Lichtperiode zu entkoppeln. Um das Blühverhalten von den KO-

Pflanzen im Vergleich zu den WT-Pflanzen unter diesem Aspekt zu untersuchen, wurden diese unter LT-Bedingungen und bei 10 °C und $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert. Beide

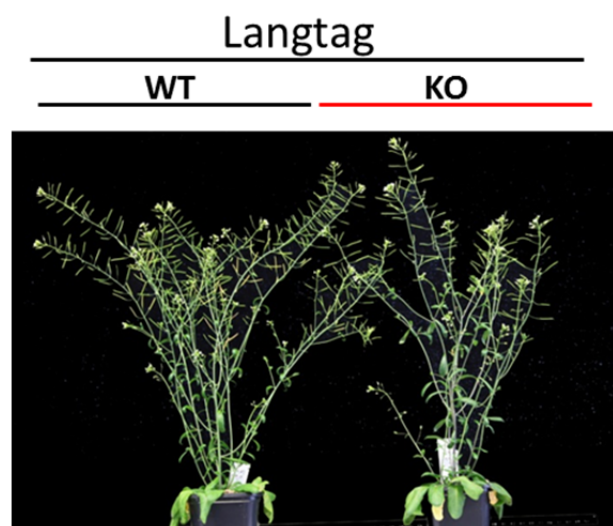


Abb. 37: Vernalisierung von WT- und *AtGrxS17*-KO-Pflanzen unter LT-Bedingungen. Im direkten Vergleich von WT- und KO-Pflanzen, die bei 10 °C unter LT-Bedingungen kultiviert worden sind, kann kein Unterschied hinsichtlich der Entwicklung festgestellt werden.

Pflanzengruppen entwickelten sich in jeder Entwicklungsstufe ohne erkennbare Unterschiede. Es erfolgt eine vollständige Revertierung des KO-Pflanzen-Phänotyps durch Vernalisierung (Abb. 37).

In einem weiteren Versuchsansatz sollte geklärt werden, ob das Besprühen mit GA von im LT kultivierten KO- und WT-Pflanzen einen Effekt auf die Blühinduktion hat. Dazu wurden sowohl WT- als auch KO-Pflanzen täglich einmal mit GA besprüht (vgl. 2.2.5). Sowohl GA-behandelte WT- als auch KO-Pflanzen erreichen den Übergang von der vegetativen zur generativen Phase früher als die Kontrollpflanzen ohne GA-Behandlung (Abb. 31). Der Zeitpunkt der Blühinduktion ist bei den WT-Pflanzen deutlich früher als bei nicht behandelten WT-Pflanzen. Mit GA-behandelte KO-Pflanzen vollziehen den Übergang zur generativen Phase 3 ± 1 Tage später als nicht behandelte WT-Pflanzen. Unter GA-Zugabe ist die Blütenentwicklung der KO-Pflanzen weiterhin beeinträchtigt. Es werden Sepalen gebildet, die mit undifferenzierten Blütenorganen ausgestattet sind. Daraus folgt, dass eine partielle Revertierung des Phänotyps durch die GA-Gabe erreicht wurde (Abb. 31).

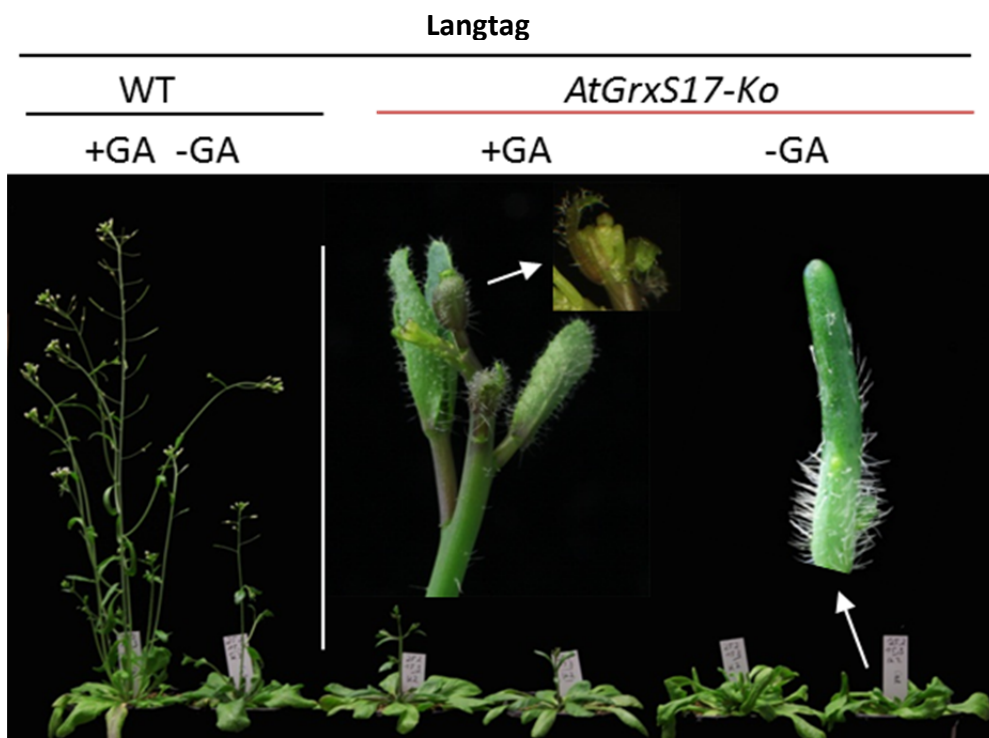


Abb. 38: Sechs Wochen alte unter LT-Bedingungen kultivierte WT- und KO-Pflanzen, die täglich entweder mit einer 50 mM GA-Lösung oder einer Pufferlösung ohne GA besprüht wurden. Die WT-Pflanzen mit GA-Behandlung erreichen die Blühinduktion deutlich früher als die WT-Pflanzen ohne Behandlung. Die Blütenbildung der KO-Pflanzen mit GA-Gabe ist unvollständig. Es werden Sepalen gebildet während die anderen Blütenorgane undifferenziert bleiben. Die KO-Pflanzen erreichen eine frühere Blühinduktion, die 3 ± 1 Tage später erfolgt als bei WT-Pflanzen ohne GA-Behandlung, sodass von einer Revertierung des Blühinduktionsphänotyps ausgegangen werden kann.

4 Diskussion

4.1 Phylogenie des AtGRXS17

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten pflanzlichen GrxS17-Proteinsequenzen können aufgrund ihrer Trx-Homologie-Domänen (HD) und Grx-HD sowohl den Proteinfamilien der Trx als auch der der Grx zugeordnet werden (vgl. 1.1.4). Aus evolutiver Sicht ist die Entstehung der GrxS17 durch Genfusion von je einem Protein dieser Proteinfamilien ein frühes Ereignis. Aus den beiden Einzelproteinen haben sich die für das GrxS17 typischen Homologie-Domänen (HD) entwickelt. Die ursprüngliche Kombination der GrxS17 besteht aus je einer Trx-HD und Grx-HD. Die modifizierte Form, die immer aus einer Trx-HD und bis zu drei Grx-HD besteht, kommt in allen höher entwickelten Organismen vor (ALVES *ET AL.*, 2009; COUTURIER *ET AL.*, 2009). Diese Genkombination ist in allen bisher sequenzierten Genomen der Eukaryoten sowie in denen von vielen Prokaryoten als auch in einigen Genomen der Archaeen zu finden (ALVES *ET AL.*, 2009). Der evolutive Verlauf, der zur Generierung der GrxS17 geführt hat, ist in verschiedenen Veröffentlichungen gut untersucht (ALVES *ET AL.*, 2009; COUTURIER *ET AL.*, 2009). In den Genomen höherer Pflanzen sind, wie es COUTURIER *ET AL.* (2009) vermutete haben, nur GrxS17 zu finden, die eine Trx-HD und drei Grx-HD Domänen besitzen (Abb. 9).

Ähnlich wie die CC-Typ-Grx (ROXY's), die erst in den Embryophyta zu finden sind und deren zunehmende Vielfalt mit dem Auftreten der Angiospermen einhergeht (XING *ET AL.*, 2006; ZIEMANN *ET AL.*, 2009), ist das GrxS17 evolutiv gesehen zeitgleich mit dem Auftreten der Tracheophyta um eine Grx-HD ergänzt worden (vgl. 3.1.1). Die phylogenetischen Analysen in dieser Arbeit zeigen, dass die Grx-HD II die jüngste der drei Grx-HDs des GrxS17 der Tracheophyta ist und somit zwischen den beiden ursprünglich vorhandenen Grx-HD inseriert wurde (vgl. 3.1.1). Für AtGRXS17 konnte in dieser Arbeit zudem eine Beteiligung an Differenzierungsprozessen der Blütenbildung unter LT-Bedingungen gezeigt werden (vgl. 3.5.2). Es erscheint somit naheliegend, dass die Domänenduplikation in einem kausalen Zusammenhang damit stehen könnte.

Die Genfamilien der pflanzlichen Trx und Grx bestehen zumeist aus einer Vielzahl von Untergruppen (MEYER *ET AL.*, 2008). Stammbaumanalysen zeigen allerdings, dass die *grxs17*-Gene, mit einer Ausnahme in *P. patens*, keine Untergruppen bilden.

Möglicherweise hat die Genduplikation in *P. patens* nach der Trennung der direkten Erblinie zu den höheren Pflanzen stattgefunden. Das Vorkommen von nur einem *grxs17*-Gen in den Genomen höherer Pflanzen und die hohe Ähnlichkeit der GrxS17-Proteinsequenzen in den verschiedenen Organismen, lassen den Schluss auf essentielle Funktionen von GrxS17 *in vivo* zu. Die in dieser Arbeit identifizierten Funktionen werden in den folgenden Kapiteln anhand des GrxS17 aus *A. thaliana* näher erörtert.

4.2 Transkription des *AtGRXS17*-Gens

Die Proteinbiosynthese wird unter anderem durch die Anzahl der verfügbaren mRNAs bestimmt. Durch die Analysen des mRNA-Gehalts verschiedener Pflanzengewebe kann allerdings nur näherungsweise auf die maximal mögliche Menge an Protein geschlossen werden. Der vollständige Umsatz der mRNA in Protein wird *in vivo* nicht erreicht, da verschiedene Regulationsmechanismen der Transkription nachgeschaltet sind, sodass nur ein Teil der mRNA translatiert wird. Eine mögliche quantitative Methode wäre die Analyse der mRNA, welche sich in Komplexen mit Ribosomen befinden und deren Translation bereits begonnen hat (MAIER *ET AL.*, 2009). Jedoch sind auch Proteine verschieden stabil und haben eine bestimmte, auf die Zusammensetzung und Funktion des Proteins zurückzuführende Lebensdauer („*turnover*“-Rate). Demnach ist es möglich, dass stabile Proteine mit einer geringeren Transkription bzw. Translationsrate in größeren Mengen vorkommen als solche Proteine, die zwar stärker transkribiert werden, aber weniger stabil sind. Der mRNA-Gehalt in verschiedenen Geweben ist somit nicht gleich zu setzen mit dem Proteingehalt. Allerdings gibt der Vergleich der Transkriptmengen in verschiedenen Geweben Auskunft über die zeitliche und räumliche Aktivität des Promotors des untersuchten Gens. In dieser Arbeit wurden mehrere Methoden angewendet, um die Kapazität des Promotors und die resultierende mRNA-Menge beurteilen zu können. Zunächst wurden die regulatorischen Elemente der *AtGRXS17*-Promotorstruktur bioinformatisch vorhergesagt. Unter diesen an den Promotorbereich bindenden Transkriptionsfaktoren befinden sich ungewöhnlich viele, welche auch an der Initiierung von Genen mitwirken, deren translatierten Proteine an Differenzierungsprozessen beteiligt sind (vgl. 3.1.2). Vier der identifizierten Transkriptionsfaktoren konnten der *basic leucine zipper* (bZIP)-Familie der unterschiedlichen Klassen B, C, D und H zugeordnet werden (JAKOBY *ET AL.*, 2002). Für den

bZIP-Transkriptionsfaktor HY5 (Klasse H, At5g11260) wird eine Einflussnahme auf verschiedene signalverarbeitende Wege der Lichtwahrnehmung vermutet. Es konnte eine lichtabhängige Phosphorylierungs-Modulation von HY5 nachgewiesen werden, von der wiederum die Interaktion des HY5 mit CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) reguliert wird (HARDTKE *ET AL.*, 2000; ANG *ET AL.*, 1998). KO-T-DNA-Insertions-Pflanzen für das HY5-Gen generieren Phänotypen, die Auswirkungen auf den Gravitropismus, die Wurzelbildung, die Chloroplasten-Differenzierung, das lichtabhängige Wachstum des Hypokotyls und die Zellstreckung im Allgemeinen haben (OYAMA *ET AL.*, 1997; STRACKE *ET AL.*, 2010). Der Redoxmodulierte bZIP-Transkriptionsfaktor TGA1 (Klasse B, At5g65210) bindet in Abhängigkeit seines Redoxzustandes in Promotorbereichen von Gen-Sequenzen, deren resultierende Proteine an der Abwehr von Pathogenen oder am Stickstoffmetabolismus beteiligt sind (LINDERMAYR *ET AL.*, 2010). Das AtbZIP9 (Klasse C, At5g24800) wird aufgrund ausführlicher Transkript-Analysen eine Funktion während der Differenzierung in verschiedenen pflanzlichen Geweben zugeordnet (WELTMEIER *ET AL.*, 2008). KO-T-DNA-Insertions-Pflanzen, die das Transkript des Transkriptionsfaktors AtCDC5 (At1g09770) verhindern, sind embryonal. AtCDC5-RNAi-Pflanzen sind in der Entwicklung des apikalen Sprossmeristems gestört und lassen Defekte in der Zellzyklus-Kontrolle erkennen, die in den entsprechenden Bereichen zur Apoptose führen (LIN *ET AL.*, 2007). Der pflanzenspezifische NO APICAL MERISTEM (NAM)-, ARABIDOPSIS TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR (ATAF1/2)- und CUP SHAPED COTYLEDON (CUC2)-Domänen beinhaltende NAC069-Transkriptionsfaktor (At4g01550), der auch als NAC- mit Transmembranmotiv2 (NTM2) bezeichnet wird, ist ein membranständiger Transkriptionsfaktor. Um in den Zellkern zu gelangen, werden die NTMs durch eine proteolytische Spaltung von der Membran abgelöst. Die in NTM2 enthaltene und für alle NAC-Transkriptionsfaktoren typische NAM-Region wurde in Petunien zuerst für die Ausbildung des Sprossapikalmeristems (SAM) und die Position des Sprosses beschrieben (OAK *ET AL.*, 2003). Für das NTM2 konnte eine weitere Verbindung zum Pflanzenhormon Auxin und zu Salzstress während der Keimung hergestellt werden (PARK *ET AL.*, 2011; JUNG & PARK., 2011). Der Trihelix-Transkriptionsfaktor GT1 (At1g13450) bindet an die GGTTAAT-Sequenz in *upstream*-Promotorregionen von Proteinen, die durch Licht reguliert werden. Die Bindung von GT1 an die Sequenz wird durch eine Calciumvermittelte De-/Phosphorylierung reguliert (HIRATSUKA *ET AL.*, 1994; NAGATA *ET AL.*, 2010). Dem potentiell in der Promotorregion bindenden Zink-Finger-

Transkriptionsfaktor AGP1 GATA konnten keine eindeutigen Informationen zugeordnet werden. Der gut untersuchte MADS-Box-Transkriptionsfaktor AGL15 (AGAMOUS-Like 15; AT5G13790) ist an einer frühen Sprossbildung unter KT-Bedingungen sowie einer Vielzahl an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen maßgeblich beteiligt (FANG & FERNANDEZ, 2002). In einer Interaktionsstudie, bei der das Bindevermögen des AGL15 an *A. thaliana*-DNA-Regionen untersucht wurde, konnte die Promotorregion von *AtGRXS17* nicht als Partner des AGL15-Transkriptionsfaktors identifiziert werden (ZHENG *ET AL.*, 2009). In einer weiteren Studie wurde berichtet, dass der AGL15-Transkriptionsfaktor eine schwache Bindung an Promotorbinderegionen eingeht (HILL *ET AL.*, 2008). Es wurden weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert, die für eine stärkere Interaktion und Stabilisierung notwendig sind (HILL *ET AL.*, 2008). Möglicherweise gibt es auch in der *AtGRXS17*-Promotorregion weitere Transkriptionsfaktoren (z.B. SIN3/ HDAC), die stabilisierend auf das Bindevermögen des AGL15 wirken können. Über den Transkriptionsfaktor SQUAMOSA-PROMOTER-BINDING-PROTEIN-LIKE3 (SPL3, At2g33810) sind zwischen 1997 und 2012 mehr als 20 Veröffentlichungen erschienen, die diesen mit der Initiierung des Blühzeitpunkts in Verbindung bringen (CARDON *ET AL.*, 1997; SANCHEZ *ET AL.*, 2011). Das *SPL-like8* (SPL8, At1g02065) wird in einer dualen Rolle bei der gibberellinsäurevermittelten Entwicklung von Samen und Blüte vermutet (UNTE *ET AL.*, 2003; ZHANG *ET AL.*, 2007).

Es wird deutlich, dass den meisten dieser in der *AtGRXS17*-Promotorregion bindenden Transkriptionsfaktoren Funktionen zugeordnet werden, die an regulativen, die Entwicklung und Differenzierung betreffenden Prozessen beteiligt sind. Diese Befunde zeigen, dass eine Beteiligung von *AtGRXS17* an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen für das *AtGRXS17*-Protein sehr wahrscheinlich ist.

Eine ungewöhnlich hohe Anzahl an Bindestellen für kleine RNAs konnte in dem Promotor von *AtGRXS17* vorhergesagt werden. Kleine RNAs sind bisher dafür bekannt, dass sie durch Bindung an die mRNA strukturelle Auswirkungen und somit posttranskriptionale Modifikationen im UTR oder der mRNA bewirken. Sie stabilisieren oder schwächen dreidimensionale „Haarnadelstrukturen“ der mRNA, die durch Anlagerung von komplementären Bereichen der mRNA-Sequenz entstehen. Diese können selbstprozessierende Funktionen haben, die von verschiedenen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert oder aber auch durch Bindung von Liganden in ihrer Funktion beeinflusst werden (WACHTER *ET AL.*, 2007; MONTANGE & BATEY, 2008). Diese *Riboswitche* stellen eine weitere

Kontrollebene zur Regulation bereits transkribierter mRNA da. Ein regulativer Einfluss auf die Transkription durch die direkte Bindung von kleinen RNAs an den Promotorbereich ist bisher nicht für Pflanzen beschrieben. Für die humane miRNA-373 konnte in den humanen Zellkulturlinien PC-3, LNCaP und HCT-116 eine solche Regulation und eine Initiierung der Transkription für verschiedene Gene nachgewiesen werden (PLACE *ET AL.*, 2008). Ein vergleichbarer Mechanismus für *A. thaliana*-Promotoren und speziell für den *atgrxs17*-Promotor ist demnach denkbar.

Beim Vergleich der Positionen der vorhergesagten Bindestellen für die verschiedenen Transkriptionsfaktoren und die unterschiedlichen kleinen RNAs konnte festgestellt werden, dass sich diese Motive häufig überlappen. Daher erscheint es möglich, dass sowohl verschiedene TF als auch verschiedene kleine RNAs um identische Bereiche an den Bindestellen konkurrieren. Hierzu passend zeigen die mittels GUS-Reportergergen-Pflanzen untersuchten Promotoraktivitäten eine gewebe- und zellspezifische Verteilung (vgl. 3.2.2). Diese Verteilung ist reproduzierbar, deckt sich aber nur zum Teil mit den bioinformatisch und mittels ISH-Methode ermittelten Ergebnissen. Besonders starke Promotoraktivitäten ergaben sich in Pollen, Samenanlagen, dem Abszission-Bereich der Schoten, in den Hydathoden der Blätter und im oberen Wurzelbereich (vgl. Abb. 15). Erwartet wurden anhand der bioinformatisch aus Array-Datenbanken ermittelten Transkriptmengen (vgl. 3.1.3) leichte großflächige Färbungen des gesamten Gewebes. Wenn jedoch lokale Transkriptmengen-Erhöhungen auf wenige Zellen des Gewebes beschränkt sind, können diese nicht mit Array-Transkript-Analysen detektiert werden, da diese im Vergleich zur analysierten Gesamt-Transkriptmenge des Gewebes nicht ins Gewicht fallen. Möglich ist auch, dass beim Entfärben diese vergleichsweise schwachen Signale aus dem Zellverband herausgelöst werden und nur die Regionen mit starker Aktivität gefärbt bleiben. Da die Ermittlung der Promotoraktivität mittels GUS-Reporterpflanzen indirekt über die Enzymaktivität der β -Glucuronidase gemessen wird (JEFFERSON, 1987), ist es auch möglich, dass die Menge der β -Glucuronidase bei geringer Promotoraktivität nicht ausreicht, um ein detektierbares Farbsignal zu erzeugen. In der Literatur sind Veröffentlichungen zu finden, in denen es zu Abweichungen in der Detektion von Signalen bei der Verwendung von GUS-Reporterpflanzen gekommen ist. In einer Studie wurde von der Akkumulation des Farbstoffes 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo durch Präzipitation in pflanzlichen Bündelscheidenzellen berichtet, die nicht auf die Promotoraktivität des dort untersuchten Promotorkonstrukts zurückzuführen ist, sondern lediglich im

Zusammenhang mit einer längeren Färbedauer und einer möglichen Translokation der β -Glucuronidase steht (ROSCHE & WESTHOFF, 1995). Weiter wurden pflanzeigene Substanzen identifiziert, die die Aktivität der β -Glucuronidase beeinträchtigen (FIOR ET AL., 2009). Bei schwachen Promotoren wie dem von *AtGRXS17* kann eine Kombination dieser in der Literatur beschriebenen Mechanismen das Gesamtbild der Promotoraktivität verzerren. So ist es möglich, dass die laut GUS-Analysen erhöhte Promotoraktivität in den Pollen auf die Struktur dieser und möglicherweise geringeren Aktivitäten der β -Glucuronidase hemmenden pflanzeigenen Substanzen in diesen Geweben zurückzuführen ist und daher höher erscheint als in anderen Experimenten. *In situ*-Untersuchungen bestätigen erhöhte Transkriptmengen in den Pollen nur zum Teil, da das *AtGRXS17*-Transkript nur in einigen vermutlich angeschnittenen Pollenkörnern sowie uneinheitlich in undifferenzierten Mikrosporen detektiert werden konnte (vgl. 3.2.3). Möglicherweise ist eine unvollständige Detektion der *AtGRXS17*-Promotoraktivität mittels der GUS-Reporterorganismen auf eine zu kurz gewählte Promotorregion zurückzuführen. Die klassische Definition für den Kernpromotorbereich beträgt ca. 1000 bp im *upstream*-Bereich des zu untersuchenden Gens. „Sichere“ Promotorbereiche, bei denen die meisten regulatorischen Elemente erfasst werden, erstrecken sich über einen *upstream*-Bereich, der ca. 2000-3000 bp umfasst (SHAHMURADOV ET AL., 2005). Für *AtGRXS17* wurde ein Bereich von ca. 1400 bp gewählt, da dies die Distanz zwischen *AtGRXS17* und dem in gleicher Richtung orientierten Folge-Gen (*At4g04953*) ist. Regulative Sequenzen können jedoch auch im *upstream*-Bereich zu finden sein, der für andere Gene codiert. Das *nadp-mdh*-Gen besitzt beispielsweise keinen eigenen Promotorbereich. Die regulativen Elemente für dieses Gen sind in einem in entgegengesetzter Richtung orientierten Gen integriert (HAMEISTER ET AL., 2007). Auch in der Genstruktur und in Intron-Bereichen der zu transkribierenden Gene können regulativ wirkende Regionen zur Transkription lokalisiert sein (SIEBURTH & MEYEROWITZ, 1997). Demnach wäre es möglich, dass sich im *upstream*-Bereich des Folgens von *AtGRXS17* als auch in dessen unprozessierter Gensequenz für die Promotoraktivität wichtige Bindesequenzen befinden.

Zusammenfassend kann aus den Transkript-Analysen geschlossen werden, dass das *AtGRXS17*-Gen konstant in allen Geweben auf einem niedrigen, stabilen Niveau, ähnlich wie bekannte *housekeeping*-Gene (*ran3/ubq11*) transkribiert wird. Gewebespezifische Erhöhungen der Transkriptmengen in Pollen können in den GUS- und ISH-Analysen

detektiert, jedoch nicht in Internetbasierten Datenbanken gefunden werden. Eine sichere Einordnung kann in Zukunft möglicherweise durch eine Kombination aus Laser-*Mikrodissektion*-Technologie und Array-Analysen erfolgen, sodass Datenbanken mit einer noch höheren Auflösung von gewebespezifischen Transkriptmengen entstehen und präzisere Aussagen für schwach oder zellspezifisch transkribierte Gene möglich werden.

4.3 Biochemische und funktionelle Eigenschaften des AtGRXS17-Proteins

Die oben ausgeführten Transkriptionsanalysen legen bereits eine Funktion des AtGRXS17 in der pflanzlichen Differenzierung nahe. Zur weiteren Funktionsaufklärung wurde das AtGRXS17-Protein in dieser Arbeit genauer analysiert. Es konnten neben der Bindung eines Co-Faktors und spezifischen Interaktionen mit anderen Proteinen eine an Differenzierungsprozessen beteiligte regulatorische Funktion des AtGRXS17 identifiziert werden (vgl. 3.3.2, 3.4 & 3.5). Die Fähigkeit der Grx-HD des AtGRXS17-Proteins, [2Fe-2S]-Cluster zu binden, integriert das AtGRXS17-Protein in die Gruppe der [2Fe-2S]-Cluster-bindenden Grx-Proteine. Die nachgewiesene Kernlokalisation des AtGRXS17 sowie die spezifische Interaktion in diesem Kompartiment mit einem Transkriptionsfaktor lassen einen regulativen Einfluss auf die Transkription erkennen (vgl. 3.4.3).

4.3.1 Dimerisierung und [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung in AtGRXS17

Die Grx-HD des AtGRXS17 besitzen die Eigenschaft, [2Fe-2S]-Cluster zu binden zu können (vgl. 3.3.2). Dadurch stellt sich die Frage nach der Funktion des Co-Faktors. Das AtGRXS17 kann in der Zelle als Dimer und wahrscheinlich auch als Monomer vorliegen. Der dimere Zustand des AtGRXS17 ermöglicht die Bindung von [2Fe-2S]-Clustern in den Grx-HD. Die Einlagerung des [2Fe-2S]-Clusters wird vermutlich unter der Beteiligung von je zwei GSH-Molekülen ermöglicht, wie es für alle [2Fe-2S]-Cluster-tragenden Grx typisch ist. Aufgrund der Analysen der AtGRXS17-Mutanten im Bindeverhalten von [2Fe-2S]-Clustern kann eine Kopf-an-Kopf-Orientierung der AtGRXS17 im dimeren Zustand angenommen werden (vgl. 3.3.2). Für das zu AtGRXS17 homologe humane GRX3 wird eine ähnliche Orientierung angenommen (HAUENHORST *ET AL.*, 2010). Jedoch wird für das humane GRX3 eine Dimerisierung durch die [Fe-S]-Cluster-Einlagerung erreicht. Diese Art der Dimerisierung ist bisher für alle Grx mit [Fe-S]-Cluster beschrieben (vgl. 1.1.3). Die

AtGRXS17-Dimere können jedoch auch ohne [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung gebildet werden (vgl. 3.3.3). Für andere [2Fe-2S]-Cluster-bindende Grx-Proteine wurden sogar höhermolekulare Strukturen beschrieben. Das humane Grx5 sowie das aus Hefe stammende Grx6 können als Tetramere vorliegen. Ob diese höhermolekularen Strukturen in Abhängigkeit von der [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung erreicht werden, oder auch ohne [2Fe-2S]-Cluster erreicht werden können, ist bisher noch nicht abschließend geklärt (JOHANSSON *ET AL.*, 2011; MESECKE *ET AL.*, 2008). Diese [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung in Grx-Proteinen kann nach bisherigen Erkenntnissen drei verschiedene Funktionen haben, wie Inaktivierung der Oxidoreduktaseaktivität, Verteilung von [2Fe-2S]-Clustern sowie die Regulation der Transkription durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (vgl. 1.1.3).

Allen bisher bekannten Grx-[2Fe-2S]-Cluster-haltigen Strukturen ist gemein, dass sich zwei Grx zusammenlagern und dass je eines der Cysteine der aktiven Zentren und je eines der Cysteine der zwei GSH-Moleküle die Koordination des [2Fe-2S]-Clusters übernehmen. Da durch die [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung die aktiven Zentren der Grx blockiert sind, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die [2Fe-2S]-Cluster-tragenden Grx mit Oxidoreduktase-Aktivität auf diese Weise in ihrer Aktivität reguliert sein könnten. Durch die GSH-Beteiligung an der Koordinierung der [2Fe-2S]-Cluster wurde so ein direkter Zusammenhang mit dem GSH-Status des entsprechenden Kompartiments hergestellt. Unter oxidativen Bedingungen verschiebt sich das zelluläre GSH/GSSG-Verhältnis zum GSSG, die [2Fe-2S]-Cluster werden freigesetzt und die Grx liegen als redox-aktive Monomere vor (LILLIG *ET AL.*, 2006). Das Fehlen einer Oxidoreduktase-Aktivität für das AtGRXS17-Protein im Insulin-Assay (vgl. 3.3.5) deutet darauf hin, dass ein Verlust des [2Fe-2S]-Clusters nicht mit der Aktivierung dieser Funktion in Verbindung stehen kann und das AtGRXS17 zu einer anderen Gruppe der [2Fe-2S]-Cluster-tragenden Grx gehört.

Eine andere Gruppe der [2Fe-2S]-Cluster-Grx wird mit der Verteilung von [2Fe-2S]-Clustern in Verbindung gebracht und ist in verschiedenen Organismen unterschiedlich gut untersucht. Die Grx5-Null-Mutante aus *S. cerevisiae* kann unter aeroben Bedingungen nicht wachsen. Neben einer Ansammlung von [2Fe-2S]-Clustern in den Mitochondrien konnte das Fehlen von [2Fe-2S]-Clustern in typischen [Fe-S]-Cluster-beinhaltenden Proteinen nachgewiesen werden (RODRIGUEZ-MANZANEQUE *ET AL.*, 2002). Diese Befunde brachten die Grx mit der zellulären Verteilung von [2Fe-2S]-Clustern in Zusammenhang. Die ScGrx5-Null-Mutante wurde in verschiedenen Studien verwendet, um die Fähigkeit zur [2Fe-2S]-Cluster-Bindung von verschiedenen pflanzlichen Grx durch

Komplementations-Studien zu testen. Auch die einzelnen Grx-HD I bis III des AtGRXS17-Proteins wurden jeweils einzeln getestet und konnten die Hefe-Mutante verschieden gut komplementieren (BANDYOPADHYAY *ET AL.*, 2008). Die verwendete ScGrx5-Null-Mutante hat jedoch weiterhin die zwei ScGRX3 und 4 in ihrem Genom, die den ScGrx5-Null-Phänotyp nicht revertieren können. Diese beiden Proteine sind dem AtGRXS17 durch den homologen Aufbau aus je einer Trx-HD und einer Grx-HD ähnlicher als das in den ScGrx5-Null-Mutante deletierte ScGrx5. Möglicherweise sind nur die einzelnen Grx-HD des AtGRXS17 und nicht das vollständige AtGRXS17 in der Lage diesen Phänotyp zu komplementieren. Für das humane GRX3 wird trotz seines zu AtGRXS17 homologen Aufbaus eine essentielle Rolle in der [Fe-S]-Cluster-Verteilung angenommen (LILL *ET AL.*, 2009). *In vivo* kann das GRX3 Heterodimere mit anderen an der [2Fe-2S]-Cluster-Verteilung beteiligten Proteinen bilden (LI & OUTTEN, 2012; LI *ET AL.*, 2012). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Grx 3-KO-Mäuse einen ähnlichen letalen Phänotyp aufweisen wie Mäuse denen andere, an der Verteilung von [Fe-S]-Clustern beteiligte Proteine fehlen (CHA *ET AL.*, 2008). In *A. thaliana* AtGRXS17-KO-Pflanzen kann kein Anzeichen von Eisenmangel festgestellt werden. Selbst bei Wachstum auf Eisen-Mangelmedium entwickeln sich die AtGRXS17-KO-Pflanzen ohne Unterschiede zu den WT-Pflanzen (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise kommt der Defekt von AtGRXS17 bei der Verteilung von [2Fe-2S]-Clustern nicht zum Tragen, da es in pflanzlichen Organismen insgesamt drei Mechanismen zur [Fe-S]-Cluster-Bildung gibt, während andere Organismen ein bis zwei [2Fe-2S]-Cluster-Synthese-Wege besitzen (BALK *ET AL.*, 2011). Die drei Wege funktionieren in Pflanzen unabhängig voneinander und sind in unterschiedlichen Kompartimenten (Zytosol, Mitochondrien und Chloroplasten) zu finden. Da AtGRXS17 nicht in den Mitochondrien oder den Chloroplasten vorkommt, übernehmen vermutlich in diesen Systemen andere für die jeweiligen Kompartimente spezifische Grx-Proteine die Verteilung der [Fe-S]-Cluster.

Für das zu AtGRXS17 homologe Grx4 aus *S. cerevisiae*, das aus je einer Trx-HD und Grx-HD besteht, konnte eine Interaktion der Trx-HD mit den Transkriptionsfaktoren FEP1 und PHP4 nachgewiesen werden. In Abhängigkeit vom Status der [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung in der Grx-HD wird die regulative Funktion des GRX4 verändert und steuert so die Transkription von Eisen-Transportproteinen (MERCIER & LABBE, 2009; JBEL *ET AL.*, 2011). In dieser Arbeit konnte NF-YC11, ein homologer Transkriptionsfaktor des PHP4, als Interaktionspartner von AtGRXS17 identifiziert werden. Dieser Befund und die nicht auf

[2Fe-2S]-Cluster-Bindung basierende Dimerbildung macht einen analogen regulativen Mechanismus über die [2Fe-2S]-Cluster-Bindung für das AtGRXS17 wahrscheinlich. Die Interaktion von AtGRXS17 mit dem in dieser Arbeit identifizierten Transkriptionsfaktor wird weiter unten ausführlich erörtert (vgl. 4.3.3.2).

Inwieweit diese drei Mechanismen zur [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung auf einzelne Grx beschränkt sind, ist noch nicht abschließend geklärt. Möglich wäre, dass einzelne Grx einem oder mehreren dieser Mechanismen angehören. Das AtGRXS17 ist höchstwahrscheinlich an dem Mechanismus zur Beeinflussung der Transkription durch Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren beteiligt (vgl. 4.3.3.2). Der Mechanismus zur [2Fe-2S]-Cluster-Verteilung erscheint durch die Bindung von [2Fe-2S]-Clustern in die Grx-HD möglich, ist aber noch nicht hinreichend geklärt, während der Mechanismus zur Aktivierung der Oxidoreduktase-Aktivität für AtGRXS17 aufgrund der in dieser Arbeit erbrachten Resultate unwahrscheinlich erscheint.

4.3.2 Kerntranslokation von AtGRXS17

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur subzellulären Lokalisation von AtGRXS17 belegen, dass das AtGRXS17-Protein sowohl im Zytosol als auch im Zellkern lokalisiert ist (vgl. 3.2.4). Der Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC) reguliert in eukaryotischen Zellen den bidirektionalen Transport von Proteinen zwischen dem Zytosol und dem Zellkern. Relativ kleine Moleküle bis zu einer Größe von 45 bis 50 kDa können durch diese Poren passiv diffundieren (JANS, 1995; MACARA, 2001). Größere Moleküle werden aktiv transportiert und benötigen eine entsprechende Erkennungssequenz (*nuclear localization signal*, NLS). Anders als Transitsequenzen, die für den Transport in Organellen wie bspw. Mitochondrien oder Chloroplasten benötigt werden, besteht die NLS nicht aus einer der Proteinsequenz vorgelagerten Aminosäuresequenz, die beim Transit entfernt wird (LI & CHIU, 2010; CARRIE ET AL., 2009), sondern aus einer Aminosäureabfolge innerhalb des Proteins, die einen hohen Anteil an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin aufweist. An die NLS binden Importine, die dann den Transport durch den NPC vermitteln (ADAM ET AL., 1995; GORLICH ET AL., 1995; ALLEN ET AL., 2000).

Die Aminosäuresequenz des AtGRXS17 enthält keine NLS. Allerdings ist neben der klassischen NLS (cNLS) eine Translokation von Proteinen in den Zellkern mittels einer

NLS-like oder ohne eigene NLS möglich (GOLDFARB *ET AL.*, 1986; NARDOZZI *ET AL.*, 2010). NLS-like-Sequenzen sind dem cNLS-Motiv im Aufbau ähnlich und können meist durch Modifikationen wie bspw. durch Phosphorylierung als funktionelle NLS erkannt werden (JANS *ET AL.*, 1996). In dieser Arbeit wurden mittels Massenspektrometrie aus den *pulldown*-Experimenten mit AtGRXS17 verschiedene Kinasen als Interaktionspartner für AtGRXS17 identifiziert (vgl. 3.4.2). Eine Phosphorylierung einer putativen NLS-like-Sequenz des AtGRXS17 könnte über diese Kinasen erfolgen. Das AtGRXS17 bildet sowohl im Zytosol als auch im Zellkern Dimere aus (vgl. 3.3.4). Eine Dimerisierung von AtGRXS17 könnte eine speziellen Form der NLS-like, die *dimer-specific*-NLS (dsNLS), generieren, wie sie bspw. für den Transkriptionsfaktor STAT1 (SIGNAL-TRANSDUKTOR UND AKTIVATOR DER TRANSKRIPTION 1) beschrieben worden ist (NARDOZZI *ET AL.*, 2010). Die Funktionsfähigkeit der dsNLS der STAT1 ist zusätzlich zur Dimerisierung vom Phosphorylierungszustand abhängig.

Auch die Translokation von Proteinen in den Zellkern ohne eigene NLS durch Interaktion mit Proteinen, die ein NLS besitzen, ist beschrieben. Ein Beispiel für Proteine, deren Kernlokalisierung durch eine Interaktion in Kombination mit äußeren Faktoren erfolgt, sind die FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL 1 (FHY1) Proteine, die mit den FHY1-like (FHL) im Zytosol einen Komplex bilden. Bei entsprechender Belichtung kommt es zu einer Interaktion des FHY1/FHL-Komplex mit der PFR-Form vom Phytochrom A (PHYA_{PFR}). Erst dieser Dreierkomplex kann in den Kern transportiert werden und dort regulative Aufgaben übernehmen (KEVEI *ET AL.*, 2007). Regulativ wirksame Proteinkomplexe machen auf diese Weise die Integration von Signalkaskaden auf molekularer Ebene möglich, sodass eine entsprechende Reaktion der Pflanzen in Form von einer Anpassung der Genexpression erfolgen kann. In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte in Epidermis-Zellen von Tomatenpflanzen, die mit einem AtGRXS17-GFP-Konstrukt transient transformiert wurden, ebenfalls ein Kernlokalisierungssignal generiert werden. Jedoch wurde hier eine von der Außentemperatur abhängige Translokation beobachtet. Dazu wurden die transformierten Tomaten-Epidermis-Zellen auf 45°C erhitzt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (LI *ET AL.*, 2012). In unseren Untersuchungen an transient transformierten *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten liegt AtGRXS17 bei 25 °C sowohl im Zytosol als auch im Zellkern vor (Abb. 17). Eine Temperaturinduzierte Kernlokalisierung ist daher auszuschließen. LI *ET AL.* (2012) konnten durch die Temperaturerhöhung eine Signalkaskade auslösen, die die gleichen Auswirkungen auf das

AtGRXS17-Protein hat wie die transiente Expression von AtGRXS17 in isolierten Protoplasten. Bei erhöhten Temperaturen erfolgt bei Pflanzen die Induktion von Stresssignalen, was mit der Bildung von ROS einhergeht (VOLKOV *ET AL.*, 2006). Wenn die AtGRXS17-Proteine in Abhängigkeit von Stresssignalen in den Kern transportiert werden, kann davon ausgegangen werden, dass die in unseren Analysen verwendeten isolierten Mesophyll-Protoplasten bereits in einem gestressten Zustand vorlagen. Die Ursache dieses Zustands ist wahrscheinlich auf den Verlust der strukturellen Integrität des Zellverbandes bei der Protoplastenisolierung zurückzuführen. Möglicherweise erzeugen die Erhöhung der Temperatur und die Isolierung der Protoplasten ähnliche Signale, worauf das AtGRXS17-Protein in den Kern transportiert wird. Solche kombinatorischen Kerntransporte von Proteinkomplexen sind ein Teil der regulativ wirksamen molekularen Signalverarbeitungssysteme. Neben licht- und temperaturabhängigen sind eine Vielzahl an Signalkaskaden beschrieben, die bspw. vom Zellzyklus, anderen abiotischen Faktoren oder vom Redox-Status der Zellen abhängig sind (WEIS, 2003; WENTE, 2000; APEL & HIRT 2004; KODIHA *ET AL.*, 2011).

Ein Protein, das auf eine noch nicht näher untersuchte Art für den Kerntransport von AtGRXS17 sorgen könnte, ist das NUCLEAR PORE ANCHOR (NUA 1; At1g79280), da es ein Bestandteil des NPC ist. NUA 1 wurde ebenfalls in den ESI-MS-Analysen der *pull-down-Assays* identifiziert. Da jedoch die Abdeckung der identifizierten Peptide gering ist (vgl. Tabelle 34) wurde die Interaktion nicht in weiteren Experimenten mit AtGRXS17 verifiziert. NUA 1, das auch als TRANSLOCATED PPROMOTER REGION (AtTPR) bezeichnet wird, ist mit dem inneren Filament des *nuclear basket* des Kernporenkomplexes assoziiert (CORDES *ET AL.*, 1997; FROSST *ET AL.*, 2002; KRULL *ET AL.*, 2004). Für NUA 1 sind Funktionen als Regulator für den Export von mRNA sowie für die Organisation der Telomere und die Anordnung der Spindelpole beschrieben. NUA 1-KO-Pflanzen zeigen neben komplexen Entwicklungsphänotypen sowohl unter LT als auch unter KT eine verfrühte Blühinduktion (JACOB *ET AL.*, 2007; XU *ET AL.*, 2007 a & b). Die mögliche Interaktion von AtGRXS17 mit NUA 1 sowie deren Beteiligungen an der Blühinduktion sollten in zukünftigen Analysen näher untersucht werden. Weitergehende Verifikationen der Interaktion sowie phänotypische Analysen der in anderen Studien verwendeten NUA1-KO-Pflanzen könnten zur Klärung dieser Hypothese beitragen. Neben der Translokation von AtGRXS17 wäre auch eine regulative Funktion durch die Interaktion von NUA1 mit AtGRXS17 möglich. So könnte auch eine Modifikation von NUA 1 durch AtGRXS17 erfolgen, sodass die bereits

beschriebenen Funktionen des NUA 1 beim mRNA-Export oder in der Zellteilung beeinflusst werden könnten.

Auch die mögliche Abhängigkeit der Kernporentranslokation vom Status der in den Grx-HD gebundenen [2Fe-2S]-Cluster könnte einen regulativen Einfluss auf den Transit in den Zellkern haben. Für GRX4 aus *S. cerevisiae* konnte nachgewiesen werden, dass die [2Fe-2S]-Cluster der Grx-HD einen Einfluss auf die Bindeeigenschaften von GRX4 auf die Interaktion mit einem CCAAT-Transkriptionsfaktor hat und so die Transkription spezifischer Gene zur Eisenaufnahme reguliert wird (JBEL *ET AL.*, 2012) (vgl. 4.3.3.2). Analog zu dieser Interaktion könnte auch eine Bindung an ein mit NLS ausgestattetem Protein erfolgen und den Transport dieser durch den Kernporenkomplex ermöglichen.

Die Tatsache, dass AtGRXS17 im Zellkern nachgewiesen werden konnte, macht es für das AtGRXS17 wahrscheinlich, dass einer dieser weiter oben beschriebenen Mechanismen oder eine Kombination aus diesen zu einer Kernlokalisierung des AtGRXS17 führt. Die

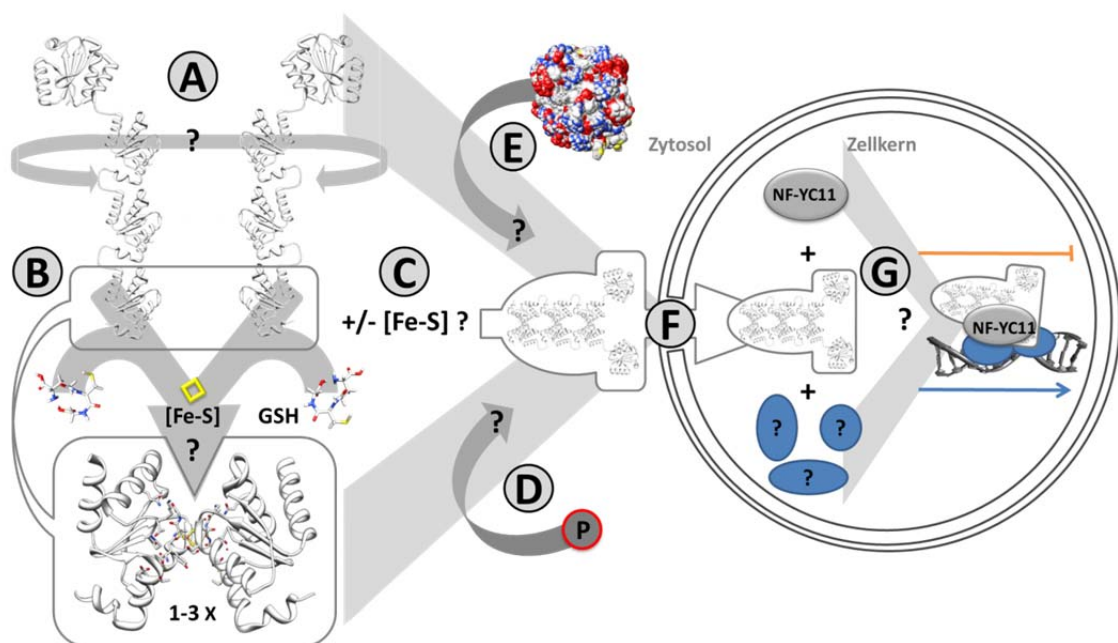


Abb. 39: Hypothetische Mechanismen zur Kerntranslokation des AtGRXS17. Die Kernlokalisierung von AtGRXS17 wurde in dieser Arbeit belegt. Der Mechanismus zur Kerntranslokation bleibt jedoch spekulativ. Aufgrund der Struktur von AtGRXS17 können jedoch verschiedene Mechanismen zur Translokation von AtGRXS17 angenommen werden. A) Eine Dimerisierung könnte eine funktionsfähige NLS zur Folge haben. B) Auch die Einlagerung von [2Fe-2S]-Clustern in die drei Grx-HD könnte die Kernlokalisierung beeinflussen. C) Dabei ist noch nicht geklärt, ob die Anzahl der [2Fe-2S]-Cluster bei der Kernlokalisierung eine Rolle spielt. D) gibt die mögliche Phosphorylierung von AtGRXS17 wieder, die durch eine der zahlreichen Kinase-Interaktionen von AtGRXS17 möglich erscheint und einen Einfluss auf den Kerntransport haben könnte. E) Die monomere Form des AtGRXS17 als auch die dimere Form könnte über eine Interaktion mit einem weiteren noch nicht identifizierten NLS-tragenden-Protein in den Kern gelangen (F). G) Im Zellkern ergeben sich weitere Möglichkeiten für das AtGRXS17 zur Regulation der Transkription über Interaktionen mit anderen Proteinen (vgl. 4.3.3.2).

möglichen Mechanismen zur Kernlokalisierung von AtGRXS17 sind in der Abb. 39 zusammengefasst.

Das Zusammenlagern zu AtGRXS17-Dimeren und die Kernlokalisierung von AtGRXS17-Proteinen, die in dieser Arbeit durch verschiedene Techniken belegt werden konnten, sind möglicherweise eine Reaktion auf eine oder mehrere noch nicht identifizierte Signalkaskaden. Die Struktur von AtGRXS17 und die Möglichkeit zur GSH-vermittelten [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung sowie die weiter unten ausführlicher besprochene Kinasen- und Transkriptionsfaktor-Interaktion eröffnen eine Vielzahl an Möglichkeiten, durch die eine NLS-like für das AtGRXS17-Protein generiert werden könnte, die eine Kerntranslokalisierung von AtGRXS17 ermöglicht.

4.3.3 Mögliche Interaktionspartner von AtGRXS17

Der Begriff „*Moonlighting* Protein“ wurde am Ende des letzten Jahrhunderts für Proteine mit mehr als einer Funktion geprägt und setzt dem Verständnis, dass jedes Protein nur eine Funktion besitzt, ein Ende (JEFFERY, 1999). Proteine können unterschiedliche Bindungen mit verschiedenen Proteinen eingehen und somit auch vielfältige Funktionen haben. Häufig werden Proteine durch diese Interaktionen modifiziert und so in ihrer Aktivität moduliert. Die Identifizierung von Interaktionspartnern trägt dazu bei, neue Erkenntnisse über die Funktion eines Proteins zu erlangen und sie besser in das Netzwerk der Proteininteraktionen einordnen zu können. Proteine funktionieren häufig in großen, aus mehreren verschiedenen Komponenten bestehenden Proteinkomplexen. Mittels Affinitätschromatographie und anschließender ESI-MS-Analysen (vgl. 3.4.2) konnten 27 Interaktionspartner für das AtGRXS17-Protein identifiziert werden. Durch die hohe Anzahl an identifizierten Proteinen scheint es möglich, dass mit dieser Methode ein Proteinkomplex identifiziert wurde, dessen einzelne Komponenten nicht unbedingt direkt mit AtGRXS17 interagieren. Mittels der Internet-basierten-Applikation *interaction-viewer* (http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/arabidopsis_interactions_viewer.cgi) konnte ermittelt werden, dass 14 der 27 für AtGRXS17 als Interaktionspartner identifizierten Proteine über weitere, in der Datenbank durch Interlog-Studien oder durch Co-Expressionen identifizierte Proteine ein Protein-Netzwerk bilden (Abb. 40). Interlog-Proteine sind homologe Proteine aus anderen Organismen, für die mittels verschiedener Methoden bereits Interaktionen mit anderen Proteinen nachgewiesen werden konnten.

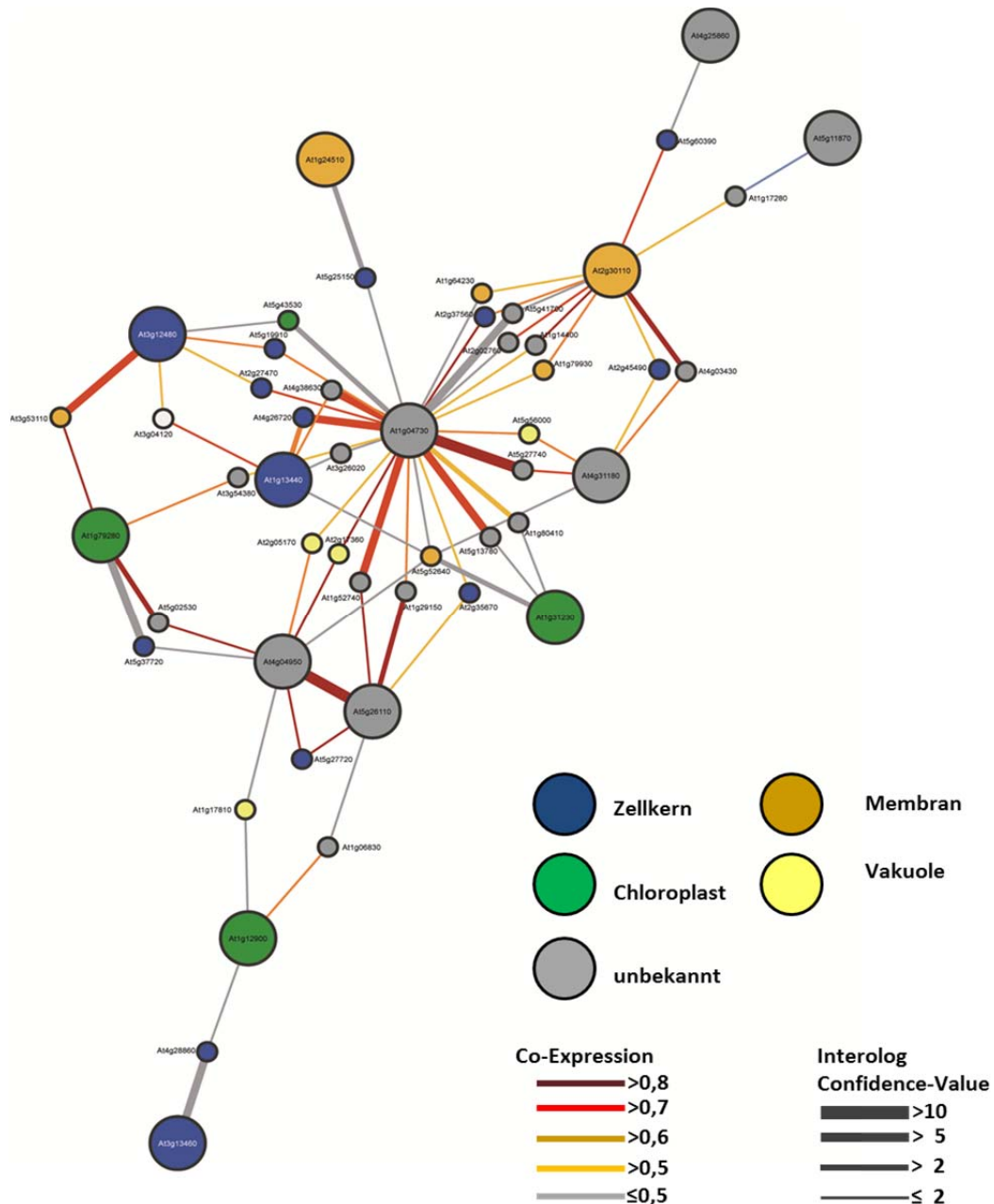


Abb. 40: Netzwerk der bioinformatisch ermittelten Interaktionspartner von den durch Massenspektrometrie identifizierten möglicherweise mit AtGRXS17 interagierenden Proteinen. Mittels der Internet-Applikation *Arabidopsis Interactions Viewer* (<http://bar.utoronto.ca>) konnten insgesamt 35 Proteine (kleine Kreise) den mittels Massenspektrometrie ermittelten Proteinen (große Kreise) zugeordnet werden. Die Farben der einzelnen Kreise geben die vermutete subzelluläre Lokalisation wieder, während die Dicke der Linien die Interlog-Wahrscheinlichkeit und die Linienfarbe die Stärke der Co-Expression angibt.

Diese Interaktionen wurden anschließend anhand von Sequenzähnlichkeiten auf das *A. thaliana*-Proteom übertragen und in einer Datenbank verfügbar gemacht (POPESCU ET AL., 2007, 2009). Besonders die Verbindungen, die sich aus den *Interlog*'s mit den für AtGRXS17 als potentiell identifizierten Interaktionspartnern ergeben, sollten in weitergehenden Analysen betrachtet und verifiziert werden. Dieser Datenbankabgleich

verdeutlicht, dass die in dieser Arbeit ermittelten 14 Proteine zusammen mit den in der Datenbank identifizierten 35 Proteinen einen möglichen Komplex bilden könnten, dessen Funktionen im Folgenden diskutiert werden.

4.3.3.1 Interaktion von AtGRXS17 mit Kinasen

Das mit der höchsten Abdeckung (68 %) durch Massenspektrometrie identifizierte Protein, das im *pull-down*-Experiment an das AtGRXS17 bindet, ist die Kinase At1g50570. Ihre Interaktion mit dem AtGRXS17 wurde *in vivo* durch BiFC-Analysen verifiziert (Abb. 26). Das At1g50570 besitzt zwei C2-Domänen, die auch Bestandteil der PROTEINKINASE C THETA (PKC- Θ) sind, welche für das homologe humane GRX 3-Protein als Interaktionspartner identifiziert wurden (WITTE *ET AL.*, 2000). Die übrige Aminosäuresequenz von At1g50570 weist jedoch keine Ähnlichkeit zur Aminosäuresequenz der PKC- Θ auf. Demnach kommt nur diese Domäne für die Interaktion mit AtGRXS17 in Frage. Die C2-Domänen sind Bestandteil der unterschiedlichsten Proteine. In Pflanzen werden diese Domänen in vier Klassen eingeteilt (KOPKA *ET AL.*, 1998), wobei die Funktion dieser Domäne bis dato wenig erforscht ist (MEIJER & MUNNIK, 2003). Proteinen mit dieser Domäne werden Funktionen in der Abwehr von Pathogenen, in Entwicklungsprozessen und in der Ca^{2+} -abhängigen Phospholipid-Interaktion beim Pollenschlauch-Wachstum zugeordnet (YANG *ET AL.*, 2008). Die C2-Domäne des At1g50570 wird den CaLB-Domänen zugeschrieben (*calcium-dependent lipid-binding domain*; www.arabidopsis.org). In einer Studie wurde eine Interaktion von At1g50570 mit dem Transkriptionsfaktor TGA 2.2 aus Tabak nachgewiesen, welcher mit dem TGA 2 aus *A. thaliana* zu 88 % auf Aminosäureebene identisch ist (AL-ABDALLAT, 2004). TGA-Transkriptionsfaktoren gehören der Klasse der bZIP-Transkriptionsfaktoren an. Mit dem TGA 2 aus *A. thaliana* interagieren im *Hefe-2 Hybrid*-System 17 verschiedene ROXY-Grx (ZANDER *ET AL.*, 2012). Die ROXY-Grx sind ausschließlich bei Landpflanzen zu finden (LEMAIRE, 2004; ROUHIER *ET AL.*, 2006; XING *ET AL.*, 2006). Die evolutive Erweiterung dieser Gruppe durch Genduplikationen der ROXY-Grx, die mit den höheren evolutiven Stufen der Landpflanzen einhergeht und die nachgewiesene Beteiligung der ROXY1 und ROXY2 an der Entwicklung der Petalen von *A. thaliana*-Blüten, verknüpfen die ROXY-Grx mit regulativen Prozessen der Blütenbildung (XING *ET AL.*, 2005; XING *ET AL.*, 2006; XING & ZACHGO, 2008; LI & ZACHGO, 2009; ZIEMANN *ET AL.*, 2009). Die Interaktion über spezifische Aminosäuresequenzen-L**LL- und ALWL-Motive der ROXY

mit den TGA's und anderen Transkriptionsfaktoren macht einen regulativen Einfluss auf die Genexpression deutlich (LI *ET AL.*, 2012). Da in der Sequenz von AtGRXS17 keines dieser Sequenzmotive vorhanden ist und auch keine Interaktion mit einem der TGA's nachgewiesen werden konnte, ist eine direkte Interaktion mit TGA's und somit ein regulativer Einfluss des AtGRXS17 unwahrscheinlich. Vorstellbar ist, dass das AtGRXS17 über die Kinase At1g50570 und mögliche Phosphorylierungs-Kaskaden indirekten Einfluss auf TGA 2 ausübt. In wie weit die Blütenbildung dadurch beeinflusst wird und die dokumentierten Phänotypen der AtGRXS17-KO-Pflanzen hierauf zurückzuführen sind, ist derzeit nicht eindeutig zu beantworten.

4.3.3.2 Interaktionen von AtGRXS17 mit Transkriptionsfaktoren

Das Protein, das mit der zweithöchsten Sequenzabdeckung (59 %) als Interaktionspartner von AtGRXS17 identifiziert werden konnte, ist das *Nuclear-Factor- γ* 11-Protein (NF-YC11; At3g12480) (vgl. 3.4.2). Diese Interaktion konnte in weiteren Analysen mittels BiFC *in vivo* verifiziert werden (Abb. 26). Das NF-YC11 gehört zu der in Eukaryoten hochkonservierten Klasse der *Nuclear Factor γ* -(NF-Y) Transkriptionsfaktoren. Diese Genfamilie wird in der Literatur auch als *CCAAT BOX FACTOR* (CBF) oder *HEME ACTIVATOR PROTEIN* (HAP oder Php) bezeichnet. Es gibt drei verschiedene Untergruppen von NF-Y: NF-YA, NF-YB und NF-YC. Die drei Untergruppen bilden im Zellkern miteinander funktionelle Trimere (MANTOVANI, 1999). Die Bildung von Holotrimeren ist in humanen HeLa-Zell-Systemen und *A. thaliana* gut untersucht (KAHLE *ET AL.*, 2005; HACKENBERG *ET AL.*, 2011). Zunächst binden NF-YB und NF-YC im Zytosol aneinander und werden ausschließlich als Dimer durch einen Importin-13-vermittelten Mechanismus in den Zellkern transportiert. Dort bilden sie einen funktionstüchtigen Komplex mit NF-YA, welches eine NLS-like-Sequenz in seiner Aminosäurekette besitzt und mit Hilfe von Importin β in den Kern gelangt (KAHLE *ET AL.*, 2005). Der sich hieraus ergebende Komplex kann anschließend an CCAAT-Boxen in Promotorregionen der DNA binden (ROMIER *ET AL.*, 2003). Unterschieden werden die NF-Y Untergruppen durch ihre komplexbildenden Binde-Domänen, während der übrige Teil der Aminosäuresequenz hoch konserviert ist (SIEFERS *ET AL.*, 2009). Die NF-Y sind in Pflanzen an einer Vielzahl von essentiellen Prozessen wie der Keimlingsentwicklung (LEE *ET AL.*, 2003), der Trockentoleranz (NELSON *ET AL.*, 2007), der Wurzelknöllchenbildung zur Stickstofffixierung (ZANETTI *ET AL.*, 2010), der Stressantwort (LIU & HOWELL, 2010) und an der photoperiodischen Abhängigkeit der Blühinduktion regulatorisch beteiligt

(WENKEL *ET AL.*, 2006; CAI *ET AL.*, 2007; KUMIMOTO *ET AL.*, 2008; KUMIMOTO *ET AL.*, 2010). In *A. thaliana* gibt es zehn Vertreter der NF-YA-Gruppe und jeweils 13 Vertreter von der NF-YB- und NF-YC-Gruppe, die durch Genduplikationen entstanden sind (SIEFERS *ET AL.*, 2009; WENKEL *ET AL.*, 2006). Die jeweiligen Proteine dieser drei Gruppen sind sehr wahrscheinlich jeweils miteinander kombinierbar. Daraus ergeben sich 1680 (10x13x13) theoretische Möglichkeiten zur Feinregulation der Transkriptmenge der entsprechenden CCAAT-Box-abhängigen Gene (SIEFERS *ET AL.*, 2009).

Ein weiterer Beleg für die Interaktion von AtGRXS17 mit NF-YC11 ist die Tatsache, dass im Hefesystem ebenfalls eine Interaktion von GRX4, welches zu AtGRXS17 homolog ist, mit einem CCAAT-bindenden Transkriptionsfaktor (PHP4) nachgewiesen werden konnte.

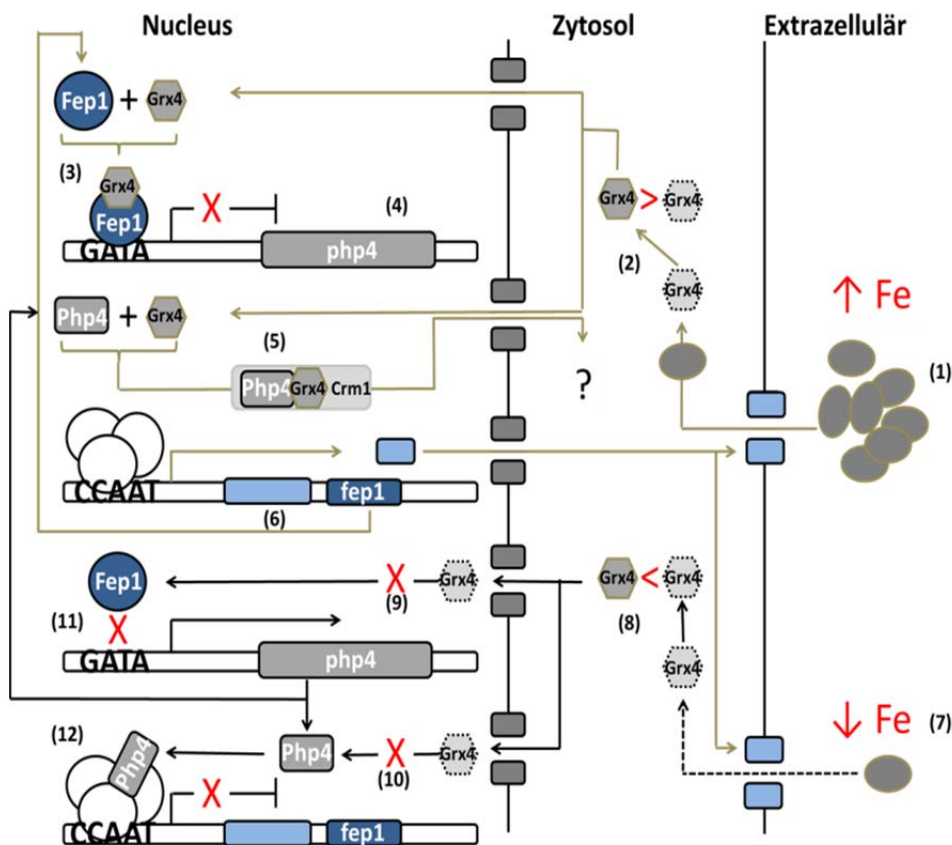


Abb. 41: Schematische Darstellung der GRX4-abhängigen Regulation der Eisenaufnahme in Hefe. Wenn viel Eisen (Fe) zur Verfügung steht (1), bindet GRX4 dieses mittels der Grx-HD (2). [2Fe-2S]-Cluster-GRX4 kann mit FEP1 einen Komplex bilden (3) und wirkt als *silencer* auf die Transkription von *php4* (4). Gleichzeitig bindet [2Fe-2S]-Cluster-GRX4 an PHP4 und beide werden zusammen durch Interaktion mit dem Exportin CRM1 aus dem Nucleus heraustransportiert (5). Dadurch wird die Transkription von eisenaufnehmenden Proteinen und dem Transkriptionsfaktor FEP1 möglich (6). Wenn weniger Fe zur Verfügung steht (7), wird weniger bzw. kein Fe in GRX4 eingebaut (8), und GRX4 kann weniger gut an FEP1 und an PHP4 binden (9 & 10). Dies hat zur Folge, dass Fep1 nicht mehr an die GATA-Bindestelle binden kann (11) und so die *PHP4*-Transkription ermöglicht wird. PHP4 kann nun an den CCAAT-bindenden Komplex binden und die Transkription der eisenaufnehmenden Gensequenzen und *FEP1* unterdrücken (13) (Modifiziert nach MERCIER *ET AL.*, 2009 und JBEL *ET AL.*, 2011).

Zusammen mit FEP1, einem Transkriptionsfaktor, der an die GATA-Domäne in Promotorregionen binden kann, übernehmen diese Proteine die transkriptionale Regulation von eisenaufnehmenden Proteinen, indem sie eine Feedbackschleife bilden (MERCIER *ET AL.*, 2009). Das GRX4 aus *S. cerevisiae* ist einer der beiden homologen Vertreter von AtGRXS17 im Hefesystem. Es besteht aus der für ursprünglichere Organismen typischen Kombination aus einer Trx-HD und einer Grx-HD. Die Grx-HD des GRX4 ist in der Lage [2Fe-2S]-Cluster zu binden. PHP4 gehört wie NF-YC11 zur Klasse der CCAAT-bindenden Transkriptionsfaktoren. PHP4 bindet nicht selber im Promotorbereich, sondern an den Dreierkomplex aus strukturell sehr ähnlichen weiteren CCAAT-Transkriptionsfaktoren (PHP2/3/5). Durch diese Bindung blockiert PHP4 die Initiation der Transkription von eisenaufnehmenden Proteinen sowie der von *FEP1*. Findet eine Interaktion von PHP4 mit GRX4 im Zellkern statt, bindet dieser Komplex an das Exportin CHROMOSOME REGION MAINTENANCE1 (CRM1) und wird aus dem Zellkern befördert, wodurch die Initiation des vorher blockierten Komplexes induziert und somit die Transkription ermöglicht wird (WENKEL *ET AL.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass sich GRX4, abhängig vom inkorporierten [2Fe-2S]-Cluster in die Grx-HD, unterschiedlich gut an den GATA-bindenden Transkriptionsfaktor FEP1 anlagern kann (JBEL *ET AL.*, 2011). Wenn GRX4 ein [2Fe-2S]-Cluster gebunden hat, bindet es besser an FEP1, und dieser Komplex wiederum bindet besser an die GATA-Binderegion. Dies hat zur Folge, dass die Transkription von *php4*-mRNA unterdrückt wird. Wenn die verfügbare Eisenmenge wieder abnimmt, bindet GRX4 durch den Verlust der [2Fe-2S]-Cluster schlechter an FEP1 und folglich wird mehr *PHP4*-mRNA transkribiert und kann nach der Translation wieder die Transkription der eisenaufnehmenden Gene unterdrücken (Abb. 41) (MERCIER *ET AL.*, 2009; JBEL *ET AL.*, 2011).

In dieser Arbeit konnte eine Interaktion von AtGRXS17 mit dem NF-YC11 mittels *pull-down*-Assay und anschließender ESI-MS-Analyse identifiziert werden. Beide Proteine konnten mittels GFP-Fusionsstudien fluoreszenzmikroskopisch sowohl im Zytosol als auch im Zellkern von transient transformierten *A. thaliana*-Protoplasten nachgewiesen werden. BiFC-Interaktionsstudien belegen eine spezifische ausschließliche Interaktion von AtGRXS17 und NF-YC11 im Zellkern von transient transformierten Protoplasten (vgl. 3.4.3). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass AtGRXS17 und NF-YC11 im Zellkern auf Interaktion basierende Funktionen übernehmen. Die Ähnlichkeit der Interaktionen von GRX4 in Hefe mit PHP4 und AtGRXS17 mit NF-YC11 in *A. thaliana*

legen nahe, dass AtGRXS17 und NF-YC11 in *A. thaliana* eine ähnliche Funktionsweise haben. Einen weiteren Zusammenhang stellen die in der Promotorregion von NF-YC 11 gefundenen GATA-Bindestellen (<http://www.athamap.de>) her. In zukünftigen Analysen sollte daher geklärt werden, ob es in *A. thaliana* ein zu FEP1 homologes Protein gibt, das an AtGRXS17 binden und so eine vergleichbare *Feedback*-Schleife zusammen mit PHP4 und AtGRXS17 generieren kann. Möglicherweise konnte in den durchgeführten *pull-down*-Assays ein solcher an GATA-Sequenzen bindender Transkriptionsfaktor nicht identifiziert werden, da das eingesetzte AtGRXS17 keine [2Fe-2S]-Cluster inkoooperiert hatte. Für das SvGRX4 konnte ein durch den [2Fe-2S]-Cluster-Status verändertes Bindeverhalten an PHP4 gefunden werden (JBEL *ET AL.*, 2012). Es ist daher vorstellbar, dass auch Interaktionen mit weiteren Proteinen von diesem Status des AtGRXS17 abhängig sind und nur binden, wenn [2Fe-2S]-Cluster in AtGRXS17 eingelagert sind. Ob die Anzahl und Position der [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerungen in das AtGRXS17 einen Einfluss auf die spezifische Bindeeigenschaften haben, könnte in weiteren Interaktionsstudien mit AtGRXS17, welches [2Fe-2S]-Cluster eingelagert hat und den bereits erstellten AtGRXS17-Cystein-Mutanten mit überprüft werden (vgl. 3.3.1).

Für verschiedene Mitglieder der NF-Y-Transkriptionsfaktoren aus *A. thaliana* kann ein enger regulativer Zusammenhang bei der photoperiodischen Blühinduktion hergestellt werden. Möglicherweise ist ein vergleichbares System, das in *S. cerevisiae* die Eisenaufnahme reguliert, in *A. thaliana* an der Blühinduktion beteiligt. Dieser mögliche Mechanismus wird im folgenden Kapitel genauer erörtert.

4.4 Phänotypen der AtGRXS17-KO-Pflanzen

Pflanzen sind sessile Organismen und müssen somit die Fähigkeit aufweisen sich variierenden Umwelteinflüssen anzupassen. Pflanzen besitzen verschiedene Mechanismen, um auf kurzfristige Änderungen von abiotischen Faktoren, wie Schwankungen in der Lichtintensität oder der Temperatur, schnell reagieren zu können. Diese Mechanismen wie bspw. die Mehler-Reaktion, die Photorespiration oder das Malatventil laufen in der Regel auf posttranslationaler Ebene ab (SCHEIBE, 2004). Bei länger anhaltenden oder sich generell verändernden Bedingungen kommt es zu elementaren Stoffwechselanpassungen mit einer zu Grunde liegenden veränderten Genexpression. Die

dadurch veränderte Proteinausstattung beeinflusst die weitere Entwicklung der Pflanzen nachhaltig (SCHEIBE *ET AL.*, 2005; BECHER *ET AL.*, 2006).

Bei AtGRXS17-KO-Pflanzen kommt es im Vergleich zu den entsprechenden WT-Pflanzen ausschließlich unter LT-Bedingungen zu signifikant abweichenden Phänotypen. Dies belegt, dass AtGRXS17 ein elementarer Bestandteil des Proteoms von *A. thaliana* im LT ist. Die Transkript-Analysen (vgl. 3.1.3) zeigen allerdings, dass AtGRXS17 nur leicht in seiner Transkriptmenge reguliert wird. Dementsprechend muss die Aktivität des AtGRXS17 durch eine von der Lichtperiode abhängigen, posttranskriptionale Modifikation reguliert sein oder spezifische Interaktionspartner werden nur im LT transkribiert bzw. es kommt nur im LT zu einer entsprechenden Interaktion.

Die beobachteten phänotypischen Abweichungen der GRXS17-KO-Pflanzen im LT sind vielfältig und können in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Sie betreffen jeweils einen spezifischen Differenzierungsprozess in der Entwicklung der *A. thaliana*-Pflanzen. Signifikant betroffen sind der Prozess der Blühinduktion sowie der der Blütenbildung in den AtGRXS17-KO-Pflanzen. Diese beiden Phänotypen werden im Folgenden bezogen auf das Fehlen von AtGRXS17 in den KO-Pflanzen diskutiert.

4.4.1 Rolle von AtGRXS17 an der Blühinduktion im Langtag

Pflanzen registrieren die Jahreszeiten durch die unterschiedlich andauernden Dunkelphasen zwischen den Tagen. Der komplexe Vorgang zur Detektion der Licht/Dunkelperioden ist entscheidend, um verschiedene Entwicklungsstufen zu den passenden Zeitpunkten einzuleiten. Die Blühinduktion ist einer der essentiellen Vorgänge in der Entwicklung einer Pflanze, da der Blühzeitpunkt eine elementare Bedeutung für Menge und Qualität des Saatguts und somit für den reproduktiven Erfolg der Pflanze hat. Im Pflanzenreich haben sich daher verschiedene Strategien zur Anpassung an die vorherrschenden Lichtperioden ausgebildet. Pflanzen werden als KT-Pflanze oder LT-Pflanzen bezeichnet, je nachdem an welche Licht/Dunkelperioden sie angepasst sind. Zusätzlich wird innerhalb dieser Pflanzengruppen zwischen einer obligaten und fakultativen Anpassung unterschieden. *A. thaliana* ist eine fakultative LT-Pflanze, die allerdings nach einer längeren Vegetationsdauer auch im KT blühen kann (KOORNNEEF *ET AL.*, 1998).

Die Umstellung von der vegetativen zur generativen Phase ist mit einer unumkehrbaren genetischen Neuordnung des Sprossapikalmeristems (SAM) verbunden (KAUFMAN *ET AL.*, 2010). Pflanzen haben für die Koordinierung dieses Vorganges ein ausgeklügeltes System evolviert. Es sind bisher sechs Faktoren bekannt, die für diese Transformation von entscheidender Bedeutung sind. Die Vernalisierung, die Photoperiode und die Reaktion auf moderate Änderungen in der Umgebungstemperatur (*ambient temperature*) sind Faktoren, die auf saisonale Schwankungen reagieren und die daraus gewonnenen Informationen in das System zur Blühinduktion integrieren. Die anderen drei Faktoren die eine Blühinduktion einleiten können, ergeben sich aus endogenen- und entwicklungsbedingten Faktoren. Diese beinhalten den autonomen, den gibberellinsäureabhängigen und den altersbedingten Signalweg (WELLMER & RIECHMANN, 2010). Bis auf den altersbedingten Signalweg wirken alle Faktoren in den Blättern der Pflanze. Der altersbedingte Faktor steuert einen Signalweg, der sich im SAM befindet und direkten Einfluss auf die Blühinduktion nehmen kann. Alle im Blatt ablaufenden Wege zur Induktion münden in der Bildung des die Transkription beeinflussenden Proteins FLOWERING LOCUS 1 (FT). Das FT-Protein ist mobil und kann über das Phloem in das SAM transportiert werden. Hier sorgt FT durch die Bildung eines Komplexes mit dem bZIP-Transkriptionsfaktor FD (At4g35900) über eine Transkriptionsfaktor-Signalkaskade für die Induktion der an der Umstellung zur Blühinduktion beteiligten Blüten-Identitäts-Gene APETALA1 (AP1) und LEAFY (LFY).

Die von der Photoperiode abhängige Blühinduktion ist für Pflanzen, die an Regionen mit wechselnden Jahreszeiten angepasst sind, der Hauptfaktor für die Umstellung von der vegetativen zur generativen Phase (BOSS *ET AL.*, 2004). Diese Umstellung wird durch verschiedene lichtwahrnehmende Sempigmente und der zirkadianen inneren Uhr gesteuert. Eine zentrale Rolle in diesem Prozess nimmt der Transkriptionsfaktor CONSTANS (CO) ein. Dieser wird in Abhängigkeit von der zirkadianen Uhr nach einer ca. 12 stündigen Lichtphase verstärkt transkribiert. Das resultierende CO-Protein wird im Dunkeln schnell abgebaut, sodass es in einer kurzen Lichtperiode nicht akkumuliert. Ist die Photoperiode lang genug, steigt die Menge des CO-Proteins an und wird regulatorisch wirksam. CO bildet mit verschiedenen NF-YB- & NF-YC-Transkriptionsfaktoren einen Komplex (NF-YB/ NF-YC/ CO-Komplex), der die Transkription von FT ermöglicht (WENKEL *ET AL.*, 2006; CAI *ET AL.*, 2007; KUMIMOTO *ET AL.*, 2008; KUMIMOTO *ET AL.*, 2010). Der photoperiodische Weg ist der einzige, der die Transkription von FT direkt induziert. Alle

weiteren im Blatt wirksamen Faktoren zur Blühinduktion unterdrücken bei Stimulation die Akkumulation von Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits auf die Genexpression von FT reprimierend wirken (YANT *ET AL.*, 2009). Auf diese Weise wird indirekt die Blühinduktion gefördert, indem die Inhibierung der Transkription von FT aufgehoben wird. Die Generierung des Signals zur Blühinduktion (FT) ist in den Blättern folglich entweder allein auf die photoperiodischen Blühinduktion zurückzuführen oder eine Kombination aus dieser mit mindestens einem der anderen Wege. Der autonome Weg unterdrückt den Transkriptionsfaktor SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) und FLOWERING LOCUS C (FLC), die Vernalisierung wirkt schwächend auf FLC. Der GA-Weg verhindert die SVP-Expression und bei moderat warmen Temperaturen wird die Blühinduktion durch Unterdrückung von FLOWERING LOCUS M (FLM) ermöglicht. Bei einer moderaten kalten

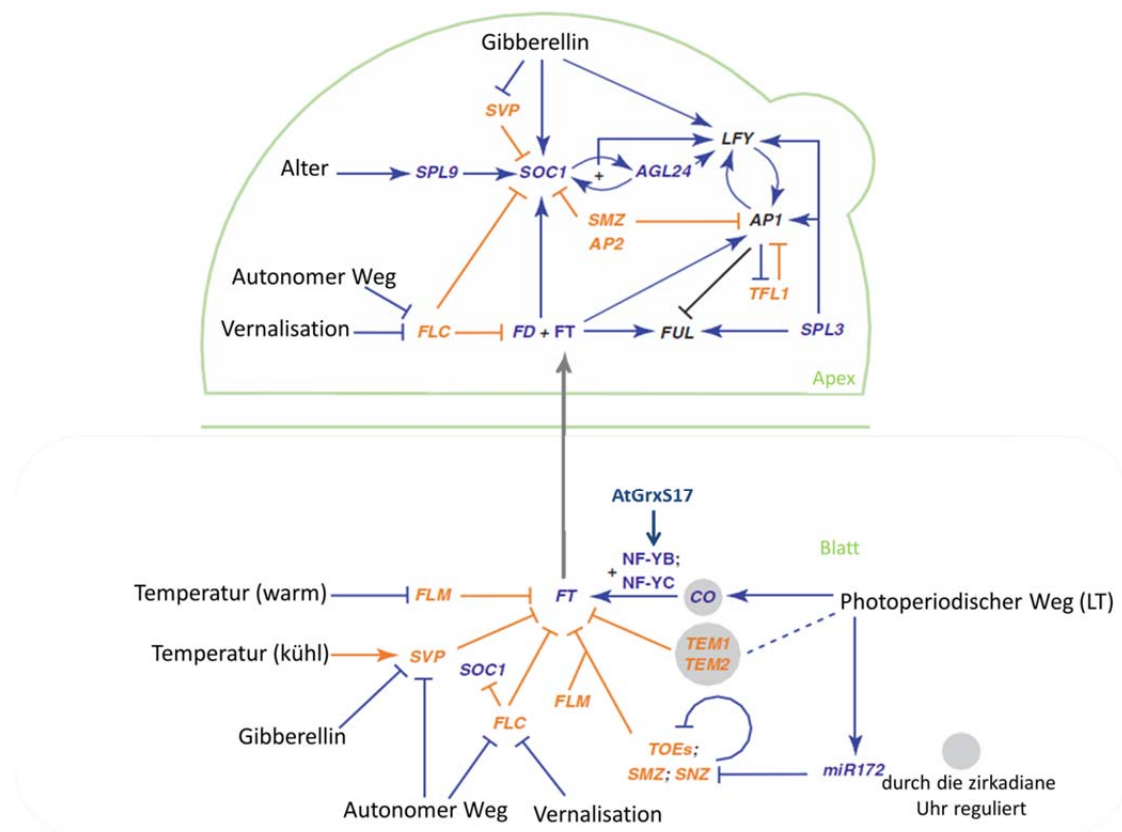


Abb. 42: Einordnung des AtGrxS17-Proteins in das regulative Netzwerk der Blühinduktion. Die Blühinduktion ist ein komplexer Vorgang, der durch verschiedene abiotische Faktoren und/oder durch eine endogene Integration dieser Faktoren mit entwicklungsabhängigen Signalen reguliert wird. Das AtGrxS17-Protein ist nach den Erkenntnissen, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, ein Teil des lichtinduzierten Weges zur Blühinduktion unter LT-Bedingungen. Das AtGrxS17 bindet nachweislich an NF-YC11, welches vermutlich an der durch CO-induzierten Transkription von FT beteiligt ist. Wahrscheinlich moduliert AtGrxS17 die Bindefähigkeit von NF-YC11 unter LT-Bedingungen (modifiziert nach WELLMER & RIECHMANN, 2010).

Umgebungstemperatur hingegen fördert dieser Faktor die Expression von SVP, um die Blühinduktion zu verhindern. Die AtGRXS17-KO-Pflanzen zeigen unter LT eine verspätete Blühinduktion. Unter KT-Bedingungen tritt dieser Effekt nicht auf, da durch die lange Dunkelphase der photoperiodische Weg zur Blühinduktion nicht induziert wird und der autonome Weg den Blühzeitpunkt solange bestimmt bis weitere Faktoren, wie z.B. der Alterungsprozess, regulierend wirken. Im LT kann durch Vernalisierung die verspätete Blühinduktion wieder aufgehoben oder durch die Behandlung mit GA abgeschwächt werden (vgl. 3.5.4). Sowohl im KT als auch durch Vernalisierung zeigen die KO-Pflanzen keine Abweichungen zu den WT-Pflanzen (Abb. 28 & Abb. 38). Bei der Vernalisierung wird über das Signal „Kälte“ die Sprossinduktion eingeleitet. Auch mit einer GA-Behandlung wird der Blühzeitpunkt der KO-Pflanzen verändert und entspricht unter LT dem von nicht mit GA behandelten WT-Kontrollpflanzen. Da diese drei Faktoren in der zur Blühinduktion führenden Signalkaskade auf Mechanismen Einfluss nehmen, die der lichtabhängigen Induktion nachgeschaltet (*downstream*-Prozesse) sind, wird deutlich, dass das AtGRXS17 einen direkten Einfluss auf den photoperiodischen Weg zur Transkription des FT hat (Abb. 42). Durch die spezifische Interaktion des AtGRXS17 mit NF-YC11 im Zellkern (Abb. 26) wird deutlich, an welcher Stelle des Signalweges AtGRXS17 auf die Transkription von FT wirkt. Es ist denkbar, dass die Transkription von FT durch ein ähnliches System, wie es in *S. cerevisiae* zur Transkription von an der Eisenaufnahme beteiligten Proteinen nachgewiesen werden konnte, reguliert wird (vgl. 4.3.3.2). Ein regulativer Einfluss von AtGRXS17-NF-YC11 auf den NF-YB/ NF-YC/ CO-Komplex zur Transkription von FT erscheint wahrscheinlich. Verschiedene Vertreter der NF-Y sind an der von der Photoperiode abhängigen Blühinduktion beteiligt. Dazu wurde von mehreren Arbeitsgruppen Hefe-2-Hybrid-Interaktionsstudien mit unterschiedlichen NF-Y und den an der Blühinduktion beteiligten Transkriptionsfaktoren CONSTANS (CO) und CONSTANS-LIKE (CO-like) durchgeführt (WENKEL *ET AL.*, 2006; CAI *ET AL.*, 2007; KUMIMOTO *ET AL.*, 2008; KUMIMOTO *ET AL.*, 2010). Hierbei stellte sich heraus, dass CO- und verschiedene CO-like-Transkriptionsfaktoren in den meisten der getesteten Kombinationen die NF-YA Komponente des Holotrimerers ersetzen können. Durch bioinformatische Sequenzvergleiche ergab sich weiter, dass die NF-YA mit CO die Konsensus-Sequenz eines Aminosäuremotivs, dem CCT (CO-, CO like-, TOC1-Motiv) (GRIFFITHS *ET AL.*, 2003; WENKEL *ET AL.*, 2006) teilen. Dieses Aminosäuremotiv ermöglicht im Zellkern die Bindung von NF-YA an die NF-Y B/ C-Komponente des Trimerers und an die CCAAT-

Promotorregionen der DNA. Es wird daher angenommen, dass CO oder CO-like auch *in vivo* ein Teil dieses trimeren Komplexes sind (WENKEL *ET AL.*, 2006). Weiter wurde beschrieben, dass *A. thaliana*-KO-Mutanten, denen verschiedene NF-YB oder ein bzw. mehrere NF-YC (NF-YC3/ 4/ 9) fehlen, im LT einen mit CO vergleichbaren verspäteten Blühinduktions-Phänotypen ausbilden (STEPHENSON *ET AL.* 2010). Die mit dem CaMV 35S-Promotor (35S) versehene *A. thaliana*-Überexpressionsmutanten von NF-YB2 oder NF-YB3 führen zu einer deutlich früheren Blühinduktion verglichen mit den unter den gleichen Bedingungen kultivierten *A. thaliana*-35::CO-Überexpressionsmutanten oder den entsprechenden WT-Pflanzen (WENKEL *ET AL.*, 2006; CAI *ET AL.*, 2007; KUMIMOTO *ET AL.*, 2008; KUMIMOTO *ET AL.*, 2010).

In dieser Arbeit konnte die Bindung von AtGRXS17 an NF-YC11 identifiziert und verifiziert werden (vgl. 3.4.2 & 3.4.3). Mittels GFP-Fusions-Konstrukten wurde die jeweilige Lokalisation von 35S::NF-YC11::GFP und 35S::AtGRXS17::GFP in isolierten *A. thaliana*-Protoplasten untersucht (Abb. 26). Für beide Proteine ist eine Lokalisation sowohl im Zytosol als auch im Kern nachweisbar. Dagegen ist eine

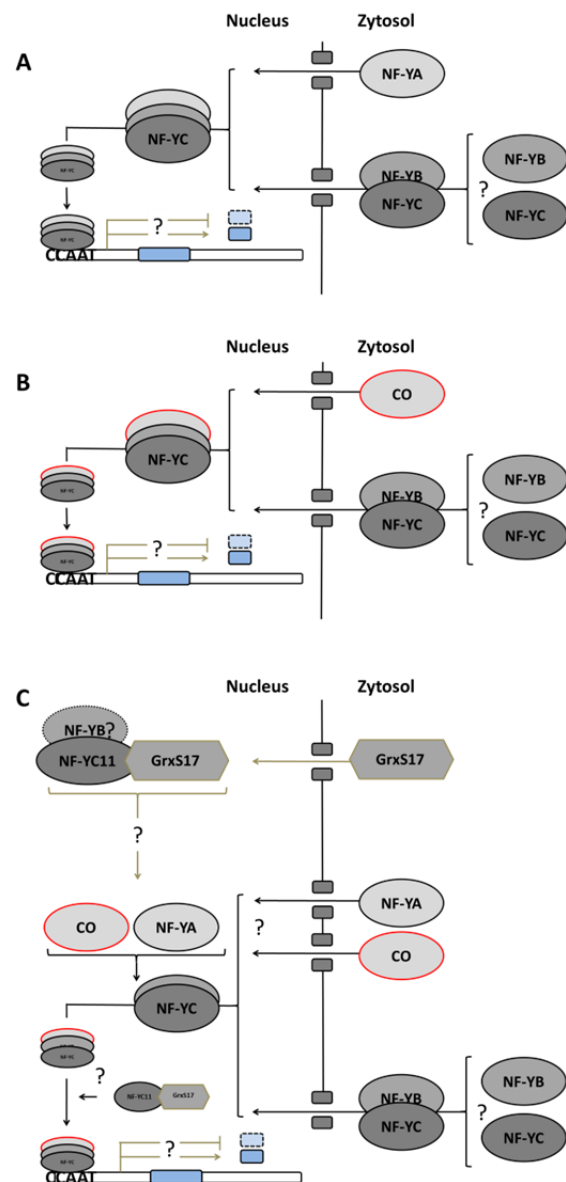


Abb. 43: Bildung des NF-Y-Transkriptionsfaktor-Trimeren, dessen Interaktion mit CO und mögliche Interaktion mit dem AtGRXS17. A) Schematisch dargestellt ist der von MERCIER & LABBE (2009) beschriebene Mechanismus zur Interaktion der NF-Y Transkriptionsfaktoren. NF-YB und NF-YC fusionieren im Zytosol und bilden zusammen ein NLS und werden zusammen in den Zellkern transportiert. Dort binden sie an den dritten Teil, den NF-YA, und können mit der CCAAT-Box in Wechselwirkung treten. B) stellt die Interaktion des NF-Y-Komplexes mit Constans (CO) dar. CO kann die NF-YA-Komponente des Transkriptionsfaktors in dem Dreierkomplex ersetzen. C) beschreibt die vermutete Interaktion von den NF-Y-Transkriptionsfaktoren, CO und GRXS17 und somit den möglichen Einfluss von AtGRXS17 auf die Blühinduktion unter LT-Bedingungen.

Interaktion mittels AtGRXS17-NF-YC11-BiFC-Analysen ausschließlich im Zellkern zu detektieren (Abb. 26). Dieses Ergebnis belegt, dass AtGRXS17 zusammen mit NF-YC11 an der Bildung eines Komplexes beteiligt ist, der erst im Zellkern entsteht. Da AtGRXS17, anders als CO, keine CCAAT-Binde-Domäne oder sonstige homologe Regionen in seiner Aminosäuresequenz aufweist, ist davon auszugehen, dass AtGRXS17 NF-YA im Holotrimer nicht ersetzen kann. Ein Einfluss von AtGRXS17 zusammen mit dem NF-YC11 auf den NF-YB/ NF-YC/ CO-Komplex, wie es für GRX4 und PHP4 im Hefesystem zur Transkription von Gensequenzen der eisenaufnehmenden Proteine beschrieben ist, erscheint möglich (vgl. 4.3.3.2). Auf diese Weise könnte AtGRXS17/NF-YC11 Einfluss auf die durch den NF-YB/ NF-YC/ CO-Komplex geregelte Initialisierung der Transkription von FT erlangen. Zudem gibt es erste Hinweise (vorläufige Daten, hier nicht gezeigt) auf einen sowohl im KT als auch im LT unveränderten Blühzeitpunkt in 35::AtGRXS17-komplementierten AtGRXS17-KO-Pflanzen, obwohl die Menge an AtGRXS17 Protein in diesen Pflanzen signifikant erhöht ist. Dies würde belegen, dass AtGRXS17 keine fördernde Wirkung auf den Zeitpunkt der Blühinduktion hat. Folglich zeigt dieses Ergebnis zusammen mit der verspäteten Blühinduktion der AtGRXS17-KO-Pflanzen unter LT-Bedingungen, dass AtGRXS17 zusammen mit NF-YC11 den NF-YB/ NF-YC/ CO-Komplex stabilisiert (vgl. 3.5.1) und das AtGRXS17 in geringen Mengen regulatorisch wirkt. Somit wäre die regulatorische Funktion von AtGRXS17 nicht von seiner Akkumulation abhängig, sondern möglicherweise über eine geregelte Translokation in den Zellkern indirekt gesteuert (vgl. 4.3.2). Ebenso könnte die Menge an NF-YC11 der limitierende Faktor zur Induzierung einer früheren Blüte sein. In wie weit die Fähigkeit von AtGRXS17 zur Dimerisierung sowie zur Einlagerung von [2Fe-2S]-Clustern einen Effekt auf die Bindung von AtGRXS17 an das NF-YC11 hat und somit die Blühinduktion beeinflusst, ist bisher nicht geklärt, ist aber als wahrscheinlich anzunehmen, da im Hefesystem eine von der [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung in die Grx-HD der GRX4 abhängige regulativ wirksame Interaktion mit Php4 nachgewiesen werden konnte (vgl. 4.3.3.2) (JBEL ET AL., 2012). In zukünftigen Analysen sollten daher die AtGRXS17-KO-Pflanzen mit der Gensequenz des AtGRXS17C1 (vgl. 3.3.2), welches keine [2Fe-2S]-Cluster in die Grx-HD inkorporieren kann, komplementiert werden, um diese Fragestellung zu klären.

4.4.2 Rolle von AtGRXS17 an der Blütenbildung im Langtag

Neben der verspäteten Blühinduktion (vgl. 4.4.1) entwickeln die AtGRXS17-KO-Pflanzen unter LT weitere die Entwicklung betreffende vom WT abweichende Phänotypen. Hauptsächlich sind diese durch das Fehlen der ersten Blüte gekennzeichnet. Dieser Blütenphänotyp ist sowohl von der Lichtperiode als auch von der Lichtintensität abhängig. Unter LT-Bedingungen und moderaten Lichtintensitäten ($120\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bildet der erste Trieb der AtGRXS17-Mutanten keine Blüten, bleibt kurz und wird von sich normal entwickelnden Seitentrieben überragt. Bei erhöhten Lichtintensitäten (500 bis $1200\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sind zudem die Blüten der sekundären Triebe in ihrer Entwicklung eingeschränkt und unterscheiden sich stark von denen der WT-Pflanzen (Abb. 46). Der von den AtGRXS17-KO-Pflanzen generierte Blütenphänotyp ähnelt der PIN-FORMED1 (PIN1)- Mutante (Abb. 44). Der Phänotyp der PIN1-Mutanten ist wie der PIN1-like-Phänotyp der AtGRXS17-KO-Pflanzen in seiner Blütenentwicklung signifikant gestört und bildet, im Gegensatz zu den AtGRXS17-KO-Pflanzen, mehrere lange, blattlose Triebe aus (Abb. 44). Den PIN1-KO-Pflanzen fehlt der PIN1-Transporter, der zusammen mit sieben weiteren Auxin-Transportern (PIN2-8) den Transport des Phytohormons Auxin zu dem jeweiligen Wirkort kontrolliert (PAPANOV *ET AL.*, 2005). Das Phytohormon Auxin wirkt in einem komplexen System und ist in alle bisher bekannten pflanzlichen Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse sowie an Zellteilungs- und Zellstreckungsprozessen, der Apikaldominanz, Verzweigungsprozessen von Wurzeln und Spross, dem Photo- und Gravitropismus involviert (BERLETH *ET AL.*, 2004; NIKLAS & KUTSCHERA, 2012). Im SAM bestimmt die spezifische Akkumulation von Auxin an welcher Stelle die Primordien gebildet werden (REINHARD *ET AL.*, 2003). In den AtGRXS17-KO-Pflanzen geht die Ausbildung des PIN1-like-Phänotyps des ersten Triebes mit dem Verlust der Apikaldominanz einher. Da auch die Apikaldominanz maßgeblich durch das Phytohormon Auxin geprägt ist, können durch den Verlust dieser weiteren Verbindungen zu anderen auxinabhängigen Prozessen geschlussfolgert werden.

Der PIN1-like-Phänotyp kann ebenfalls durch erhöhte Temperaturen induziert werden (CHENG *ET AL.*, 2011a). Aus diesen Erkenntnissen kann geschlussfolgert werden, dass AtGRXS17 an einem zentralen Punkt zur Regulation der Auxinmenge auf transkriptionaler oder posttranskriptionaler Ebene wirken könnte. Die Tatsache, dass CHENG *ET AL.* (2011a) keine geringeren Mengen an Auxin in den PIN1-like-Phänotypen der AtGRXS17-KO-

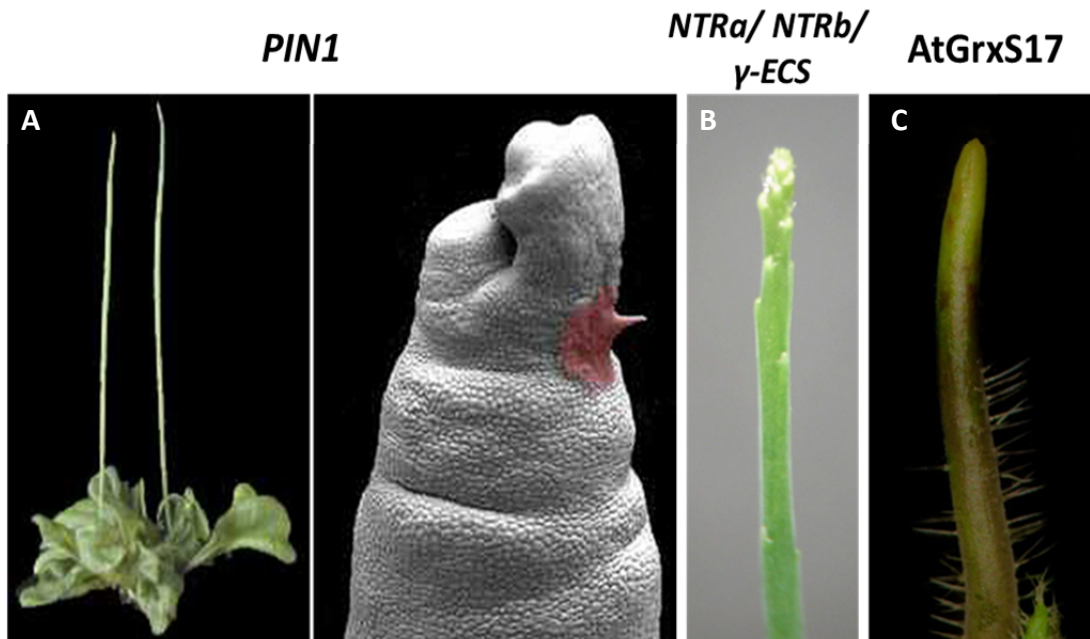


Abb. 44: Vergleich des AtGrxS17-KO-Pflanzen-Phänotyps mit der PIN1-Mutante und der NTRa/ NTRb/ γ -ECS-Dreifach-Mutante. (A) Abgebildet sind die undifferenzierten Blüten der PIN1-Mutante sowie (B) der Phänotyp der NTRa-/ NTRb-/ γ -ECS-Dreifach-Mutante im Vergleich mit der ersten Blüte der AtGrxs17-Mutante (C). Alle drei Mutanten bilden keine Blüten. Während bei PIN 1 und NTRa-/ NTRb-/ γ -ECS alle Triebe betroffen sind, zeigt nur der erste Trieb der AtGrxS17-Mutanten unter LT-Bedingungen einen PIN1-like-Phänotyp. Bei einer Steigerung der Lichtintensität sind auch die Seitentriebe der AtGrxS17-Mutanten betroffen und bilden keine differenzierten Blüten aus. (A: <http://www.botany.unibe.ch/deve/research/projects/leafdeve.php>; B: BASHANDY ET AL., 2010)

Pflanzen unter erhöhten Temperaturen feststellen konnten, spricht jedoch für eine fehlerhafte Verteilung des Phytohormons durch Beeinträchtigung der PIN-Proteine.

Das meristematische Gewebe der AtGRXS17-KO-Pflanzen, aus dem die Blüten hervorgehen, reagiert auf die direkte Lichtexposition (Abb. 31). Werden die Meristeme der AtGRXS17-KO-Pflanzen während der Anzucht beschattet, entwickeln sich die Blüten auch unter LT-Bedingungen ohne Unterschiede zu denen der entsprechenden WT-Pflanzen (Abb. 32). Der unter Kapitel 4.4.1 diskutierte Zusammenhang der verspäteten Blühinduktion bleibt von der Beschattung unbeeinflusst. Bei einer stärkeren Lichtexposition (ab $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) entwickeln sich auch die Blüten der Seitentriebe ebenfalls uneinheitlich (Abb. 31. G; vgl. 3.5.2). Diese Blüten haben häufig keine Funktion und können kein Saatgut produzieren, sodass der reproduktive Erfolg der AtGRXS17-KO-Pflanzen hinter dem der WT-Pflanzen weit zurück bleibt (vgl. 3.5.3). Die für die AtGRXS17-KO-Pflanzen ermittelten Ergebnisse stellen einen direkten Zusammenhang zwischen der Blütenentwicklung, der subzellularen Verteilung von Auxin und der Lichtperiode und -intensität über das in dieser Arbeit untersuchte AtGRXS17 her. Zusammen mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit und den Erkenntnissen zur Bildung des PIN1-like-Phänotyps

unter erhöhten Temperaturen (CHENG *ET AL.*, 2011a) lässt sich schließen, dass der PIN1-*like*-Phänotyp der AtGRXS17-KO-Pflanzen durch unterschiedliche Signalkaskaden generiert werden kann. Dementsprechend müssen verschiedene Signalwege bei dem AtGRXS17-Protein zusammenlaufen. Diese Signalwege könnten von AtGRXS17 durch diverse molekulare Prozesse, wie bspw. einem differenzierten Kerntransport (vgl. 4.3.2) oder spezifischen vom [2Fe-2S]-Cluster-Status der Grx-HD des AtGRXS17-Proteins abhängigen Interaktionen, mit weiteren Proteinen kanalisiert werden und eine angepasste Genexpression hervorrufen, die möglicherweise die Anzahl der gebildeten PIN-Transporterproteine beeinflusst und so zu einer unspezifischen Auxinverteilung führt. Auch der Glutathionspiegel in Pflanzen beeinflusst die Expression der PIN-Transporter (BASHANDY *ET AL.*, 2010; KOPRIVOVA *ET AL.*, 2010). Die *A. thaliana* Dreifach-Mutanten für die Gene der *NTRa-/NTRb-/γ-ECS*-Proteine bilden neben einer verspäteten Blühinduktion einen vergleichbaren Blüten-Phänotyp wie PIN1-Mutanten oder AtGRXS17-KO-Pflanzen aus (Abb. 44). Durch die externe Zugabe von GSH kann der Pin1-*like*-Phänotyp der Dreifach-Mutanten aufgehoben werden (BASHANDY *ET AL.*, 2010). In den AtGRXS17-KO-Pflanzen hingegen kommt es in Folge einer GSH-Zugabe nicht zur Komplementation des PIN1-*like*-Phänotyps (Daten nicht gezeigt). Demnach ist der PIN1-*like*-Phänotyp der AtGRXS17-Mutanten nicht auf einen GSH-Mangel zurückzuführen. Jedoch wird GSH bei erhöhter direkter Lichtexposition, welche in den AtGRXS17-Mutanten den PIN1-*like*-Phänotyp induziert (siehe oben), verstärkt gebildet (OGAWA *ET AL.*, 2004; ZHANG *ET AL.*, 2008). Es ist daher vorstellbar, dass die erhöhte Menge an GSH zu einer verstärkten Einlagerung von [2Fe-2S]-Clustern in die Grx-HD der AtGRXS17-Proteine führt, da GSH an der Koordination der [2Fe-2S]-Cluster in Grx maßgeblich beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von GRX4 und dem Transkriptionsfaktor Php4 vom Status der eingelagerten [2Fe-2S]-Cluster abhängig ist (JBEL *ET AL.*, 2012). Auf diese Weise könnte eine von der GSH abhängige Transkriptionsregulation im Zellkern erfolgen, die möglicherweise die Genexpression von PIN-Proteinen steuert. Da neben den Auxin-Mengen auch die Transkriptmenge von PIN 1 in den *NTRa-/NTRb-/γ-ECS*-Mutanten erniedrigt ist, könnte so ein Zusammenhang zwischen GSH und PIN 1 über AtGRXS17 hergestellt werden. Die Möglichkeit das AtGRXS17 aufgrund seiner nachgewiesenen Interaktion mit Kinasen, die über Phosphorylierungskaskaden an der Phosphorylierung von PIN1 beteiligt sein könnte, erscheint durch eine kürzlich erschienene Studie möglich. In dieser konnte ein Zusammenhang zwischen PIN1 und dessen Phosphorylierungsstatus

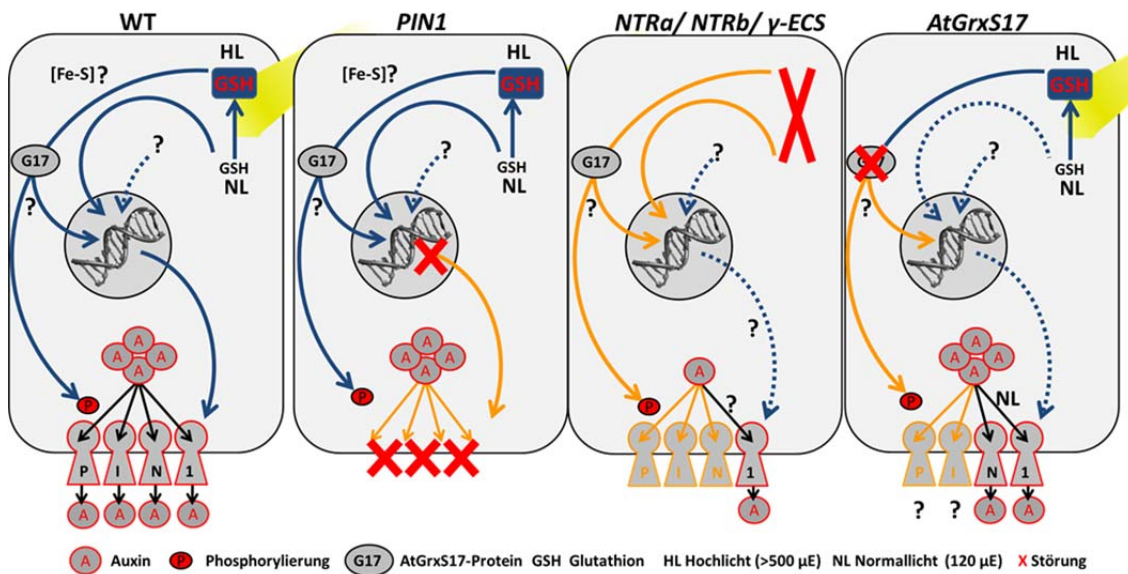


Abb. 45: Hypothetische Mechanismen zur Generierung des PIN1- bzw. des PIN1-like Phänotyps in verschiedenen *A. thaliana* KO-Pflanzen. Der Vergleich des AtGrxS17-Phänotyps mit den Phänotypen von PIN 1 und NTRa-/ NTRb-/ γ -ECS-Dreifach-Mutanten lässt auf einen Mechanismus schließen, an dem alle fünf betroffenen Gene beteiligt sein könnten. Bei WT-Pflanzen könnte die PIN-Synthese bei einer geringen Lichtmenge über einen noch nicht näher bekannten Weg laufen, der aber dafür sorgt, dass das PIN-Protein in einer für diese Lichtverhältnisse ausreichenden Menge vorliegt und damit für eine korrekte Blütenbildung sorgt. Bei einer gesteigerten Lichtintensität könnte die durch Licht stimulierte GSH-Synthese zu einem vermehrten Einbau von [2Fe-2S]-Clustern in die AtGrxS17-Proteine sorgen. Durch den Einbau wird möglicherweise die Transkription von PIN 1 beeinflusst oder die Interaktion mit einer Kinase moduliert, sodass es zu einer an die Lichtverhältnisse angepasste PIN 1-Menge und somit zu einer für die Blütenbildung korrekten Verteilung des Auxins kommt. In den drei Mutanten sind jeweils ein oder mehrere andere Gene betroffen, sodass die für die Blütenbildung ablaufenden Wege an jeweils anderer Stelle unterbrochen sind. Blaue Linien stellen intakte und orange Linien unterbrochene Wege dar.

hergestellt werden (DAI ET AL., 2012). KO-Mutanten für die PINOID (PID) Kinase generieren einen zu PIN1 vergleichbaren Phänotypen. Das AtGRXS17 ist unter LT-Bedingungen an einer Vielzahl von Differenzierungsprozessen beteiligt. Verschiedene Kaskaden von molekularen Signalen laufen beim AtGRXS17-Protein zusammen. Die Möglichkeit von AtGRXS17 Dimere zu bilden, [2Fe-2S]-Cluster aufzunehmen und sowohl mit Kinasen als auch mit Transkriptionsfaktoren zu interagieren, macht das AtGRXS17-Protein zu einem idealen Integrator von molekularen Signalkaskaden. In der Abb. 45 sind die für AtGRXS17 hypothetischen Szenarien an der Beteiligung zur Generierung des PIN1-Phänotyps in den unterschiedlichen PIN-Phänotyp-generierenden KO-Pflanzen zusammengefasst.

5 Zusammenfassung

Glutaredoxine wie auch Thioredoxine gehören der großen Proteinfamilie der Redoxine an. Das in dieser Arbeit näher untersuchte Glutaredoxin S17 (GRXS17) besteht aus einer Thioredoxin (Trx)- und bis zu drei Glutaredoxin (Grx)-Homologie-Domänen (HD). Es ist in ähnlicher Zusammensetzung in allen eukaryotischen und in vielen prokaryotischen Organismen unter unterschiedlichen Namen zu finden. Der Aufbau aus einer Trx-HD und drei Grx-HD kommt nur in höheren Pflanzen vor. In dieser Arbeit wurde das GRXS17 aus *A. thaliana* (AtGRXS17) sowohl durch computerbasierte Promotoranalysen als auch durch *in vitro*-Protein-Interaktionsstudien mit Transkriptionsfaktoren und Kinasen in Verbindung gebracht, die an Differenzierungsprozessen wie z.B. der Blühinduktion und/ oder an der Blütenbildung beteiligt sind. Mittels *Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation* (BiFC) wurden Interaktionen von AtGRXS17 mit der Kinase At1g50570 und dem CCAAT-Transkriptionsfaktor NF-YC11 (At3g12480) verifiziert, welche zuvor bereits mittels massenspektrometrischer Analysen von *pull-down*-Versuchen identifiziert worden waren. Die drei Grx-HD des AtGRXS17-Proteins können [2Fe-2S]-Cluster einlagern (Kooperation mit C. Berndt, Karolinska Institut, Schweden). Eine regulative Funktion auf Transkriptebene, wie sie für das zu AtGRXS17 homologe GRX4 aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScGRX4) durch die Interaktion mit dem CCAAT-Transkriptionsfaktor PHP4 in Abhängigkeit vom [2Fe-2S]-Cluster-Status des ScGRX4 stattfindet, ist daher denkbar. T-DNA-Insertions-Mutanten im *AtGRXS17*-Gen generieren unter Langtag-Bedingungen (LT) verschiedene Differenzierungs-Phänotypen, während die Pflanzen unter Kurztag-Bedingungen (KT) in ihrer Entwicklung keine Abweichungen vom WT aufweisen. Der auffälligste dieser LT-Phänotypen zeigt eine verspätete Blühinduktion, die mit einem blütenlosen ersten Spross (PIN-*like*-Phänotyp) einhergeht. Erhöhte Lichtintensitäten verzögern die Blühinduktion weiter und lösen unterschiedliche stark ausgeprägte Entwicklungsstörungen in allen Blüten aus. Verschiedene, ebenfalls an der Blühinduktion beteiligte Vertreter der NF-Y-Transkriptionsfaktoren bilden mit CONSTANS (CO) einen Transkriptionsfaktor-Komplex zur Initiation der Transkription von FLOWERING LOCUS 1 (FT), dessen Genprodukt aus dem Blatt über das Phloem in den Vegetationskegel transportiert wird. Dort löst der Transkriptionsfaktor FT mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Blühinduktion aus. Die Interaktion von AtGRXS17 mit dem

NF-YC11 und die Funktionsweise dieser Transkriptionsfaktor-Familie legen nahe, dass AtGRXS17 an regulativen Prozessen der Transkription von FT und somit an der Blühinduktion beteiligt ist. In 35S::*AtGRXS17*-Komplementations-Linien sind alle beobachteten Phänotypen der *AtGRXS17*-KO-Pflanzen behoben. Gibberellinsäure-Behandlungen an den KO-Pflanzen schwächen die Phänotypen, die bei Blühinduktion und Blütenbildung auftreten, ab. Vernalisierung unter LT-Bedingungen revertiert den Phänotyp der KO-Mutante vollständig. Da diese Behandlungen, die die Phänotypen des *AtGRXS17* revertieren können, Mechanismen betreffen, die der Induktion durch die Photoperiode (LT) nachgeschaltet sind, ist der Wirkort von *AtGRXS17* im Blühinduktionsweg durch LT-Bedingungen belegt.

6 Summary

Glutaredoxins and thioredoxins belong to the large protein family of redoxins. Glutaredoxin S17 (GrxS17) was examined in detail in this work, and consists of a thioredoxin (Trx) and between one and three glutaredoxin (Grx) homology domains (HD). It has been identified, with a similar domain composition in all eukaryotic and some prokaryotic organisms characterized to date, carrying different names. The composition of one Trx-HD and three Grx-HD is only found in higher plants. In this work, a function link, connecting GRXS17 from *A. thaliana* (AtGRXS17) with transcription factors and kinases, was identified by both computer-based promoter analysis and *in vitro* protein interaction studies, suggesting a role in developmental processes such as flowering induction and/or flower organ formation. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) verified the interactions of GRXS17 with the kinase At1g50570 and the CCAAT-transcription factor NF-YC11 (At3g12480), confirming the interaction identified by mass spectrometric analysis of pull-down experiments. The three Grx-HD of the AtGRXS17-protein were found to coordinate [2Fe-2S]-clusters (collaboration with C. Berndt, Karolinska Institute, Sweden). The Grx 4 protein from *Saccharomyces cerevisiae* (ScGRX 4) has high homology to AtGRXS17, and also co-ordinates a [2Fe-2S]-cluster. ScGRX4 interacts with the CCAAT transcription factor PHP4 depending on its [2Fe-2S]-cluster status and based on this information, we hypothesize that AtGRXS17 may regulate transcription in a [2Fe-2S]-cluster dependent manner. This hypothesis is supported by analysis of AtGRXS17 T-DNA-insertion mutants, which generate various developmental phenotypes under long-day conditions (LD), while under short-day conditions (SD) the plants do not exhibit any developmental deviations compared to WT plants. The most striking of these LD phenotypes concerns late flowering, which is accompanied by a flowerless first sprout ("PIN-like" phenotype). Increased light intensities further delay flowering induction and lead to more or less pronounced developmental disturbances in all flowers. Interaction of AtGRXS17 was also detected with the NF-YC11 transcription factor. Several other members of the NF-Y transcription factor family are involved in flowering induction and form a transcription factor complex with CONSTANS (CO) in order to initiate transcription of FLOWERING LOCUS T (FT), the gene product of which is transported out of the leaf via the phloem to the shoot apex. At the shoot apex the transcription integrator FT, together

Summary

with other transcription factors, induces flowering. The *GRXS17* mutant phenotype and interaction of AtGRXS17 with NF-YC11 is consistent with a model in which AtGRXS17 regulates transcription of FT, and thus promotes the induction of flowering. In 35S::*AtGRXS17*-complementation lines, all observed abnormalities of the AtGRXS17-knockout plants revert to WT. Gibberellic acid treatment of the KO-plants partially rescues the phenotype of disturbed flower induction and flower organ formation. Vernalization under LD conditions completely rescues the phenotype of the KO mutant. Since the perception of GA and vernalization rescue the phenotype of *GRXS17*, these processes probably operate downstream of the photoperiod induced flower induction pathway, and the site of action of AtGRXS17 can be isolated to the earlier stages of flower induction under LD conditions.

7 Literaturverzeichnis

- Adam, E. J. and S. A. Adam, 1994: Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J. Cell Biol.*, **125**, 547-555.
- Al-Abdallat, A. M. A., 2004: Isolation and Characterization of Proteins Interacting with Tobacco Transcription Factor TGA2.2. *Dissertation - Universität Göttingen*.
- Alexander, M. P., 1987: A method for staining pollen tubes in pistil. *Stain Technol.*, **62**, 107-112.
- Alves, R., E. Vilapinyo, A. Sorribas and E. Herrero, 2009: Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins. *BMC Evol. Biol.*, **9**, 66.
- Ang, L. H., S. Chattopadhyay, N. Wei, T. Oyama, K. Okada, A. Batschauer and X. W. Deng, 1998: Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Mol. Cell*, **1**, 213-222.
- Apel, K. and H. Hirt, 2004: Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 373-399.
- Atkinson, H. J. and P. C. Babbitt, 2009: An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations. *PLoS Comput. Biol.*, **5**, e1000541.
- Babichev, Y. and N. Isakov, 2001: Tyrosine phosphorylation of PICOT and its translocation to the nucleus in response of human T cells to oxidative stress. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **495**, 41-45.
- Balk, J. and M. Pilon, 2011: Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci.*, **16**, 218-226.
- Balmer, Y., A. Koller, G. D. Val, P. Schürmann and B. B. Buchanan, 2004a: Proteomics uncovers proteins interacting electrostatically with thioredoxin in chloroplasts. *Photosynth. Res.*, **79**, 275-280.
- Balmer, Y., W. H. Vensel, C. K. Tanaka, W. J. Hurkman, E. Gelhaye, N. Rouhier, J. P. Jacquot, W. Manieri, P. Schurmann, M. Droux and B. B. Buchanan, 2004b: Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2642-2647.
- Bandyopadhyay, S., F. Gama, M. M. Molina-Navarro, J. M. Gualberto, R. Claxton, S. G. Naik, B. H. Huynh, E. Herrero, J. P. Jacquot, M. K. Johnson and N. Rouhier, 2008: Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J.*, **27**, 1122-1133.
- Barranco-Medina, S., T. Krell, L. Bernier-Villamor, F. Sevilla, J. J. Lazaro and K. J. Dietz, 2008: Hexameric oligomerization of mitochondrial peroxiredoxin PrxIIIF and formation of an ultrahigh affinity complex with its electron donor thioredoxin Trx-o. *J. Exp. Bot.*, **59**, 3259-3269.
- Bashandy, T., J. Guilleminot, T. Vernoux, D. Caparros-Ruiz, K. Ljung, Y. Meyer and J. P. Reichheld, 2010: Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in Arabidopsis auxin signaling. *Plant Cell*, **22**, 376-391.
- Bashandy, T., Y. Meyer and J. P. Reichheld, 2011: Redox regulation of auxin signaling and plant development in Arabidopsis. *Plant Signal Behav.*, **6**, 117-119.
- Becker, D., E. Kemper, J. Schell and R. Masterson, 1992: New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.*, **20**, 1195-1197.
- Becker, B., S. Holtgreffe, S. Jung, C. Wunrau, A. Kandlbinder, M. Baier, K. J. Dietz, J. E. Backhausen and R. Scheibe, 2006: Influence of the photoperiod on redox regulation and stress responses in Arabidopsis thaliana L. (Heynh.) plants under long- and short-day conditions. *Planta*, **224**, 380-393.
- Beinert, H., 2000: Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 2-15.

- Berleth, T., N. T. Krogan and E. Scarpella, 2004: Auxin signals--turning genes on and turning cells around. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 553-563.
- Bhat, R. A., T. Lahaye and R. Panstruga, 2006: The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods*, **2**, 12
- Bohnert, H. J., Q. Gong, P. Li and S. Ma, 2006: Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms-getting genomics going. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 180-188.
- Borden, K. L. and F. M. Richards, 1990: Folding of the reduced form of the thioredoxin from bacteriophage T4. *Biochem.*, **29**, 8207-8210.
- Boss, P. K., R. M. Bastow, J. S. Mylne and C. Dean, 2004: Multiple pathways in the decision to flower: Enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell*, **16**, S18-S31.
- Boavida, L. C. and S. McCormick, 2007: Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **52**, 570-582.
- Bracha-Drori, K., K. Shichrur, A. Katz, M. Oliva, R. Angelovici, S. Yalovsky and N. Ohad, 2004: Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.*, **40**, 419-427.
- 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.
- Buchanan, B. B., 1980: Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 341-374.
- Buchanan, B. B. and Y. Balmer, 2005: Redox regulation: A broadening horizon. *Ann. Rev. Plant Biol.*, **56**, 187-220.
- Bulow, L., Y. Brill and R. Hehl, 2010: AthaMap-assisted transcription factor target gene identification in *Arabidopsis thaliana*. *Database (Oxford)*, **2010**, baq034.
- Cai, X., J. Ballif, S. Endo, E. Davis, M. Liang, D. Chen, D. DeWald, J. Kreps, T. Zhu and Y. Wu, 2007: A putative CCAAT-binding transcription factor is a regulator of flowering timing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **145**, 98-105.
- Cardon, G. H., S. Hohmann, K. Nettekheim, H. Saedler and P. Huijser, 1997: Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene SPL3: a novel gene involved in the floral transition. *Plant J.*, **12**, 367-377.
- Cha, H., J. M. Kim, J. G. Oh, M. H. Jeong, C. S. Park, J. Park, H. J. Jeong, B. K. Park, Y. H. Lee, D. Jeong, D. K. Yang, O. Y. Bernecker, H. Kim do, R. J. Hajjar and W. J. Park, 2008: PICOT is a critical regulator of cardiac hypertrophy and cardiomyocyte contractility. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **45**, 796-803.
- Cheng, N. H., J. Z. Liu, A. Brock, R. S. Nelson and K. D. Hirschi, 2006: AtGRXcp, an *Arabidopsis* chloroplastic glutaredoxin, is critical for protection against protein oxidative damage. *J. Biol. Chem.*, **281**, 26280-26288.
- Cheng, N. H., J. Z. Liu, X. Liu, Q. Wu, S. M. Thompson, J. Lin, J. Chang, S. A. Whitham, S. Park, J. D. Cohen and K. D. Hirschi, 2011a: *Arabidopsis* monothiol glutaredoxin, AtGRXS17, is critical for temperature-dependent postembryonic growth and development via modulating auxin response. *J. Biol. Chem.*, **286**, 20398-20406.
- Cheng, N. H., W. Zhang, W. Q. Chen, J. Jin, X. Cui, N. F. Butte, L. Chan and K. D. Hirschi, 2011b: A mammalian monothiol glutaredoxin, GRX3, is critical for cell cycle progression during embryogenesis. *FEBS J*, **278**, 2525-2539.
- Citovsky, V., L. Y. Lee, S. Vyas, E. Glick, M. H. Chen, A. Vainstein, Y. Gafni, S. B. Gelvin and T. Tzfira, 2006: Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta. *J. Mol. Biol.*, **362**, 1120-1131.
- Clough, S. J. and A. F. Bent, 1998: Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* -mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **16**, 735-743.

- Cohen, S. N., A. C. Chang and L. Hsu, 1972: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, **69**, 2110-2114.
- Collin, V., E. Issakidis-Bourguet, C. Marchand, M. Hirasawa, J. M. Lancelin, D. B. Knaff and M. Miginiac-Maslow, 2003: The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: New functions and new insights into specificity. *J. Biol. Chem.*, **278**, 23747-23752.
- Copley, S. D., W. R. Novak and P. C. Babbitt, 2004: Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochem.*, **43**, 13981-13995.
- Cordes, V. C., H. R. Rackwitz and S. Reidenbach, 1997: Mediators of nuclear protein import target karyophilic proteins to pore complexes of cytoplasmic annulate lamellae. *Exp. Cell. Res.*, **237**, 419-433.
- Couturier, J., J. P. Jacquot and N. Rouhier, 2009a: Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **66**, 2539-2557
- Couturier, J., C. S. Koh, M. Zaffagnini, A. M. Winger, J. M. Gualberto, C. Corbier, P. Decottignies, J. P. Jacquot, S. D. Lemaire, C. Didierjean and N. Rouhier, 2009b: Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. *J. Biol. Chem.*, **284**, 9299-9310.
- Dai, M., C. Zhang, U. Kania, F. Chen, Q. Xue, T. McCray, G. Li, G. Qin, M. Wakeley, W. Terzaghi, J. Wan, Y. Zhao, J. Xu, J. Friml, X. W. Deng and H. Wang, 2012: A PP6-type phosphatase holoenzyme directly regulates PIN phosphorylation and auxin efflux in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **24**, 2497-2514.
- Dietz, K. J., 2008: Redox signal integration: from stimulus to networks and genes. *Physiol. Plant.*, **133**, 459-468.
- Dietz, K. J. and R. Scheibe, 2004: Redox regulation: an introduction. *Physiol. Plant.*, **120**, 1-3.
- Dixon, D. P., T. Hawkins, P. J. Hussey and R. Edwards, 2009: Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *J. Exp. Bot.*, **60**, 1207-1218.
- Eklund, H., C. Cambillau, B. M. Sjoberg, A. Holmgren, H. Jornvall, J. O. Hoog and C. I. Branden, 1984: Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO J.*, **3**, 1443-1449.
- Eklund, H., F. K. Gleason and A. Holmgren, 1991: Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins*, **11**, 13-28.
- Fang, S. C. and D. E. Fernandez, 2002: Effect of regulated overexpression of the MADS domain factor AGL15 on flower senescence and fruit maturation. *Plant Physiol.*, **130**, 78-89.
- Felsenstein, J., 1985: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.
- Ferrandez, J., M. Gonzalez and F. Cejudo, 2012: Chloroplast redox homeostasis is essential for lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.*, **7**, 1177-1179.
- Fior, S. and P. D. Gerola, 2009: Impact of ubiquitous inhibitors on the GUS gene reporter system: evidence from the model plants *Arabidopsis*, tobacco and rice and correction methods for quantitative assays of transgenic and endogenous GUS. *Plant Methods.*, **5**, 19.
- Fontecave, M., 2006: Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 171-174.
- Foyer, C. H. and G. Noctor, 2005a: Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Envir.*, **28**, 1056-1071.
- Foyer, C. H. and G. Noctor, 2005b: Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, **17**, 1866-1875.
- Foyer, C. H. and G. Noctor, 2009: Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Sign.*, **11**, 861-905.

- Frost, P., T. Guan, C. Subauste, K. Hahn and L. Gerace, 2002: Tpr is localized within the nuclear basket of the pore complex and has a role in nuclear protein export. *J. Cell Biol.*, **156**, 617-630.
- Gelhaye, E., N. Rouhier, J. Gerard, Y. Jolivet, J. Gualberto, N. Navrot, P. I. Ohlsson, G. Wingsle, M. Hirasawa, D. B. Knaff, H. Wang, P. Dizengremel, Y. Meyer and J. P. Jacquout, 2004a: A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14545-14550.
- Gelhaye, E., N. Rouhier, J. Gerard, Y. Jolivet, J. Gualberto, N. Navrot, P. I. Ohlsson, G. Wingsle, M. Hirasawa, D. B. Knaff, H. Wang, P. Dizengremel, Y. Meyer and J. P. Jacquout, 2004b: A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14545-14550.
- Gelhaye, E., N. Rouhier and J. P. Jacquout, 2003: Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS Lett.*, **555**, 443-448.
- Giordano, E., I. Peluso, R. Rendina, A. Digilio and M. Furia, 2003: The clot gene of *Drosophila melanogaster* encodes a conserved member of the thioredoxin-like protein superfamily. *Mol. Genet Genomics*, **268**, 692-697.
- Giustarini, D., A. Milzani, G. Aldini, M. Carini, R. Rossi and I. Dalle-Donne, 2005: S-Nitrosation versus S-glutathionylation of protein sulfhydryl groups by S-nitrosoglutathione. *Antioxid. Redox Sign.*, **7**, 930-939.
- Goldfarb, D. S., J. Gariepy, G. Schoolnik and R. D. Kornberg, 1986: Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature*, **322**, 641-644.
- Griffiths, S., R. P. Dunford, G. Coupland and D. A. Laurie, 2003: The evolution of CONSTANS-like gene families in barley, rice, and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **131**, 1855-1867.
- Hackenberg, D., Y. Wu, A. Voigt, R. Adams, P. Schramm and B. Grimm, 2012: Studies on Differential Nuclear Translocation Mechanism and Assembly of the Three Subunits of the *Arabidopsis thaliana* Transcription Factor NF-Y. *Mol. Plant*, **5**, 876-888.
- Hameister, S., B. Becker, S. Holtgreffe, I. Strodtkötter, V. Linke, J. E. Backhausen and R. Scheibe, 2007: Transcriptional regulation of NADP-dependent malate dehydrogenase: Comparative genetics and identification of DNA-binding proteins. *J. Mol. Evol.*, **65**, 437-455.
- Hanahan, D., 1983: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Hanke, G. T., S. Holtgreffe, N. König, I. Strodtkötter, I. Voss and R. Scheibe, 2009: Use of transgenic plants to uncover strategies for maintenance of redox homeostasis during photosynthesis. *Adv. Bot. Res.*, **52**, 207-251.
- Hardtke, C. S., K. Gohda, M. T. Osterlund, T. Oyama, K. Okada and X. W. Deng, 2000: HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J.*, **19**, 4997-5006.
- Haunhorst, P., C. Berndt, S. Eitner, J. R. Godoy and C. H. Lillig, 2010: Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **394**, 372-376.
- Hill, K., H. Wang and S. E. Perry, 2008: A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *Plant J.*, **53**, 172-185.
- Hiratsuka, K., X. Wu, H. Fukuzawa and N. H. Chua, 1994: Molecular dissection of GT-1 from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **6**, 1805-1813.
- Hisabori, T., S. Hara, T. Fujii, D. Yamazaki, N. Hosoya-Matsuda and K. Motohashi, 2005: Thioredoxin affinity chromatography: a useful method for further understanding the thioredoxin network. *J. Exp. Bot.*, **56**, 1463-1468.
- Hisabori, T., K. Motohashi, N. Hosoya-Matsuda, H. Ueoka-Nakanishi and P. G. Romano, 2007: Towards a functional dissection of thioredoxin networks in plant cells. *Photochem. Photobiol.*, **83**, 145-151.

- Hoffmann, B., M. A. Uzarska, C. Berndt, J. R. Godoy, P. Haunhorst, C. H. Lillig, R. Lill and U. Muhlenhoff, 2011: The multidomain thioredoxin-monothiol glutaredoxins represent a distinct functional group. *Antiox. Redox Sign.*, **15**, 19-30.
- Höfgen, R. and L. Willmitzer, 1988: Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 9877.
- Holmgren, A., 1989: Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.*, **264**, 13963-13966.
- Holmgren, A., B. O. Söderberg, H. Eklund and C. I. Bränden, 1975: Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2305-2309.
- Hudemann, C., C. Berndt and C. H. Lillig, 2008: Glutaredoxine und Eisen-Schwefel-Zentren. *Biospekt.*, **14**, 32-35.
- Isakov, N., S. Witte and A. Altman, 2000: PICOT-HD: a highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 537-539.
- Jacob, Y., C. Mongkolsiriwatana, K. M. Velez, S. Y. Kim and S. D. Michaels, 2007: The nuclear pore protein AtTPR is required for RNA homeostasis, flowering time, and auxin signaling. *Plant Physiol.*, **144**, 1383-1390.
- Jähnchen, S., 2006: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation. <http://de.wikipedia.org>
- Jakoby, M., B. Weisshaar, W. Droge-Laser, J. Vicente-Carbajosa, J. Tiedemann, T. Kroj and F. Parcy, 2002: bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant. Sci.*, **7**, 106-111.
- Jans, D. A., 1995: The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *Biochem J*, **311**, 705-716.
- Jans, D. A. and S. Hubner, 1996: Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol. Rev.*, **76**, 651-685.
- Jbel, M., A. Mercier and S. Labbe, 2011: GRX4 monothiol glutaredoxin is required for iron limitation-dependent inhibition of Fep1. *Eukaryot. Cell*, **10**, 629-645.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh and M. W. Bevan, 1987: GUS fusion: A-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, **6**, 3901-3907.
- Jeffery, C. J., 1999: Moonlighting proteins. *TIBS*, **24**, 8-11.
- Jeong, D., J. M. Kim, H. Cha, J. G. Oh, J. Park, S. H. Yun, E. S. Ju, E. S. Jeon, R. J. Hajjar and W. J. Park, 2008: PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling. *Circ. Res.*, **102**, 711-719.
- Johansson, C., A. K. Roos, S. J. Montano, R. Sengupta, P. Filippakopoulos, K. Guo, F. von Delft, A. Holmgren, U. Oppermann and K. L. Kavanagh, 2011: The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity. *Biochem. J.*, **433**, 303-311.
- Jung, J.-H. and C.-M. Park, 2011: Auxin modulation of salt stress signaling in Arabidopsis seed germination. *Plant Sign. Behav.*, **6**, 1198-1200.
- Kahle, J., M. Baake, D. Doenecke and W. Albig, 2005: Subunits of the heterotrimeric transcription factor NF-Y are imported into the nucleus by distinct pathways involving importin beta and importin 13. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 5339-5354.
- Keselman, A., R. N. Pulak, K. Moyal and N. Isakov, 2011: PICOT: A multidomain protein with multiple functions. *ISRN Immun.*, **6**, 1-7.
- Kevei, E., P. Gyula, B. Feher, R. Toth, A. Viczian, S. Kircher, D. Rea, D. Dorjgotov, E. Schafer, A. J. Millar, L. Kozma-Bognar and F. Nagy, 2007: *Arabidopsis thaliana* circadian clock is regulated by the small GTPase LIP1. *Curr. Biol.*, **17**, 1456-1464.
- Koornneef, M., C. Alonso-Blanco, A. J. Peeters and W. Soppe, 1998: Genetic Control of Flowering Time in Arabidopsis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 345-370.

- Koornneef, M. and J. H. Veen, 1980: Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *TAG Theor. Appl. Genet.*, **58**, 257-263.
- Kopka, J., C. Pical, A. M. Hetherington and B. Muller-Rober, 1998: Ca²⁺/phospholipid-binding (C2) domain in multiple plant proteins: novel components of the calcium-sensing apparatus. *Plant Mol. Biol.*, **36**, 627-637.
- Koprivova, A., S. T. Mugford and S. Kopriva, 2010: Arabidopsis root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. *Plant Cell Rep.*, **29**, 1157-1167.
- Krull, S., J. Thyberg, B. Bjorkroth, H. R. Rackwitz and V. C. Cordes, 2004: Nucleoporins as components of the nuclear pore complex core structure and Tpr as the architectural element of the nuclear basket. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 4261-4277.
- Kumimoto, R. W., L. Adam, G. J. Hymus, P. P. Repetti, T. L. Reuber, C. M. Marion, F. D. Hempel and O. J. Ratcliffe, 2008: The Nuclear Factor Y subunits NF-YB2 and NF-YB3 play additive roles in the promotion of flowering by inductive long-day photoperiods in Arabidopsis. *Planta*, **228**, 709-723.
- Kumimoto, R. W., Y. Zhang, N. Siefers and B. F. Holt, 3rd, 2010: NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, **63**, 379-391.
- Laemmli, U. K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laurent, T. C., E. C. Moore and P. Reichard, 1964: Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.*, **239**, 3436-3444.
- Lee, B. J., A. E. Cansizoglu, K. E. Suel, T. H. Louis, Z. Zhang and Y. M. Chook, 2006: Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell*, **126**, 543-558.
- Lee, H., R. L. Fischer, R. B. Goldberg and J. J. Harada, 2003: Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2152-2156.
- Lemaire, S. D., L. Michelet, M. Zaffagnini, V. Massot and E. Issakidis-Bourguet, 2007: Thioredoxins in chloroplasts. *Curr. Genet.*, **51**, 343-365.
- Li, H., D. T. Mapolelo, N. N. Dingra, S. G. Naik, N. S. Lees, B. M. Hoffman, P. J. Riggs-Gelasco, B. H. Huynh, M. K. Johnson and C. E. Outten, 2009a: The yeast iron regulatory proteins GRX3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochem.*, **48**, 9569-9581.
- Li, H., D. T. Mapolelo, S. Randeniya, M. K. Johnson and C. E. Outten, 2012: Human glutaredoxin 3 forms [2Fe-2S]-bridged complexes with human BOLA2. *Biochem.*, **51**, 1687-1696.
- Li, H. and C. E. Outten, 2012: Monothiol CGFS Glutaredoxins and BOLA-like Proteins: [2Fe-2S] binding partners in iron homeostasis. *Biochem.*, **51**, 4377-4389
- Li, S., N. Gutsche and S. Zachgo, 2011: The ROXY1 C-terminal L**LL motif is essential for the interaction with TGA transcription factors. *Plant Physiol.*, **157**, 2056-2068
- Li, S., A. Lauri, M. Ziemann, A. Busch, M. Bhave and S. Zachgo, 2009b: Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **21**, 429-441.
- Li, Z., S. Wakao, B. B. Fischer and K. K. Niyogi, 2009c: Sensing and responding to excess light. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 239-260.
- Li, H. M. and C. C. Chiu, 2010: Protein transport into chloroplasts. *Ann. Rev. Plant Biol.*, **61**, 157-180.
- Lill, R., 2009: Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, **460**, 831-838.

- Lillig, C. H., C. Berndt, O. Vergnolle, M. E. L'nn, C. Hudemann, E. Bill and A. Holmgren, 2005: Characterization of huma glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: A possible role as redox sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8168-8173.
- Lin, Z., K. Yin, D. Zhu, Z. Chen, H. Gu and L. J. Qu, 2007: AtCDC5 regulates the G2 to M transition of the cell cycle and is critical for the function of Arabidopsis shoot apical meristem. *Cell Res.*, **17**, 815-828.
- Lindermayr, C., S. Sell, B. Muller, D. Leister and J. Durner, 2010: Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell*, **22**, 2894-2907.
- Liu, J. X. and S. H. Howell, 2010: bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **22**, 782-796.
- Lottspeich, F. and J. W. Engels, 2006: *Bioanalytik*. Elsevier.
- Luo, M., Y. L. Jiang, X. X. Ma, Y. J. Tang, Y. X. He, J. Yu, R. G. Zhang, Y. Chen and C. Z. Zhou, 2010: Structural and biochemical characterization of yeast monothiol glutaredoxin Grx6. *J. Mol. Biol.*, **398**, 614-622.
- Macara, I. G., 2001: Transport into and out of the nucleus. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **65**, 570-594.
- Maier, T., M. Guell and L. Serrano, 2009: Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.*, **583**, 3966-3973.
- Mantovani, R., 1999: The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*, **239**, 15-27.
- Martin, J. L., 1995: Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure*, **3**, 245-250.
- Meijer, H. J. and T. Munnik, 2003: Phospholipid-based signaling in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.*, **54**, 265-306.
- Meng, L., J. H. Wong, L. J. Feldman, P. G. Lemaux and B. B. Buchanan, 2010: A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3900-3905.
- Mercier, A. and S. Labbe, 2009: Both Php4 function and subcellular localization are regulated by iron via a multistep mechanism involving the glutaredoxin GRX4 and the exportin Crm1. *J. Biol. Chem.*, **284**, 20249-20262.
- Mesecke, N., A. Spang, M. Deponte and J. M. Herrmann, 2008: A novel group of glutaredoxins in the cis-Golgi critical for oxidative stress resistance. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2673-2680.
- Meyer, Y., C. Belin, V. Delorme-Hinoux, J. P. Reichheld and C. Riondet, 2012: Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: Molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 1124-1160.
- Meyer, Y., C. Riondet, L. Constans, M. R. Abdelgawwad, J. P. Reichheld and F. Vignols, 2006: Evolution of redoxin genes in the green lineage. *Photosyn. Res.*, **89**, 179-192.
- Meyer, Y., W. Siala, T. Bashandy, C. Riondet, F. Vignols and J. P. Reichheld, 2008: Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochem. Biophys. Acta*, **1783**, 589-600.
- Meyer, Y., F. Vignols and J. P. Reichheld, 2002: Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.*, **347**, 394-402.
- Michael, T. P. and C. R. McClung, 2003: Enhancer trapping reveals widespread circadian clock transcriptional control in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **132**, 629-639.
- Michelet, L., M. Zaffagnini, V. Massot, E. Keryer, H. Vanacker, M. Miginiac-Maslow, E. Issakidis-Bourguet and S. D. Lemaire, 2006: Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: new crosstalks to explore. *Photosyn. Res.*, **89**, 225-245.
- Mittler, R., A. Finka and P. Goloubinoff, 2012: How do plants feel the heat? *Trends Biochem. Sci.*, **37**, 118-125.

- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery and F. Van Breusegem, 2004: Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*, **9**, 490-498.
- Montange, R. K. and R. T. Batey, 2008: Riboswitches: emerging themes in RNA structure and function. *Ann. Rev. Biophys.*, **37**, 117-133.
- Montrichard, F., F. Alkhalfioui, H. Yano, W. H. Vensel, W. J. Hurkman and B. B. Buchanan, 2009: Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J. Prot.*, **72**, 452-474.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich, 1986: Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51**, 263-273.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Murmu, J., M. J. Bush, C. DeLong, S. Li, M. Xu, M. Khan, C. Malcolmson, P. R. Fobert, S. Zachgo and S. R. Hepworth, 2010: *Arabidopsis* basic leucine-zipper transcription factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and are redundantly required for anther development. *Plant Physiol.*, **154**, 1492-1504.
- Nagata, T., E. Niyada, N. Fujimoto, Y. Nagasaki, K. Noto, Y. Miyanoiri, J. Murata, K. Hiratsuka and M. Katahira, 2010: Solution structures of the trihelix DNA-binding domains of the wild-type and a phosphomimetic mutant of *Arabidopsis* GT-1: mechanism for an increase in DNA-binding affinity through phosphorylation. *Proteins*, **78**, 3033-3047.
- Nardozzi, J. D., K. Lott and G. Cingolani, 2010: Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commu. Sig.*, **8**, 32.
- Nelson, D. E., P. P. Repetti, T. R. Adams, R. A. Creelman, J. Wu, D. C. Warner, D. C. Anstrom, R. J. Bensen, P. P. Castiglioni, M. G. Donnarummo, B. S. Hinchey, R. W. Kumimoto, D. R. Maszle, R. D. Canales, K. A. Krolkowski, S. B. Dotson, N. Gutterson, O. J. Ratcliffe and J. E. Heard, 2007: Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 16450-16455.
- Niklas, K. J. and U. Kutschera, 2012: Plant development, auxin, and the subsystem incompleteness theorem. *Front. Plant Sci.*, **3**, 37.
- Noctor, G. and C. H. Foyer, 1998: Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 249-279.
- Ooka, H., K. Satoh, K. Doi, T. Nagata, Y. Otomo, K. Murakami, K. Matsubara, N. Osato, J. Kawai, P. Carninci, Y. Hayashizaki, K. Suzuki, K. Kojima, Y. Takahara, K. Yamamoto and S. Kikuchi, 2003: comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.*, **10**, 239-247.
- Oyama, T., Y. Shimura and K. Okada, 1997: The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.*, **11**, 2983-2995.
- Pan, J. L. and J. C. Bardwell, 2006: The origami of thioredoxin-like folds. *Protein Sci.*, **15**, 2217-2227.
- Paponov, I. A., W. D. Teale, M. Trebar, I. Blilou and K. Palme, 2005: The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci.*, **10**, 170-177.
- Park, J., Y. S. Kim, S. G. Kim, J. H. Jung, J. C. Woo and C. M. Park, 2011: Integration of auxin and salt signals by the NAC transcription factor NTM2 during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **156**, 537-549.
- Place, R. F., L.-C. Li, D. Pookot, E. J. Noonan and R. Dahiya, 2008: MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl. Acad. Sciences USA*, **105**, 1608-1613.
- Popescu, S. C., G. V. Popescu, M. Snyder and S. P. Dinesh-Kumar, 2009: Integrated analysis of co-expressed MAP kinase substrates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.*, **4**, 524-527.

- Popescu, S. C., M. Snyder and S. Dinesh-Kumar, 2007: Arabidopsis protein microarrays for the high-throughput identification of protein-protein interactions. *Plant Signal Behav.*, **2**, 416-420.
- Qi, Y. and N. V. Grishin, 2005: Structural classification of thioredoxin-like fold proteins. *Proteins*, **58**, 376-388.
- Reinhardt, D., E. R. Pesce, P. Stieger, T. Mandel, K. Baltensperger, M. Bennett, J. Traas, J. Friml and C. Kuhlemeier, 2003: Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, **426**, 255-260.
- Riondet, C., J. P. Desouris, J. G. Montoya, Y. Chartier, Y. Meyer and J. P. Reichheld, 2012: A dicotyledon-specific glutaredoxin GRXC1 family with dimer-dependent redox regulation is functionally redundant with GRXC2. *Plant Cell Environ.*, **35**, 360-373.
- Rodriguez-Manzanares, M. T., J. Tamarit, G. Belli, J. Ros and E. Herrero, 2002: Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 1109-1121.
- Romier, C., F. Cocchiarella, R. Mantovani and D. Moras, 2003: The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J. Biol. Chem.*, **278**, 1336-1345.
- Rosche, E. and P. Westhoff, 1995: Genomic structure and expression of the pyruvate, orthophosphate dikinase gene of the dicotyledonous C4 plant *Flaveria trinervia* (Asteraceae). *Plant Mol. Biol.*, **29**, 663-678.
- Rouhier, N., J. Couturier, M. K. Johnson and J. P. Jacquot, 2009: Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 43-52.
- Rouhier, N., E. Gelhaye and J. P. Jacquot, 2004: Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *CMLS Cell. Mole. Life Sci.*, **61**, 1266-1277.
- Rouhier, N., C. S. Koh, E. Gelhaye, C. Corbier, F. Favier, C. Didierjean and J. P. Jacquot, 2008a: Redox based anti-oxidant systems in plants: biochemical and structural analyses. *Biochem. Biophys. Acta*, **1780**, 1249-1260.
- Rouhier, N., S. D. Lemaire and J. P. Jacquot, 2008b: The role of glutathione in photosynthetic organisms: Emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Ann. Rev. Plant Biol.*, **59**, 143-166.
- Saito, Y., H. Shibayama, H. Tanaka, A. Tanimura, I. Matsumura and Y. Kanakura, 2011: PICOT is a molecule which binds to anamorsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **408**, 329-333.
- Samarel, A. M., 2008: PICOT: a multidomain scaffolding inhibitor of hypertrophic signal transduction. *Circ. Res.*, **102**, 625-627.
- Sambrook, J. and D. W. Russel, 2001: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. *Cold Spring Harbor Lab. Press*.
- Sanchez, S. E., J. I. Cagnola, M. Crepy, M. J. Yanovsky and J. J. Casal, 2011: Balancing forces in the photoperiodic control of flowering. *Photochemi. Photobiol. Sci.*, **10**, 451-460.
- Scheibe, R., 1991: Redox-modulation of chloroplast enzymes A common principle for individual control. *Plant Physiol.*, **96**, 1-3.
- Scheibe, R., 2004: Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol. Plant.*, **120**, 21-26.
- Scheibe, R., 2010: Redox-Regulation Ein Netzwerk zur flexiblen Adaptation von Stoffwechsel und Entwicklung bei Pflanzen. *BiuZ.*, **2**, 92-100.
- Scheibe, R., J. E. Backhausen, V. Emmerlich and S. Holtgreffe, 2005: Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *J. Experim. Botany*, **56**, 1481-1489.
- Schurmann, P. and J. P. Jacquot, 2000: Plant thioredoxin systems revisited. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 371-400.
- Seidel, T., C. Kluge, M. Hanitzsch, J. Ross, M. Sauer, K. J. Dietz and D. Gollack, 2004: Colocalization and FRET-analysis of subunits c and a of the vacuolar H⁺-ATPase in living plant cells. *J. Biotechnol.*, **112**, 165-175.

- Shahmuradov, I. A., V. V. Solovyev and A. J. Gammerman, 2005: Plant promoter prediction with confidence estimation. *Nucleic. Acids Res.*, **33**, 1069-1076.
- Sieburth, L. E. and E. M. Meyerowitz, 1997: Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell*, **9**, 355-365.
- Siefers, N., K. K. Dang, R. W. Kumimoto, W. E. t. Bynum, G. Tayrose and B. F. Holt, 3rd, 2009: Tissue-specific expression patterns of Arabidopsis NF-Y transcription factors suggest potential for extensive combinatorial complexity. *Plant Physiol.*, **149**, 625-641.
- Starke, D. W., P. B. Chock and J. J. Mieyal, 2003: Glutathione-thiyl radical scavenging and transferase properties of human glutaredoxin (thioltransferase). Potential role in redox signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **278**, 14607-14613.
- Stephenson, T. J., C. L. McIntyre, C. Collet and G. P. Xue, 2010: TaNF-YC11, one of the light-upregulated NF-YC members in *Triticum aestivum*, is co-regulated with photosynthesis-related genes. *Funct. Integr. Genomics*, **10**, 265-276.
- Stracke, R., J. J. Favory, H. Gruber, L. Bartelniewoehner, S. Bartels, M. Binkert, M. Funk, B. Weisshaar and R. Ulm, 2010: The Arabidopsis bZIP transcription factor HY5 regulates expression of the PFG1/MYB12 gene in response to light and ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Environ.*, **33**, 88-103.
- Ströher, E. and A. H. Millar, 2012: The biological roles of glutaredoxins. *Biochem. J.*, **446**, 333-348.
- Tamarit, J., G. Belli, E. Cabiscol, E. Herrero and J. Ros, 2003: Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25745-25751.
- Unte, U. S., A. M. Sorensen, P. Pesaresi, M. Gandikota, D. Leister, H. Saedler and P. Huijser, 2003: SPL8, an SBP-box gene that affects pollen sac development in Arabidopsis. *Plant Cell*, **15**, 1009-1019.
- Vachon, P., A. Mercier, M. Jbel and S. Labbe, 2012: The monothiol glutaredoxin GRX4 exerts an iron-dependent inhibitory effect on Php4 function. *Eukaryot. Cell*, **11**, 806-819.
- Van Breusegem, F. and J. F. Dat, 2006: Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.*, **141**, 384-390.
- Volkov, R., I. Panchuk, P. Mullineaux and F. Schöffl, 2006: Heat stress-induced is required for effective expression of heat shock genes in Arabidopsis. *Plant Mol.Biol.*, **61**, 733-746.
- Wachter, A., M. Tunc-Ozdemir, B. C. Grove, P. J. Green, D. K. Shintani and R. R. Breaker, 2007: Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *Plant Cell*, **19**, 3437-3450.
- Wahid, A., S. Gelani, M. Ashraf and M. Foolad, 2007: Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Botany*, **61**, 199-223.
- Walter, M., C. Chaban, K. Schütze, O. Batistic, K. Weckerman, C. N.,ke, D. Blazevic, C. Grefen, K. Schumacher, C. Oecking, K. Harter and J. Kudla, 2004: Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.*, **40**, 428-438.
- Wang, L., B. Ouyang, Y. Li, Y. Feng, J. P. Jacquot, N. Rouhier and B. Xia, 2012: Glutathione regulates the transfer of iron-sulfur cluster from monothiol and dithiol glutaredoxins to apo ferredoxin. *Protein Cell*, **3**, 714-721.
- Wang, Z., S. Xing, R. P. Birkenbihl and S. Zachgo, 2009: Conserved functions of Arabidopsis and rice CC-type glutaredoxins in flower development and pathogen response. *Mol. Plant*, **2**, 323-335.
- Weiss, R., S. Basu, S. Hooshangi, A. Kalmbach, D. Karig, R. Mehreja and I. Netravali, 2003: Genetic circuit building blocks for cellular computation, communications, and signal processing. *Nat. Computing*, **2**, 47-84.
- Wellmer, F. and J. L. Riechmann, 2010: Gene networks controlling the initiation of flower development. *Trends Genet.*, **26**, 519-527.

- Weltmeier, F., F. Rahmani, A. Ehlert, K. Dietrich, K. Schutze, X. Wang, C. Chaban, J. Hanson, M. Teige, K. Harter, J. Vicente-Carbajosa, S. Smeekens and W. Droge-Laser, 2009: Expression patterns within the Arabidopsis C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Mol. Biol.*, **69**, 107-119.
- Wenkel, S., F. Turck, K. Singer, L. Gissot, J. Le Gourrierec, A. Samach and G. Coupland, 2006: CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of Arabidopsis. *Plant Cell*, **18**, 2971-2984.
- Wente, S. R., 2000: Gatekeepers of the nucleus. *Science*, **288**, 1374-1377.
- Wilson, R. N., J. W. Heckman and C. R. Somerville, 1992: Gibberellin Is Required for Flowering in Arabidopsis thaliana under Short Days. *Plant Physiol.*, **100**, 403-408.
- Whippo, C. W., P. Khurana, P. A. Davis, S. L. DeBlasio, D. DeSloover, C. J. Staiger and R. P. Hangarter, 2011: THRUMIN1 is a light-regulated actin-bundling protein involved in chloroplast motility. *Curr. Biol.*, **21**, 59-64.
- Witte, S., M. Villalba, K. Bi, Y. Liu, N. Isakov and A. Altman, 2000: Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF-kappaB pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *J. Biol. Chem.*, **275**, 1902-1909.
- Wolosiuk, R. A., r. Sch and B. B. Buchanan, 1980: Thioredoxin and ferredoxin-thioredoxin reductase of spinach chloroplasts. *Meth. Enzymol.*, **69**, 382-391.
- Wu, Q., J. Lin, J. Z. Liu, X. Wang, W. Lim, M. Oh, J. Park, C. B. Rajashekar, S. A. Whitham, N. H. Cheng, K. D. Hirschi and S. Park, 2012: Ectopic expression of Arabidopsis glutaredoxin AtGRXS17 enhances thermotolerance in tomato. *Plant Biotechnol. J.*, **19**, 1105-1114.
- Xing, S., A. Lauri and S. Zachgo, 2006: Redox regulation and flower development: A novel function for glutaredoxins. *Plant Biol.*, **8**, 547-555.
- Xing, S., M. G. Rosso and S. Zachgo, 2005: ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in Arabidopsis thaliana. *Development*, **132**, 1555-1565.
- Xing, S. and S. Zachgo, 2008: ROXY1 and ROXY2, two Arabidopsis glutaredoxin genes, are required for anther development. *Plant J.*, **53**, 790-801.
- Xu, X. M., A. Rose and I. Meier, 2007a: NUA Activities at the plant nuclear pore. *Plant Signal Behav.*, **2**, 553-555.
- Xu, X. M., A. Rose, S. Muthuswamy, S. Y. Jeong, S. Venkatakrishnan, Q. Zhao and I. Meier, 2007b: NUCLEAR PORE ANCHOR, the Arabidopsis homolog of Tpr/Mlp1/Mlp2/megator, is involved in mRNA export and SUMO homeostasis and affects diverse aspects of plant development. *Plant Cell*, **19**, 1537-1548.
- Yadav, R. K., T. Girke, S. Pasala, M. Xie and G. V. Reddy, 2009: Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4941-4946.
- Yamazaki, D., K. Motohashi, T. Kasama, Y. Hara and T. Hisabori, 2004: Target proteins of the cytosolic thioredoxin in Arabidopsis thaliana *Plant Cell Physiol.*, **45**, 18-27.
- Yant, L., J. Mathieu and M. Schmid, 2009: Just say no: floral repressors help Arabidopsis bide the time. *Cur. Opin. Plant Biol.*, **12**, 580-586.
- Zander, M., S. Chen, J. Imkampe, C. Thurow and C. Gatz, 2012: Repression of the Arabidopsis thaliana jasmonic acid/ethylene-induced defense pathway by TGA-interacting glutaredoxins depends on their C-terminal ALWL motif. *Mol. Plant*, **5**, 831-840.
- Zander, M., S. La Camera, O. Lamotte, J. P. Metraux and C. Gatz, 2010: Arabidopsis thaliana class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses. *Plant J.*, **61**, 200-210.

- Zanetti, M. E., F. A. Blanco, M. P. Beker, M. Battaglia and O. M. Aguilar, 2010: A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-Rhizobium etli symbiosis. *Plant Cell*, **22**, 4142-4157.
- Zhang, J., S. Chen, Y. Li, B. Di, J. Zhang and Y. Liu, 2008: Effect of high temperature and excessive light on glutathione content in apple peel. *Front. Agric. China*, **2**, 97-102.
- Zhang, Y., S. Schwarz, H. Saedler and P. Huijser, 2007: SPL8, a local regulator in a subset of gibberellin-mediated developmental processes in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.*, **63**, 429-439.
- Zheng, Y., N. Ren, H. Wang, A. J. Stromberg and S. E. Perry, 2009: Global identification of targets of the Arabidopsis MADS domain protein AGAMOUS-Like15. *Plant Cell*, **21**, 2563-2577.
- Ziemann, M., M. Bhave and S. Zachgo, 2009: Origin and diversification of land plant CC-type glutaredoxins. *Genome Biol. Evol.*, **1**, 265-277.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
35S	35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
AGPase	ADP-Glukose-Pyrophosphorylase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARSC	Arsenat-Reduktase
AtGRXS17	Glutaredoxin S17-Protein aus <i>A. thaliana</i>
AtGRXS17	Glutaredoxin S17-Gen aus <i>A. thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BASTA	Phosphinothricin
BCIP	5-Brom-4chlor-3indolylphosphat
BD	Bindedomäne
bidest.	doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi
ca.	zirka
CaMV	Cauliflower Mosaik Virus
cDNA	copy-DNA
CLIC	intrazelluläre Chlorid-Kanäle
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Diamide	N,N-Dimethylamid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>nucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mischung
DSB	Disulfidbrücken-bildende Proteine
DTNB	5, 5'-Dithiobis -2, 2'-nitrobenzoesäure
DTT	DL-Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri, und andere
Fd	Ferredoxin
for	forward, vorwärts
FTR	Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase
FTR	Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase
g	Gramm
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescence protein</i>)
ggf.	gegebenenfalls
GPX	Glutathionperoxidase
Grx	Glutaredoxin
grxs17	Glutaredoxin S17-Gen
GrxS17	Glutaredoxin S17-Protein
GSH	L-Glutathion _{red}
GSSG	L-Glutathion _{ox}
GST	Glutathion-S-Transferase
gU	Protein-Disulfid-Oxidoreduktasen
HCl	Salzsäure
HD	Homologie Domäne
His	L-Histidin
HL	Hochlicht
i. d. R.	in der Regel

Anhang

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
KO	knock-out
K-P	Kalium-Phosphat
KT	Kurztag
l	Liter
Leu	L-Leucin
LiAc	Lithiumacetat
LT	Langtag
m	Milli
M	Molar
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
miRNA	kleine nicht codierende RNA's
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	Boten- (<i>messenger</i>) RNA
MS	Murashige & Skoog
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NAD(H)	(reduziertes) Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	(reduziertes) Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na-P	Natrium-Phosphat
NL	Normallicht
nm	Nanometer
NTR	NADPH-Thioredoxin-Reduktase
NTRC	chloroplastidäre NADP-Trx-Reduktase
OD	optische Dichte
ox.	oxidiert
p.a.	<i>per analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>chain reaction</i>)
PDI	Protein-Disulfid-Isomerasen
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIN	PIN-; Auxintransporter; Benannt nach dem gebildeten Phänotyp PIN-like
PKC θ	Proteinkinase C theta
Prx	Peroxidin
Prxs	Peroxiredoxinen
QSOX	Quiescin-Sulfhydryl-Oxidase
r	Resistenzgen
red	reduziert
rev	reverse, rückwärts
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>nucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RNR	Ribonukleotid-Reduktase
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RubisCO	Ribulose-1,5-bisPhosphat-Carboxylase/Oxygenase
SCO	Kupfer-Ionen-bindenden Proteine
SDS	Natrium (<i>sodium</i>) -dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
std.	Stunde
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris gepuffertes (<i>buffered</i>) EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TGA	basic leucine zipper Transkription Faktor
TLP	Thioredoxin-ähnliches Protein
Tm	Schmelztemperatur des jeweiligen Primers

Tris	Tris(hydromethyl)-aminomethan
Trp	L-Tryptophan
Trx	Thioredoxin
U	Unit(s)(= $\mu\text{mol Substratumsatz} \cdot \text{min}^{-1}$)
u. a.	unter anderem
ÜN	Über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v	Volumen (<i>volume</i>)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
w	<i>weight</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
xg	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YT	Hefe-Trypton (yeast trypton)
YT-Medium	yeast-tryptone
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
γ -ECS	gamma GLUTAMYL-CYSTEINE SYNTHASE
μ	Mikro

8.2 Materialien

8.2.1 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Brutschränke (30 °C und 37 °C)	Memmert, Schwabach
Feinwaage (AE 166)	Mettler, Helsinki, Finnland
Flachbrettscanner (Scanjet 4610)	Hewlet Packard
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Heizrührer	Ikamag, Staufen i. Br.
Klimaschank	Rubarth Apparate GmbH, Hannover
Klimakammer	Heifo, Osnabück/Hannover
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Milli-Q plus	Millipore, Erkrath
Nap-25 Säule	Pharmacia Biotch
Photometer (1101 M)	Eppendorf, Hamburg
Reprostar II UV-Tisch	Camag, Schweiz
Roller, Schüttler	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
SonT-Agro-Lampen	Philips, Eindhoven, NL
Sonofizierer-Vibracell	Bioblock Scientific
Sorvall Zentrifuge (RC 5 B Plus)	Kendro Laboratory, Hamburg
Speed-Vac Savant	Bachofer, Reutlingen
Sterilbank	Mahl, Neuss
Thermomixer comfort (5436)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (5417R)	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät Vibracell	Bioblock Scientific
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckmann
Uvikon 810-Photometer	Kontron Instruments, Schweiz
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Vortex genie 2	Scientific Industries Inc., Boheme, USA
Waage (g-Bereich)	Sartorius, Göttingen

8.2.2 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Applichem, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid	Applichem, Darmstadt
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	ICN Biomedicals Inc, Aurora, Ohio USA
Ampicillin	USB, Cleveland, Ohio USA
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
BSA	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Riedel-de Haen, Seelze
Coomassie Brilliant Blue R 250 / G 250	Serva, Heidelberg
Disodium 3-(4-meth-oxyspiro (1,2dioxetane-3,2'-(5'chloro) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan) -4-yl) phenyl phosphate (CSPD)	Roche, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DECP)	Sigma, Deisenhofen
Dithiotreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Applichem, Darmstadt
Ethanol	Riedel-de Haen, Seelze
Exsikkatorfett	Roth, Karlsruhe
Ficoll	Amersham, Braunschweig
Glyzerin	Applichem, Darmstadt
Glycin	Applichem, Darmstadt
Hepes	Biomol GmbH, Hamburg
Homidumbromid	Biomol GmbH, Hamburg
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Applichem, Darmstadt
Lithiumacetat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Applichem, Darmstadt
Merck-H ₂ O	Merck, Hohenbrunn
Methanol	Riedel-de Haen, Seelze
MOPS	Applichem, Darmstadt
Murashige und Skoog (MS)-Medium	Duchefa, Haarlem NL
Natriumchlorid	Applichem, Darmstadt
Natriumbisulfit	Roth, Karlsruhe
Nukleotide (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
o-Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Percoll	Amersham, Braunschweig
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykol (PEG)	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglykol 1000	Sigma, Deisenhofen
Protease-Inhibitor-Cocktail für Pflanzen	Sigma, Deisenhofen
Roti-Luminol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Riedel-de Haen, Seelze
SDS	Fluka, Seelze
TEMED	Applichem, Darmstadt
Tetrazyklin	Duchefa, Haarlem NL
Tris	Applichem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Hohenbrunn
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Sigma, Deisenhofen

8.2.3 Verwendete Enzyme

Enzym bzw. Marker	Bezugsquelle
Bam HI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Mass Ruler	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Nde I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Page Ruler Prestaid Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase-Inhibitor (RNasin)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Superscript Reverse Transkriptase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Kit-System	Bezugsquelle
RNeasy Plant Mini Kit	Macherey und Nagel, Düren
Ready-To-Go DNA-Labeling Beads-Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
NucleoSpinRNeasy Plant	Macherey und Nagel, Düren
Nucleo Spin Extract Kit	Macherey und Nagel, Düren
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

8.2.4 Verwendete Verbrauchs-Materialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Alufolie	handelsüblich
Bakterienpetrischalen	Diagonal, Münster
Erlenmeyerkolben 50, 100, 500, 1000 ml	Schott, Mainz
Hybond-N Nylonmembran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kunststoffküvetten Plastibrand (UV)	Brand, Wertheim
Miracloth	Schleicher & Schuell, Dassel
Mull	Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Polypropylen-Kulturröhrchen 2059	Falcon, Lincoln Park, NJ (USA)
Reaktionsgefäße „Eppis“ (0,5/1,0/1,5/2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme X-Ray Retina	Kodak
Whatman-Papier	Biometra, Göttingen

8.2.5 Verwendete Software

Programm	Internetseite bzw. Hersteller
Adobe Photoshop	Adobe, USA
Aida Image Analyser	Raytest, Straubenhardt, Germany
The Bio-Array Resource for Plant Biology	http://bar.utoronto.ca/welcome.htm
Biological software	http://bioweb.pasteur.fr/intro-uk.html
Chromas 1.42	McCarthy, Brisbane, Australien
Clone Manager	Sci Ed Software, USA
Fasta	http://www.ncbi.nlm.gov
GenBank	http://www.ncbi.nlm.gov/GenBank
Genevestigator	http://genevestigator.com
GraphPad Prism 4	http://www.graphpad.com/
Informationsseite	http://brenda.uni-koeln.de
MAtDB (MIPS –Datenbank)	http://mips.gsf.de/proj/thal/db
MatrixScience: <i>Mascot-Search-Programm</i> ,	http://www.matrixscience.com/searchformselect.html
Medline	http://www.ncbi.nlm.gov
Office 2010	Microsoft, Redmont (USA)
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.gov
Salk Institute Genomic Analysis	http://signal.salk.edu/tdna_protocols.html
The Arabidopsis Informations Resource (Tair)	http://www.arabidopsis.org
T-DNA-Express	http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress
The Institute for Genomic Research (TIGR)	http://www.tigr.org/

8.3 Liste der Trx in *A. thaliana*

Tabelle 36 Zusammenstellung der in *A. thaliana* vorhandene Trx. Sortiert nach ATG Nummer AS der aktive Site vermutetem Kompartimen

Agi-Nummer:	Trivial-Name:	Lokalisation:	AS-Anzahl:	AS-Motiv im akt. Zentrum:
At1g03680	m1	Plastid	179	WCGPC
At1g08570	Lilium1 AtAcht4 a/b	Zytosol / plastid	275	GCGGC
At1g11530	CxxS2	Zytosol /Kern Serrato <i>ET AL</i> 2008	118	WCIPS
At1g19730	h4	Zytosol	119	WCPPC
At1g31020	o2	Zytosol (BAR)	159	WCGPC
At1g43560	y2	Plastid	167	WCGPC
At1g45145	h5	Zytosol	118	WCPPC
At1g50320	X	Plastid	182	WCGPC
At1g52990	TARWCGPC	ER/Zytosol/ Extrazellular	313	WCGPC
At1g59730	h7	Zytosol	129	WCGPC
At1g60420	Nucleoredoxin1	Nucleus	578	WCGPC / WCPPC
At1g62180	Apr2	Plastid	454	WCPFC
At1g69880	h8	Zytosol	148	WCGPC
At1g76080	CDSP32	Plastid	302	HCGPC
At1g76760	y1	Plastid	151	WCGPC
At2g15570	m3	Plastid	173	WCGPC
At2g33270	Lilium4 AtAcht3	Plastid	273	SCGGC
At2g35010	o1	Mitochondrium	194	WCGPC
At2g40790	CxxS1 (h6)	Zytosol / Kern Serrato 2008	154	WCLPS
At3g02730	f1	Plastid	178	WCGPC
At3g06730	x	Plastid	183	WCGPC
At3g08710	h9	Zytosol	140	WCGPC
At3g15360	m4	Plastid	193	WCGPC
At3g17880	AtTDX AtHip2	Zytosol/nucleus	380	WCGPC
At3g51030	h1	Zytosol	114	WCGPC
At3g53220	WCGVC	Zytosol	126	WCGVC
At3g56420	h10	Zytosol	100	WCVPC
At4g03520	m2	Plastid	186	WCGPC
At4g04610.	Apr1	Plastid	465	WCPFC
At4g04950	AtGRXS17	Zytosol	488	WCDAS
At4g21990	Apr3 PRH26	Plastid	458	WCPFC
At4g26160	Lilium 2 (Lilium 5 MEYER <i>ET AL.</i> , 2005) AtAcht1	Plastid	221	WCGSC
At4g29670	Lilium 5 (Lilium 2 Meyer <i>ET AL.</i> , 2005) AtAcht2 a/b	Plastid	236	WCASC
At4g31240	Nucleoredoxin2	Nucleus	392	WCRPC / WCPPF
At4g32580	p1	Zytosol	160	WCDAS
At4g37200	HCF164	Plastid	261	WCEVC
At5g04260	WCRKC2	Plastid	186	WCRKC
At5g06690	WCRKC1	Plastid	185	WCRKC
At5g16400	f2	Plastid	185	WCGPC
At5g39950	h2	Zytosol	133	WCGPC
At5g42850	Clot TRP14	Zytosol	134	WCPDC
At5g42980	h3	Zytosol	118	WCPPC
At5g61440	Lilium3 AtAcht5	Plastid	245	GCGGC

8.4 Liste der Grx in *A. thaliana*Tabelle 37 Zusammenstellung der Grx und Grx-like Proteinen aus *A. thaliana*

Agri-Nummer	Trivial-Namen:		Lokalisierung	AS-Anzahl:	AS-Motiv im akt. Zentrum:
At1g03020	AtGRXS1	ROXY 16	Zytosol	102	SCCMS
At1g03850	AtGRXS13	ROXY 18	Chloroplast	173	GCCLG
At1g06830	AtGRXS11	ROXY 6	Zytosol	99	SCCLS
At1g22630	GRL12		Extrazellulär, Plastiden & Kern (BAR)	118	FPLCC
At1g28480	AtGRXC9	ROXY 19 GRX480	Zytosol	137	GCCMC
At1g32760	GRL?		Chloroplast	314	FEAC
At1g64500	GRL3		Zytosol	364	YEDC
At1g77370	AtGRXC3		Zytosol / Apoplast	130	YCPYC
At2g20270	AtGRXS12		Chloroplast	179	WCSYS
At2g30540	AtGRXS9	ROXY 7	Zytosol	102	SCCMS
At2g38270	ATGRXS16	CXIP 1 AtGRXcp 1	Chloroplast	293	QCGFS
At2g41330	GRL?		mitochondrium	402	FEAC
At2g47870	AtGRXC12	ROXY 5	Zytosol	102	SCCMC
At2g47880	AtGRXC13	ROXY 9	Zytosol	102	SCCLC
At3g02000	AtGRXC7	ROXY 1	Zytosol	136	TCCMC
At3g11773	GRL?			200	
At3g11920	GLR?		Zytosol (BAR)	630	EEFRR
At3g15660	AtGRXS15	GDXN	Mitochondrium	169	QCGFS
At3g21460	AtGRXS10	ROXY 3	Mitochondrium	102	TCCMS
At3g28850	GRL10		Mitochondrium	383	YEESC
At3g28850	GRL?				
At3g44020	GRL11		Chloroplast	162	Nicht ähnlich
At3g54900	AtGRXS14	CXIP 2 AtGRXcp 2	Chloroplast	150	MCGFS
At3g57070	GRL9A/B		Zytosol	412/413	YEDCCC
At3g62930	AtGRXS6	ROXY 17	Zytosol	102	SCCMS
At3g62950	AtGRXC11	ROXY 4	Zytosol	103	SCCMC
At3g62960	AtGRXC14	ROXY 8	Zytosol	102	SCCLC
At4g04950	AtGRXS17		Zytosol	488	1xRCGFS 2xKCGFS
At4g08550	GRL?		Zytosol (BAR)	637	EEFA
At4g10000	GRL?				
At4g10630	GRL8		Chloroplast	341	FEAC
At4g15660	ATGRXS8	ROXY 15	Zytosol	102	SCCMS
At4g15670	ATGRXS7	ROXY 14	Zytosol	102	SCCMS
At3g55040	GRL?				
At4g15680	AtGRXS4	ROXY 13	Zytosol	102	SCCMS
At4g15690	AtGRXS5	ROXY 12	Zytosol	102	SCCMS
At4g15700	AtGRXS3	ROXY 11	Zytosol	102	SCCMS
At4g28730	AtGRXC5		Chloroplast	174	WCSYC
At4g33040	AtGRXC6	ROXY 21	Zytosol	144	SCCMC
At5g01420	GRL6A/B		Zytosol	401/379	TFDDC
At5g03870	GRL4		Zytosol	407	TFEDC
At5g06470	GRL7		Kern & Mitochondrien (BAR)	290	TFEAC
At5g11930	AtGRXC10	ROXY 20	Chloroplast	145	SCCMC
At5g13810	GRL1A/B		Chloroplast	266/259	TYEDC
At5g14070	AtGRXC8	ROXY 2	Zytosol	140	TCCMC
At5g15802	GRL5		Extrazellulär & ER	112	Nicht ähnlich
At5g18600	AtGRXS2	ROXY 10	Zytosol	102	SCCMS
At5g20500	AtGRXC4		Zytosol / Apoplast	135	YCPYC
At5g02780	GRL?				
At5g02790	GRL?				
At5g39865	GRL?		Chloroplast	390	YEDCC
At5g40370	AtGRXC2	GRX370	Zytosol / Apoplast	111	YCPYC
At5g52150	GRL?				
At5g58530	GRL2A/B		Chloroplast	253/247	FEAC
At5g63030	AtGRXC1		Zytosol	125	YCGYC

8.5 Phänotyp der AtGRXS17-Mutante unter HL

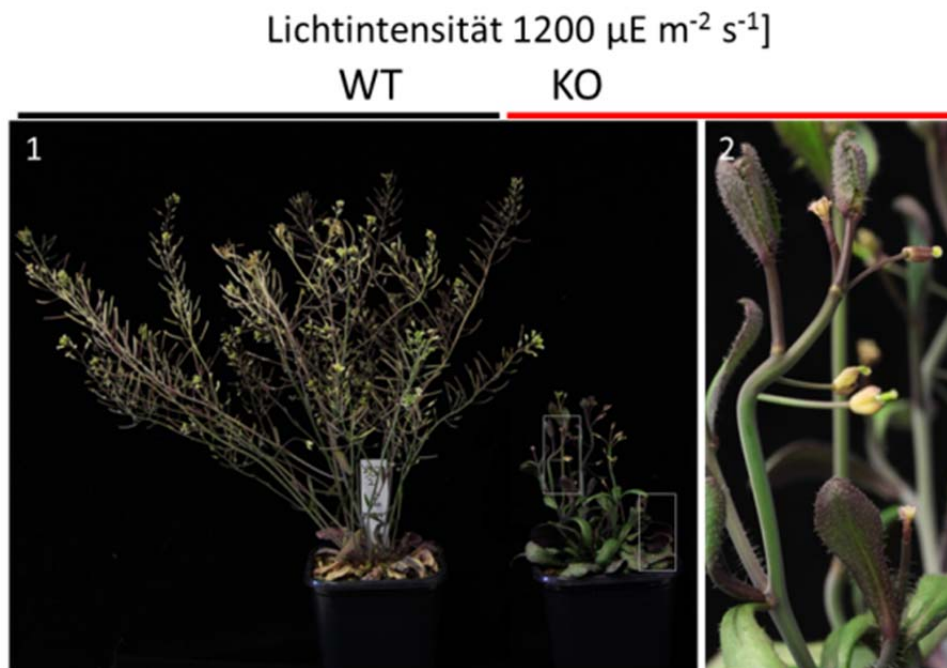


Abb. 46: Neun Wochen alte WT und AtGrxS17-KO Pflanzen, die im LT unter Hochlicht (HL) Bedingungen ($1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogen wurden. Die WT-Pflanzen entwickeln sich typisch für die Lichtbedingungen. Die KO-Pflanzen sind dagegen stark morphologische verändert. Sowohl die Blattstruktur, als auch die Blütenbildung ist stark eingeschränkt. Auch die Seitentriebe sind in ihrer Differenzierung betroffen. Zu diesem Zeitpunkt ist keine Schotenbildung erkennbar. Weiter ist eine starke Einlagerung von Anthocyanen in der Unterseite der Blätter zu verzeichnen, die leicht bis zur Blattoberseite durchscheint, während die WT Pflanzen komplett mit Anthocyanen durchgefärbte Blätter aufweisen.

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Renate Scheibe für die Bereitstellung des interessanten Themas und die stets kompetente Betreuung während meiner Promotionszeit herzlich bedanken. Sie gaben mir die Möglichkeit frei an diesem Thema zu arbeiten und unterstützten durch anregende Fragen und Ideen den Fortgang dieser Arbeit. Zusätzlich danke ich Ihnen für die vielen interessanten Diskussionen während meiner gesamten Studienzeit und für die Geduld bis zur Abgabe dieser Arbeit.

Für die Übernahme des Koreferates bedanke ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Sabine Zachgo. Außerdem danke ich für die Möglichkeit, dass ich die ISH Untersuchungen unter fachkundiger Anleitung in ihrer Arbeitsgruppe durchführen konnte.

Dr. Ingo Voß danke ich für die gemeinsame Zeit im sowie außerhalb des Labors, für die vielseitige Unterstützung in den vergangenen Jahren und die kritische Durchsicht der Arbeit. Es ist schön, mit einem so unkomplizierten und freundlichen Menschen zusammenzuarbeiten.

Dr. Simone Holtgreffe möchte ich für die Zusammenarbeit und die Betreuung während der ersten Hälfte meiner Promotionszeit danken.

Dr. Guy Thomas Hanke danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die vielen nützlichen Hinweise und Tricks.

Dr. Carsten Bernd danke ich herzlich für die durchgeführten Untersuchungen zur [2Fe-2S]-Cluster-Einlagerung in AtGRXS17.

Nora Gutsche danke ich für die Unterstützung und Hilfestellung bei den ISH-Untersuchungen sowie für die fachlichen Diskussionen rund um die Grx.

Dr. Stefan Walter danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Einen besonderen Dank für eine schöne gemeinsame Zeit in der Arbeitsgruppe verdienen Dr. Inga Hebbelmann, Dr. Joanna Wojtera, Dr. Vera Linke und Hans-Martin Leffers.

Mein Dank gilt natürlich auch allen Mitarbeitern und Kollegen der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie, die mich in dieser Zeit begleitet haben. Für die tatkräftige Unterstützung bedanke ich mich bei unserer Technischen Assistentin Silke Walter, unserer Sekretärin Heike Schwiderski, den Gärtnerinnen Heike Wolf-Wibbelmann, Kirsten Jäger und Sabine Steinbach.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich und meine kleine (mittlerweile große) Familie in allen Lebenslagen unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Silke und unseren Kindern Mia, Finn und Mattis für die Geduld und das Verständnis. In all der Zeit ward ihr meine Stütze und Motivation gleichermaßen.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

