

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Botanik

Funktionelle Charakterisierung der pflanzlichen Zink RING-Finger
Peroxine PEX10, PEX2 und PEX12 in *Arabidopsis thaliana*

Jakob Prestele

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:		Univ.-Prof. Dr. E. Grill
Prüfer der Dissertation:	1.	apl. Prof. Dr. Chr. Gietl
	2.	Univ.-Prof. Dr. R. Hückelhoven
	3.	Univ.-Prof. Dr. C. Schwechheimer

Die Dissertation wurde am 26.08.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20.10.2009 angenommen.

Meiner Tochter Anna-Maria

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VI
Zusammenfassung	VIII
Summary	IX
1. Einleitung	1
1.1. Das Peroxisom	1
1.2. Peroxisomen-Biogenese	3
1.3. Glyoxysomen.....	9
1.4. Blatt-Peroxisomen und Photorespiration	11
1.5. Peroxisomaler Matrixprotein-Import	15
1.5.1. Rezeptor-Cargo Interaktion	17
1.5.2. Kontaktaufnahme des Rezeptor-Cargo-Komplexes mit der Peroxisomenmembran	18
1.5.3. Translokation des Rezeptor-Cargo-Komplexes und Freisetzung der Fracht	19
1.5.4. Recycling des Rezeptors ins Cytosol	22
1.6. Zielsetzung der Arbeit	26
2. Ergebnisse	28
2.1. Die Überexpression des PEX10 mit dysfunktionalem Zink RING-Finger führt zu peroxisomaler Formstörung und zu Kontaktverlust zwischen Peroxisom und Chloroplast bei kaum beeinträchtigtem Import von Matrixproteinen	28
2.1.1. PEX10- Δ Zn-Pflanzen zeigen eine Kontaktstörung zwischen Peroxisomen und Chloroplasten	29
2.1.2. Eine Metabolom-Analyse spiegelt den gestörten Organellenkontakt in PEX10- Δ Zn-Pflanzen wider	32
2.1.3. Der Matrixprotein-Import ist in PEX10- Δ Zn-Pflanzen nicht beziehungsweise kaum beeinträchtigt	36
2.1.3.1. Die Erzeugung der PEX10- Δ Zn-T7-Linien und der Kreuzung zwischen PEX10- Δ Zn1 und At-GFP-PTS-Pflanzen	37
2.1.3.2. Die PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Pflanzen zeigen Wachstumsstörung jedoch keine Chlorose; die Kreuzung aus PEX10- Δ Zn1 und At-GFP- PTS1 bestätigt den bereits bekannten photorespiratorischen Phänotyp.....	39
2.1.3.3. Die Photosyntheseleistung ist in PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Pflanzen kaum reduziert.....	41

2.1.3.4.	PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1 zeigt keine generelle Importstörung, PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Pflanzen zeigen eine leichte Importstörung bei gestörter Peroxisomenform	42
2.1.3.5.	Die Importstörung peroxisomaler Matrixenzyme in PEX10- Δ Zn-Pflanzen lässt sich an Hand ausgewählter Markerenzyme ausschließen	45
2.1.4.	Die Funktion der Glyoxysomen ist in den Pflanzen PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 nicht beeinträchtigt	47
2.1.5.	Die Speicherung von Reservestoffen ist in Samen der Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 beeinträchtigt.....	49
2.1.6.	Die Integrationsstelle der T-DNA in den Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 ist nicht für den photorespiratorischen Phänotyp verantwortlich.....	51
2.1.6.1.	Die T-DNA Integration in den Pflanzen PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 betrifft kein für die Photorespiration essentielles Gen	51
2.1.6.2.	Bestätigung der T-DNA-Integration mittels PCR	52
2.1.6.3.	Die T-DNA-Integration in den Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 stört die Transkription der betroffenen Gene nicht vollständig	53
2.1.6.4.	Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Deletion der Gene, die T-DNA-Integrationen in den Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 tragen und einem photorespiratorischen Phänotyp.....	54
2.1.6.5.	Der Phänotyp von Kreuzungen der Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 untereinander weicht von der Parentalgeneration ab	56
2.1.7.	Oxidativer Streß ist nicht der Auslöser des gestörten Organellenkontaktes zwischen Peroxisom und Chloroplast in PEX10- Δ Zn1	58
2.1.7.1.	Eine Metabolom-Analyse unter Hoch-CO ₂ zeigt die gleichen Metaboliten-Unterschiede zwischen PEX10- Δ Zn1- und Wildtyp-Pflanzen wie unter Normalatmosphäre	58
2.1.7.2.	Metabolitenstau innerhalb des Glycolat-Zyklus kann Form und Kontakt von Peroxisomen mit Chloroplasten verändern.....	62
2.2.	PEX10-TILLING-Linien weisen auf zwei weitere für die Peroxisomen Biogenese essentielle Motive.....	67
2.2.1.	Mutationen in konservierten Aminosäuren der N-terminalen Hälfte des PEX10 resultieren in kleinwüchsigem Phänotyp	70
2.2.2.	Das Fehlen des Zink RING-Fingers in PEX10 resultiert in Embryoletalität....	72
2.2.3.	Die Photosyntheseleistung ist in keiner PEX10-TILLING-Linie auf Werte der PEX10- Δ Zn1-Pflanze erniedrigt	75

2.2.4.	Das Fehlen des Zink RING-Fingers stört den Organellenkontakt mit Chloroplasten, und das N-terminale Motiv TLGEEY spielt eine Rolle in der Formgebung von Peroxisomen.....	76
2.2.5.	Mutationen im N-Terminus von PEX10 wirken sich ebenfalls auf Metabolomebene aus.....	80
2.3.	Die Überexpression des PEX2 mit punktmutiertem Zink RING-Finger führt zu Matrixprotein-Importstörung bei normal geformten Peroxisomen	85
2.3.1.	PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen zeigen keinen photorespiratorisch auffälligen Phänotyp	86
2.3.2.	Der Matrixprotein-Import ist in PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen deutlich gestört, die Peroxisomenform ist normal.....	88
2.3.2.1.	Die Peroxisomenform ist in PEX2- Δ Zn-Pflanzen normal.....	90
2.3.2.2.	In PEX2- Δ Zn-T7 ist der Organellenkontakt zwischen Peroxisom und Chloroplast nicht gestört.....	91
2.3.2.3.	Bestätigung der generellen Matrixprotein-Importstörung von PTS1-Proteinen in PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen mittels ausgewählter Markerenzyme.....	93
2.3.3.	Eine Metabolom-Analyse zeigt, dass der Glycolat-Zyklus in PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen trotz gestörten Matrixprotein-Imports nicht beeinträchtigt ist	94
2.3.4.	Die Photosyntheseleistung ist in PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen nicht reduziert	97
2.4.	Die Klonierung des PEX12- Δ Zn-Konstruktes	98
2.4.1.	Erstellung der <i>PEX12-ΔZn</i> Version mittels <i>Splicing by Overlap Extension-PCR (SOE-PCR)</i>	99
2.4.2.	Subklonierung von <i>PEX12-Wt/ΔZn</i> in pET28a(+)	100
2.4.3.	Ligation der <i>PEX12</i> -Konstrukte in pCAMBIA1301	101
2.5.	Versuch eines <i>Suppressorscreens</i> zur Umgehung des photorespiratorischen Phänotyps in PEX10- Δ Zn-Pflanzen.....	101
2.6.	Die Klonierung eines cDNA-Fragments der Wassermelonen DEG15-Protease.....	103
2.6.1.	Design degenerierter Primer zur Klonierung der Wassermelonen-DEG15..	104
2.6.2.	PCR-Strategie der Klonierung und Sequenzierung eines Fragments der <i>C. vulgaris-DEG15</i> -cDNA.....	107
3.	Diskussion	110
3.1.	Die Funktion der Zink RING-Finger Peroxine PEX10, PEX2 und PEX12 in Photorespiration, Matrixprotein-Import sowie Organellenkontakt zwischen Peroxisom und Chloroplast	110

3.2. Versuch einer Identifizierung von <i>second-site</i> -Mutanten, die den konditional subletalen Phänotyp der PEX10- Δ Zn1-Mutante kompensieren	136
3.3. Die Klonierung eines cDNA-Fragments der Wassermelonen-DEG15-Protease.....	139
4. Material und Methoden	141
4.1. Chemikalien.....	141
4.2. Anzucht und <i>Screening</i> von Organismen.....	141
4.2.1. <i>Escherichia coli</i>	141
4.2.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	141
4.2.3. <i>Citrullus vulgaris</i>	143
4.3. Oligonukleotide.....	143
4.4. Molekularbiologische Techniken	147
4.4.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	147
4.4.2. RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)	148
4.4.3. TAIL-PCR (<i>Thermal Asymmetric Interlaced-PCR</i>).....	148
4.4.4. <i>Splicing by Overlap Extension-PCR</i>	149
4.4.5. Agarose Gelelektrophorese	152
4.4.6. DNA-Extraktion aus Agarosegelen	152
4.4.7. Restriktionsverdau von DNA	152
4.4.8. Ligation von DNA-Fragmenten.....	152
4.4.9. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	153
4.4.10. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	153
4.4.11. Plasmid Präparation aus <i>E. coli</i>	154
4.4.12. Herstellung elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i>	155
4.4.13. Transformation elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i>	155
4.4.14. Transformation von <i>A. thaliana</i> mittels <i>floral dip</i>	155
4.4.15. DNA Isolation aus <i>A. thaliana</i> mittels CTAB.....	156
4.4.16. RNA Isolation aus Pflanzen	157
4.4.16.1. Isolation pflanzlicher Gesamt-RNA.....	157
4.4.16.2. RNA-Fällung	157
4.4.16.3. Isolation pflanzlicher mRNA über Oligo-dT-Zellulose.....	157
4.4.16.4. Isolation pflanzlicher mRNA mittels Magnetkugeln	158
4.4.17. Erststrangsynthese einer cDNA	159
4.4.18. Kreuzung von <i>A. thaliana</i>	159
4.5. Proteinchemische Techniken	160
4.5.1. Protein Rohextrakt aus <i>A. thaliana</i>	160
4.5.2. Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	160
4.5.3. <i>Western-Blotting</i>	161

4.5.4. Ponceau S Färbung	162
4.5.5. Immunodetektion.....	162
4.5.6. <i>Bradford</i>	162
4.5.7. Markerenzym-Assays.....	163
4.5.7.1. Hydroxypyruvat-Reduktase	163
4.5.7.2. Serin-Glyoxylat-Aminotransferase.....	164
4.6. Physiologische Experimente	165
4.6.1. Fluorometrie	165
4.6.2. Metabolomic.....	166
4.6.2.1. Pobenauarbeitung	166
4.6.2.2. Chemische Derivatisierung.....	166
4.6.2.3. GC-TOF-Massenspektrometrie	166
4.6.2.4. Metabolitprofil mittels Hauptkomponenten- und Varianzanalyse.....	167
4.6.3. IBA Wurzelwachstums-Assay	168
4.6.4. Glyoxylat-Bestimmung in Blattextrakten.....	168
4.6.5. Rohorganellen-Pellet aus <i>A. thaliana</i> mittels differentieller Zentrifugation ...	168
4.7. Mikroskopische Techniken	169
4.7.1. Licht-Mikroskopie	169
4.7.2. Confocale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM).....	169
4.7.3. Elektronen-Mikroskopie.....	170
4.8. Klonierungsstrategien.....	170
4.8.1. <i>PEX10-T7</i>	170
4.8.2. <i>PEX2-T7</i>	172
4.8.3. <i>PEX12-T7</i>	174
5. Anhang.....	177
5.1. DNA-Konstrukte und Glycerin-Stammkulturen.....	177
6. Literaturverzeichnis	178

Abkürzungen

Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
Carb	Carbenicillin
CLSM	Confocale Laserscanning-Mikroskopie
DAB	Diaminobenzidin
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ΔZn	Delta Zink (mutierte Version des Zink RING-Finger-Motivs)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EMS	Ethylmethansulfonat
FG	Frischgewicht
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Gly	Glycin
gMDH	glyoxysomale Malatdehydrogenase
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid]
HPR	Hydroxypyruvat-Reduktase
Hygr	Hygromycin
ICL	Isocitrat-Lyase
Kan	Kanamycin
kD	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LB	engl. <i>lysogeny broth</i> , "Lysogene Brühe"
LD	Loading Dye
MeOH	Methanol
min	Minute(n)

mMDH	mitochondriale Malatdehydrogenase
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
N _{2liq.}	Flüssiger Stickstoff (-196°C)
OD	optische Dichte
o/n	über Nacht
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAM	<i>Pulse Amplitude Modulator</i>
PBD	<i>peroxisome biogenesis disorder</i>
PEXN	Peroxin N – Protein (in Säugern und Pflanzen)
PexNp	Peroxin N – Protein (in Hefen)
<i>PEXN</i>	Peroxin N - Gen
ppm	parts per million
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
PTS1	<i>Peroxisomal Targeting Signal 1</i>
PTS2	<i>Peroxisomal Targeting Signal 2</i>
Rif	Rifampicin
RING	Really Interesting New Gene
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur (~ 20-25 °C)
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SGAT	Serin-Glyoxylat-Aminotransferase
TBS	Tris buffered Salin
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
unv.	unverdaut
verd.	verdaut
Wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Peroxisomen sind in allen eukaryontischen Zellen für zahlreiche Stoffwechselreaktionen essentiell wie die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies und die β -Oxidation von Fettsäuren. Funktionsstörungen der Peroxisomen führen zum Beispiel zu schwerwiegenden neurodegenerativen Krankheiten in Säugern und zur Beeinträchtigung von Speicherfett-Mobilisierung und Photorespiration in Pflanzen. In der vorliegenden Arbeit wurden die drei peroxisomalen integralen Membranproteine PEX10, PEX2 und PEX12 untersucht. Ihre Aminosäuresequenz hat nur geringe Ähnlichkeit, sie besitzen jedoch jeweils ein C3HC4-Zink-RING-Finger Motiv im C-Terminus. Dieser RING-Finger-Domäne wird eine Funktion in Protein-Protein-Interaktionen sowie Protein-Ubiquitinierungen zugewiesen. Homozygote *knockout* (K.O.)-Mutanten dieser Peroxine sind embryonal. Zur Funktionsanalyse von PEX10, PEX2 und PEX12 wurden sogenannte Δ Zn-Linien durch Überexpression von im Zink RING-Finger-Motiv punktmutierten Versionen dieser Peroxine im Wildtyp-Hintergrund erzeugt. Es konnten unterschiedliche Funktionen der beiden Peroxine PEX10 und PEX2 nachgewiesen werden: Der Zink RING-Finger von PEX10 ist allenfalls indirekt am Import peroxisomaler Matrixproteine beteiligt, ist hingegen für die Form der Peroxisomen und ihren Kontakt mit Chloroplasten essentiell. Die Formstörung der Peroxisomen wird nicht allein durch den dysfunktionalen Zink RING-Finger ausgelöst, sondern auch durch eine Punktmutation in dem konservierten, N-terminalen Motiv TLGEEY (G93E); letztere hat jedoch keine Auswirkung auf den Organellenkontakt. Modifikationen des N-Terminus von PEX10, wie das Anhängen eines T7-tags, führen zu leichter Matrixprotein-Importstörung. Der Organellenkontakt könnte zum einen direkt oder indirekt durch Interaktion des PEX10 mit Proteinpartnern in der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran vermittelt werden oder zum anderen durch die Interaktion von PEX10 mit dem peroxisomalen Teilungsapparat. PEX2 mit seinem Zink RING-Finger ist am Matrixprotein-Import beteiligt. PEX2- Δ Zn-Mutanten zeigen normale Peroxisomenform und ungestörten Organellenkontakt mit Chloroplasten. Es ist möglich, daß PEX2 an der Ubiquitinierung des cytosolischen Rezeptors PEX5 beteiligt ist. Die Klonierung des PEX12 mit dysfunktionalem Zink RING-Finger und seine Transformation in den *Arabidopsis* Wildtyp-Hintergrund wird die Analyse der Funktion dieses Peroxins in Photorespiration, Matrixprotein-Import und Organellenkontakt ermöglichen. Ein *Suppressor-Screen* EMS-mutagenisierter PEX10- Δ Zn1-Samen brachte aufgrund Silencing des 35S-Promotors Wildtyp-Pflanzen hervor.

In einem unabhängigen Projekt wurde über einen revers genetischen Ansatz mit degenerierten Primern ein Fragment der glyoxysomalen Processing Protease DEG15 aus *Citrullus vulgaris* kloniert.

Summary

Peroxisomes perform numerous indispensable metabolic pathways in eucaryotic cells, like detoxification of reactive oxygen species and β -oxidation of fatty acids. Defects in peroxisome function lead to severe neurodegenerative diseases in mammals and impairment of storage-oil mobilization and photorespiration in plants. The present research targets the three peroxisomal integral membrane proteins PEX10, PEX2 and PEX12. They differ in their amino acid sequence but share a C₃H₄ zinc RING-finger motif in the C-terminal region. This RING-finger domain is responsible for protein-protein interactions as well as for protein ubiquitinations. Homozygous knockout [or K.O.]-mutants of these peroxins lead to embryo lethality. For their functional analysis Δ Zn-versions with point mutations in the zinc RING-finger were created and over expressed in the wild type background. The peroxins PEX10 and PEX2 carry out different functions: The zinc RING-finger of PEX10 is either not at all or only indirectly involved in the import of peroxisomal matrix proteins. Instead PEX10 controls peroxisomal shape and the contact between peroxisomes and chloroplasts. The shape perturbation observed in PEX10- Δ Zn-mutants is also elicited by mutating the N-terminal motif TLGEEY to TLEEEY but without affecting the organelle contact. Modifications of the N-terminus of PEX10, like the attachment of a T7-tag, lead to a slight interruption of matrix protein import. The organelle contact could either be mediated directly or indirectly by an interaction of PEX10 with protein partners in the outer chloroplast envelope or via interaction with the division machinery of peroxisomes.

PEX2 with its zinc RING-finger controls matrix protein import. PEX2- Δ Zn-mutants have normal peroxisomal shape and organelle contact. It is suggested that the zinc RING-finger of PEX2 is involved in ubiquitination of the cytosolic receptor PEX5.

The cloning of PEX12 with a dysfunctional zinc RING-finger and its transformation into the Arabidopsis wild type background will enable the functional analysis of this peroxin in photorespiration, matrix protein import and organelle contact.

A suppressor screen using EMS mutagenized PEX10- Δ Zn1 seeds revealed wild type plants due to silencing of the 35S-promoter.

In an independent project a cDNA fragment of the glyoxysomal processing protease DEG15 of *Citrullus vulgaris* was cloned by a reverse genetic approach using degenerate primers.

1. Einleitung

1.1. Das Peroxisom

Peroxisomen wurden Anfang der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts als letztes Zellorganell entdeckt und Anfang der 60er Jahre in Säugergewebe erstmals biochemisch charakterisiert (De Duve and Baudhuin, 1966). 1966 folgten die ersten Untersuchungen an verschiedenen Pflanzenarten und man stellte fest, dass die Anfangs noch als Cytosomen bezeichneten Strukturen große Ähnlichkeit mit den Microbodies aus Säugern hatten (Mollenhauer and Morre, 1966). In den Jahren 1968 und 69 folgten die Untersuchungen zur Feinstruktur pflanzlicher Microbodies und die cytochemische Lokalisation der Katalase in Blatt-Microbodies, jetzt erstmals als Blatt-Peroxisomen bezeichnet (Frederick and Newcomb, 1969). Die Entdeckung der Katalase-Tätigkeit, zelltoxisches H_2O_2 zu entgiften, das bei der Respiration entstanden ist, brachte De Duve 1974 u.a. den Nobelpreis ein.

Peroxisomen sind von einer Einheitsmembran umgebene 0,5-1 μm große runde bis ovale Organellen aller Eukaryonten, besitzen kein eigenes Genom und sind somit auf den posttranslationalen Import an freien cytosolischen Ribosomen synthetisierter Matrixproteine angewiesen (Lazarow and Fujiki, 1985). Die Enzymausstattung von Peroxisomen kann je nach Organismus, Gewebetyp oder Umweltbedingung variieren und spiegelt die hohe metabolische Plastizität dieser Multifunktionsorganellen wider, wie es in der Hefe *Hansenula polymorpha* als Anpassung an unterschiedliche Kohlenstoffquellen im Wachstumsmedium gezeigt wurde (Veenhuis, 1992).

Allen Peroxisomentypen gemeinsam sind H_2O_2 produzierende Oxidasen wie z.B. die in der Photorespiration aktive Glycolat-Oxidase oder die verschiedenen Acyl-CoA-Oxidasen der β -Oxidation von Fettsäuren, deren Nebenprodukt durch die Katalase inaktiviert werden muß (Frederick and Newcomb, 1969), um irreversible peroxidative Schäden an Membranlipiden und Proteinen zu vermeiden, die Gewebenekrosen zur Folge hätten (Halliwell, 2006). Katalase ist ausschließlich in Peroxisomen lokalisiert (Apel and Hirt, 2004) und stellt neben den nichtenzymatischen Mechanismen zur Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) wie z.B. Ascorbat, Glutathion, Vitamin E, Flavonoide, Carotinoide und Alkaloide den wichtigsten enzymatischen Mechanismus dar (Noctor and Foyer, 1998; Asada, 1999). Peroxisomen verbrauchen einerseits für ihre oxidativen Reaktionen ca. 20% des in der Zelle umgesetzten Sauerstoffs, sind auf der anderen Seite für die Produktion von 35% des gesamten H_2O_2 verantwortlich (Bonekamp, Völkl et al., 2009). Eine exakte Regulation dieses Gleichgewichts ist folglich unabdingbar,

da Wasserstoffperoxid membranpermeabel ist und in niedrigen Konzentrationen auch als Signalmolekül in Zellproliferation, Kohlenhydratstoffwechsel und Programmierem Zelltod wirkt (Wagner, Przybyla et al., 2004; Rhee, Kang et al., 2005). In letzterem Fall konnte gezeigt werden, dass ROS weniger die Ursache oxidativer Schäden wie im Falle von Nekrosen sind, sondern vielmehr der Auslöser eines genetischen Programms, das unter Einbezug des EXECUTER-1-Proteins in *Arabidopsis thaliana* zum kontrollierten Zelltod in führt (Wagner, Przybyla et al., 2004). Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies in pflanzlicher Pathogenabwehr ist in jüngerer Zeit Gegenstand der Forschung geworden, als das Zusammenspiel von ROS und MAPK-Kaskaden (*Mitogen Activated Protein Kinases*) analog zu Säugern entdeckt wurde (Yuasa, Ichimura et al., 2001). Die Rolle des aus Peroxisomen stammenden H_2O_2 in Apoptose und Pathogenabwehr, und die Rolle der Peroxisomen in letzterer generell, werden intensiv beforscht. So akkumulieren GFP-markierte Peroxisomen um die Eintrittsstellen des Pathogens *Erysiphe cichoracearum*. Das *Arabidopsis* Protein PEN2, das den Eintritt von Haustorien zweier Mehltau auslösender Ascomyceten verhindert, ist eine in Peroxisomen lokalisierte Glycosyl-Hydrolase (Koh, André et al., 2005; Lipka, Dittgen et al., 2005). In einer Proteom-Analyse grüner Blätter von *A. thaliana* konnten ebenfalls zwei in die Superfamilie der Glycosyl-Hydrolasen gehörige Myrosinasen, TGG1 und TGG2, als Peroxisomen lokalisiert identifiziert werden (Reumann, Babujee et al., 2007). Diese Enzyme katalysieren die Freisetzung von Isothiocyanaten aus Glucosinolaten mit breitem Wirkspektrum in der Abwehr von Herbivoren und anderen Pathogenen (Kliebenstein, Kroymann et al., 2005; Grubb and Abel, 2006; Halkier and Gershenzon, 2006).

Die funktionelle Spezialisierung von Peroxisomen bestimmter Organismen führte zu Bezeichnungen, die dieser Spezialisierung Rechnung trugen, sofern sie von den oben dargestellten peroxisomalen Funktionen deutlich abwich. In Trypanosomen des Malariaerregers ist in Peroxisomen keine Katalase nachweisbar, die Peroxisomen sind Hauptort der Glycolyse und werden folglich als Glycosomen bezeichnet (van den Bosch, Schutgens et al., 1992; Michels, Bringaud et al., 2006). Die Biolumineszenz einiger Lampyridae ist auf die Reaktion der Luciferase in Peroxisomen dieser Käfer zurückzuführen, die aufgrund eines sonst „normalen“ peroxisomalen Metabolismus allerdings nicht zu einer eigenen Bezeichnung geführt hat (Shimomura and Johnson, 1975). Die *Woronin-bodies* einiger Ascomycetenarten stellen spezialisierte Peroxisomen dar, die für den Verschluss von Septalporen verantwortlich sind, die bei Ascomyceten Cytoplasmabrücken zwischen benachbarten Zellen ermöglichen und ein rasches Wachstum des Pilzes erlauben. Bei eintretender Lyse der Pilzhyphen als Folge pflanzlicher Pathogenabwehr müssen diese Septalporen mit Hilfe der *Woronin-bodies*

rasch verschlossen werden, um den Tod des Pilzes zu vermeiden (Soundararajan, Jedd et al., 2004).

Abbildung 1 stellt die wichtigsten peroxisomalen Funktionen in Säugern, Hefen und Pflanzen tabellarisch gegenüber.

Säuger	Hefe	Pflanze
β-Oxidation langkettiger Fettsäuren	β-Oxidation von Fettsäuren	β-Oxidation von Fettsäuren
H ₂ O ₂ -Detoxifikation	H ₂ O ₂ -Detoxifikation	H ₂ O ₂ -Detoxifikation
Cholesterin-Biosynthese	Lysin-Biosynthese	Glyoxylat-Zyklus
Gallensäuren-Synthese	Methanol-Oxidation	Photorespiration
ROS-Metabolismus	ROS-Metabolismus	ROS-Metabolismus
Etherlipid-Synthese	Metabolismus alkylierter Amine	Ureid-Metabolismus
Plasmalogen-Synthese	Alkan-Metabolismus	Produktion von Jasmonsäure
		Umwandlung von Indol-3-Buttersäure in Indol-3-Essigsäure
		Abbau von Leucin, Isoleucin und Valin

Abbildung 1: Beispiele peroxisomaler Funktion. Verändert nach (Brown and Baker, 2008).

Die pflanzlichen Glyoxysomen stellen ebenfalls spezialisierte Peroxisomen dar und werden separat in Kapitel 1.3 eingehend beschrieben.

1.2. Peroxisomen-Biogenese

Mitte der 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde an Cucurbitaceae die Umwandlung von Glyoxysomen in Blatt-Peroxisomen beschrieben. Dabei akkumulieren die Enzyme der β-Oxidation und des Glyoxylat-Zyklus bis Tag 4 nach der Keimung und werden anschließend lichtinduziert durch die Enzyme des Glycolat-Zyklus ergänzt (Titus and Becker, 1985; Nishimura, Yamaguchi et al., 1986; Sautter, 1986), der essentiell für die Vermeidung photooxidativer Schäden am Photosystem II ist (Ogren, 1984). Die Umkehrung dieses Prozesses tritt während der Seneszenz grüner Blätter ein, um die energiereichen Membranlipide dem pflanzlichen Stoffwechsel wieder zur Verfügung zu

stellen. In diesem Stadium sind sowohl Glycolat- als auch Glyoxylatzyklus-Enzyme wie Isocitratlyase und Malatsynthase aktiv und parallel immunocytochemisch nachweisbar (De Bellis and Nishimura, 1991; de Bellis, Tsugeki et al., 1991). Es konkurrierten zwei Modelle zur pflanzlichen Peroxisomenbiogenese. Das „*two-population-model*“ beschreibt eine Neu-Synthese einer Peroxisomen-Population, deren Enzymgehalt an die veränderten physiologischen Bedingungen angepasst war, während die ursprüngliche Population degeneriert. Der parallele Nachweis von Schlüsselenzymen des Glyoxylat-Zyklus und des Glycolat-Zyklus lieferte jedoch Beweise für das „*one-population-model*“. Dieses Modell pflanzlicher Peroxisomen-Biogenese geht von einem Austausch des Enzymgehalts innerhalb der bereits bestehenden Peroxisomen-Population aus und veranschaulicht die Reversibilität und Plastizität peroxisomaler Funktion v.a. in Pflanzen (Nishimura, Takeuchi et al., 1993; Olsen, 1998; Hayashi, Toriyama et al., 2000).

Abbildung 2 veranschaulicht den relativen Anteil, den die einzelnen Stoffwechselwege an der Peroxisomenfunktion in Pflanzen besitzen. So ist der Hauptteil peroxisomaler Proteine von 28% an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt, 7% am ROS-Metabolismus, 4% (10 Proteine) am Glycolat-Zyklus und 1% am Glyoxylat-Zyklus (Reumann, Ma et al., 2004).

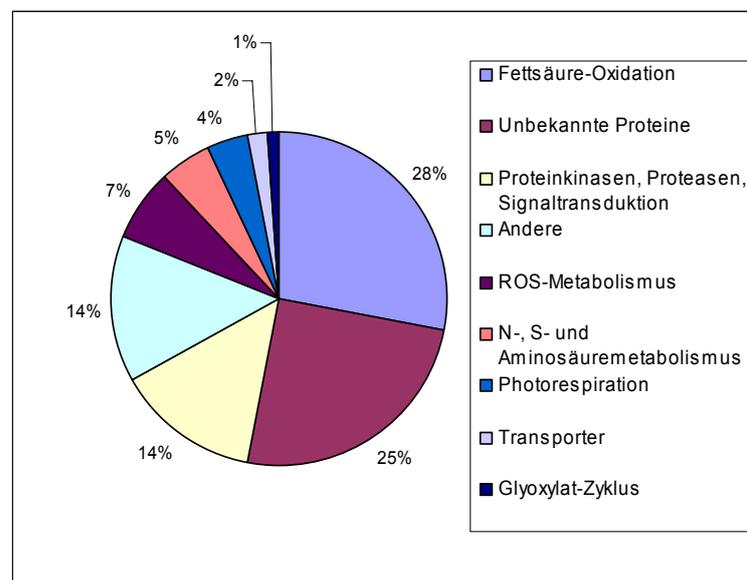


Abbildung 2: Relativer Anteil einzelner Kategorien peroxisomaler Funktion. Daten aus AraPerox gewonnen (Reumann, Ma et al., 2004). Es sind ausschließlich am Stoffwechsel beteiligte Enzyme einbezogen worden, Peroxisomenbiogenese-Proteine sind nicht enthalten. Anordnung im Uhrzeigersinn nach abnehmender Fläche.

Glyoxysomen unterscheiden sich von Peroxisomen durch die Anwesenheit der beiden Enzyme Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase und die Abwesenheit der Enzyme der Photorespiration.

Der Anteil des Endoplasmatischen Reticulums an der Biogenese von Peroxisomen ist nach wie vor Gegenstand der Forschung. Es konkurrieren zwei weitere Modelle miteinander. Das „*growth-and-division-model*“ (Lazarow and Fujiki, 1985) geht von Wachstum und Teilung bereits existierender Peroxisomen aus und hat Mitte der 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts zum Nachweis posttranslationalen *Targetings* und der Insertion peroxisomaler Membranproteine geführt (Imanaka, Small et al., 1987; Pause, Diestelkötter et al., 1997). Die Vermehrung von Peroxisomen durch Teilung über das Dynamin-artige Protein Vps1p konnte in zeitaufgelöster Confocaler Laserscanning Mikroskopie gezeigt werden (Hoepfner, Berg et al., 2001).

Das bereits 1979 aufgestellte „*ER-vesiculation-model*“ (Beevers, 1979), geht von einer Abknospung reifer Peroxisomen von speziellen Bereichen des rauen Endoplasmatischen Reticulums aus (Übersichtsartikel (Trelease, 1984)). Es wird nach neueren Erkenntnissen über den Import peroxisomaler Membranproteine mit dem *growth-and-division-model* zum „*two-way-model*“ kombiniert (Eckert and Erdmann, 2003). Zellen von *Hansenula polymorpha* bzw. von Baumwollsamensamen, deren anterograde Vesikeltransport vom Endoplasmatischen Reticulum durch die Behandlung mit Brefeldin A blockiert wurde, akkumulieren peroxisomale Membran- sowie Matrixproteine im ER. Nach Entfernung des Brefeldins konnten sie wieder in Peroxisomen gefunden werden, was in *pulse-chase* Experimenten gezeigt wurde (Salomons, van der Klei et al., 1997; Mullen, Lisenbee et al., 1999). Diese Befunde sprechen für die Beteiligung des Endoplasmatischen Reticulums an der Peroxisomen-Biogenese.

Proteine, die an der Biogenese von Peroxisomen beteiligt sind, werden als Peroxine (PEX-Proteine) bezeichnet (Distel, 1996). Im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte wurden 33 Peroxine in unterschiedlichen Hefen beschrieben, von denen nur 16 in Säugern identifiziert wurden (Eckert and Erdmann, 2003; Kiel, Veenhuis et al., 2006). Mindestens 21 Hefe-Peroxine haben Homologe in höheren Pflanzen (Mullen, Flynn et al., 2001; Baker and Sparkes, 2005; Nito, Kamigaki et al., 2007). Nach allgemeiner Nomenklatur werden Peroxingene mit *PEXN* abgekürzt. Bei der Bezeichnung der Proteine finden zwei unterschiedliche Bezeichnungen Anwendung. In Hefen werden sie mit PexNp und in Säugern und Pflanzen mit PEXN abgekürzt (Brown and Baker, 2008).

Peroxine können in zwei Klassen eingeteilt werden, je nachdem welchen Phänotyp die jeweilige Knock-out Mutante zeigt. Klasse 1 umfasst zahlenmäßig die meisten Peroxine, ist am Matrixprotein-Import in Peroxisomen beteiligt und soll im Kapitel „Matrixprotein-Import“ näher beschrieben werden. Klasse 2 umfasst Pex3p, Pex11p, Pex16p und

Pex19p und ist an der Peroxisomenmembran-Biogenese, dem Import peroxisomaler Membranproteine und der Organellenproliferation beteiligt. Ein Knock-out von Pex19p, Pex16p und Pex3p hat das gänzliche Fehlen peroxisomaler Membranen in unterschiedlichen Organismen zur Folge (Matsuzono, Kinoshita et al., 1999; Ghaedi, Honsho et al., 2000; Ghaedi, Tamura et al., 2000; Sacksteder, Jones et al., 2000; Honsho, Hiroshige et al., 2002). Diese Peroxine sind für das korrekte posttranslationale *Targeting* der Klasse-1-Peroxine in die Peroxisomenmembran verantwortlich. Pex19p bindet diese im Cytoplasma, und Pex3p ist für deren Insertion in die Membran unerlässlich (Hettema, Girzalsky et al., 2000; Sacksteder, Jones et al., 2000). Aus diesen Beobachtungen wurden die Klasse 2-Peroxine auch als frühe Peroxine bezeichnet, die eventuell bereits in Subkompartimenten des ER oder zumindest in präperoxisomalen Strukturen auftreten. *Yarrowia lipolytica*-Zellen, die Pex16p-defizient sind, lassen sich durch Expression des Sse1-Proteins (PEX16) aus *A. thaliana*, das auch für die Bildung von Lipid- und Proteinbodies benötigt wird, komplementieren (Lin, Sun et al., 1999). In *Saccharomyces cerevisiae* resultiert die Überexpression des integralen Peroxisomen-Membranproteins Pex15p in einer Proliferation des ER (Elgersma, Kwast et al., 1997). Eine Beteiligung des ER an der Entstehung von Peroxisomen ist demnach wahrscheinlich und Peroxisomen sowie Protein- und Lipidbodies, die vom ER abknopsen (Murphy and Vance, 1999), teilen Proteinkomponenten, die für ihre Biogenese essentiell sind. Abbildung 3 soll das oben erwähnte *two-way-model* veranschaulichen, in dem die beiden konkurrierenden Modelle zur Peroxisomen-Biogenese, das *ER-vesiculation-model* und das *growth-and-division-model*, vereint sind.

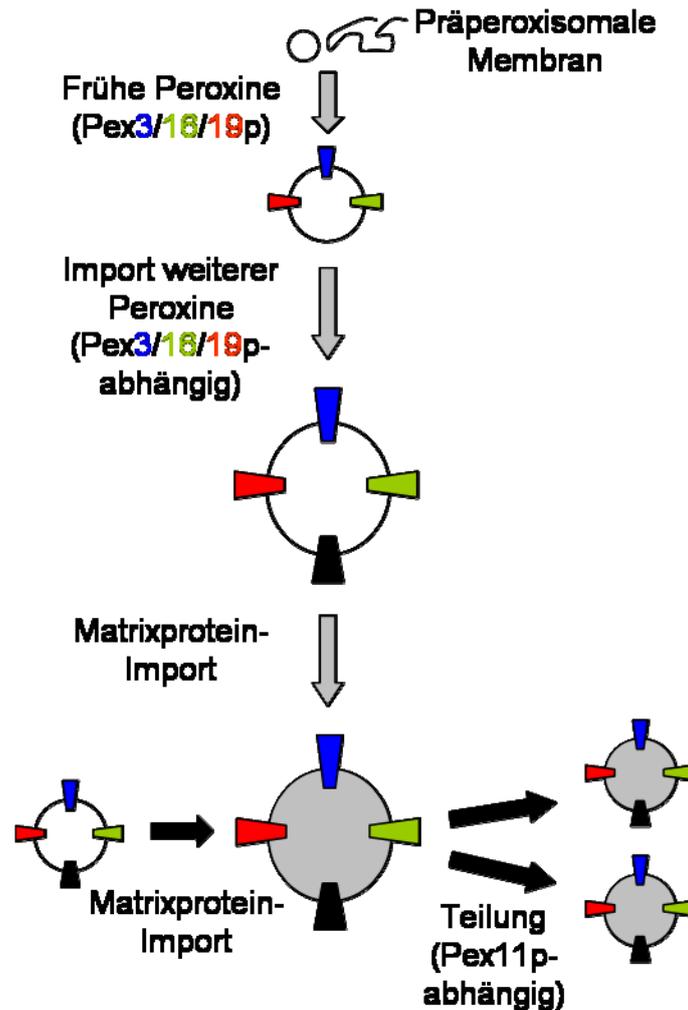


Abbildung 3: Two-way-model der Peroxisomen-Biogenese Das Modell beschreibt zwei mögliche Entstehungsarten von Peroxisomen. Im ersten entsteht ein Präperoxisomales Vesikel aus einer Endomembran, die entweder das ER oder eine peroxisomale Vorläuferstruktur ist. Dieses Vesikel trägt evtl. bereits frühe Peroxine und reift unter Import weiterer Peroxine (z.B. Pex10p, Pex2p und Pex12p) und Matrixproteine zum Peroxisom. Dieses Modell beruht auf dem ER-vesiculation-model von (Beavers, 1979) und ist mit grauen Pfeilen versehen. Das zweite Modell, das auf dem *growth-and-division-model* von (Lazarow and Fujiki, 1985) beruht, beschreibt die Entstehung neuer Peroxisomen durch Teilung reifer Peroxisomen und evtl. Präperoxisomen und ist mit schwarzen Pfeilen dargestellt. Membranproteine sind farbig; mit Matrixproteinen gefüllte Peroxisomen sind grau hinterlegt. Verändert nach (Eckert and Erdmann, 2003).

Die Schwierigkeiten bisher ein einheitliches Modell für alle Organismen aufzustellen, beruhen auf den oft sehr unterschiedlichen Resultaten ein und desselben Experiments in verschiedenen Organismen. Bereits in verschiedenen Hefen variieren die beobachteten *pex*-Phänotypen erheblich (Tabak, Braakman et al., 1999).

Auch existieren über die Lokalisierung des peroxisomalen Membranproteins PEX10, das in dieser Arbeit eine zentrale Rolle spielt, unterschiedliche Befunde. So konnte in Immunogold-Elektronenmikroskopie von isoliertem, rauem ER und in Ultradünnschnitten von *Arabidopsis*-Zellsuspensionskulturen eine Lokalisation von PEX10 in Subdomänen des ER nachgewiesen werden (Flynn, Heinze et al., 2005). Sparkes und Mitarbeiter hingegen wiesen 2005 eine ER-unabhängige Insertion von PEX10 direkt über das Cytosol in Tabakblättern nach. Die Bedeutung des Endoplasmatischen Reticulums in der Entstehung von Peroxisomen wurde durch die Entdeckung morphologischer Defekte an Peroxisomen und Protein- so wie *Lipidbodies* in homozygoten *Arabidopsis*-pex10-KO-Mutanten, deren Embryonen im Herzstadium sterben, unterstützt (Schumann, Wanner et al., 2003).

Ein weiterer Befund, der einen Stofffluß vom ER zu Peroxisomen voraussetzt, ist die Tatsache, daß beide Hauptlipide der peroxisomalen Membran Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin im ER synthetisiert werden (Schneiter, Brugger et al., 1999). Purdue und Mitarbeiter schlagen spezialisierte Vesikel vor, die Phospholipide vom ER zum Peroxisom befördern und dabei Proteine mitnehmen, die im ER synthetisiert wurden und das *Targeting* der Vesikel vermitteln (Purdue and Lazarow, 2001).

Der Begriff des pER (peroxisomales ER), als ein spezialisierter Bereich des Endoplasmatischen Reticulums, wurde nach der Lokalisation peroxisomaler Ascorbat-Peroxidase (APX) aus *Arabidopsis* in eng umgrenzten ER-Bereichen, die frei von den endogenen Reticuloplasminen Calnexin und Calreticulin waren, geprägt (Mullen and Trelease, 2006). Auch PEX16 konnte in *Arabidopsis* sowohl im ER als auch in Peroxisomen nachgewiesen werden, gleichwohl nicht in einem speziellen Kompartiment des ER, sondern über selbiges gleichmäßig verteilt (Karnik and Trelease, 2005). Die pER-Domänen werden auch in Säugern und *Y. lipolytica* beschrieben, hier jedoch als Ursprung neuer Peroxisomen (Titorenko and Rachubinski, 2001). Im Gegensatz dazu stellt das von Mullen und Mitarbeitern 2006 aufgestellte pER-Modell in Pflanzen lediglich eine Plattform dar, von der vom ER abstammende Proteine und Lipide in noch nicht näher definierten Vesikeln abschnüren und mit Präperoxisomen fusionieren. Das Zusammenwirken von ER und Peroxisomen wird in einem neuen Modell zusammengefasst, das als „*ER semi-autonomous peroxisome maturation and replication model*“ bezeichnet wird. Es wird das in Abbildung 3 dargestellte „*two-way-model*“ zur Biogenese von Peroxisomen in den nächsten Jahren erweitern (Mullen and Trelease, 2006).

1.3. Glyoxysomen

Namensgebend für diese Unterklasse pflanzlicher Peroxisomen ist der Glyoxylat-Zyklus, mit dessen Hilfe Speicherlipide aus *Lipidbodies*, nach β -Oxidation der Fettsäuren, im Zuge der Gluconeogenese zu Saccharose umgewandelt werden können, die dem wachsenden, noch heterotrophen Keimling zur Verfügung gestellt wird (Breidenbach, Kahn et al., 1968; Beevers, 1979). Hierfür ist eine Zusammenarbeit der Glyoxysomen mit *Lipidbodies* und Mitochondrien notwendig.

Die Speicherlipide, die im Endoplasmatischen Reticulum in Form von Triglyceriden synthetisiert werden, knospen von spezialisierten Bereichen des ER unter Mitwirkung von Oleosinen ab und werden als so genannte Ölkörper (*oil bodies*) gespeichert (Huang, 1992). Die Lipolyse in Glycerin und freie Fettsäuren erfolgt durch membranständige Lipasen. Die Fettsäuren werden in die Glyoxysomen geschleust und stufenweise innerhalb des β -Oxidations-Zyklus zu Acetyl-CoA-Einheiten zerlegt (Cooper and Beevers, 1969). Mit Hilfe der Enzyme des Glyoxylat-Zyklus Malatsynthase, Malatdehydrogenase, Citratsynthase, Aconitase und Isocitratlyase wird aus zwei Molekülen Acetyl-CoA ein Molekül des C₄-Körpers Succinat metabolisiert (Kornberg and Beevers, 1957; Cooper and Beevers, 1969). Succinat wird in die Mitochondrien transportiert und dort innerhalb des Citrat-Zyklus zu Malat oxidiert, das wieder ausgeschleust und der Gluconeogenese unterzogen wird, um Saccharose aufzubauen, die dem wachsenden Keimling zur Verfügung gestellt wird (Beevers, 1979). Abbildung 4 (Gietl, 1992) veranschaulicht die Teilreaktionen vom Triglycerid bis zur Saccharose.

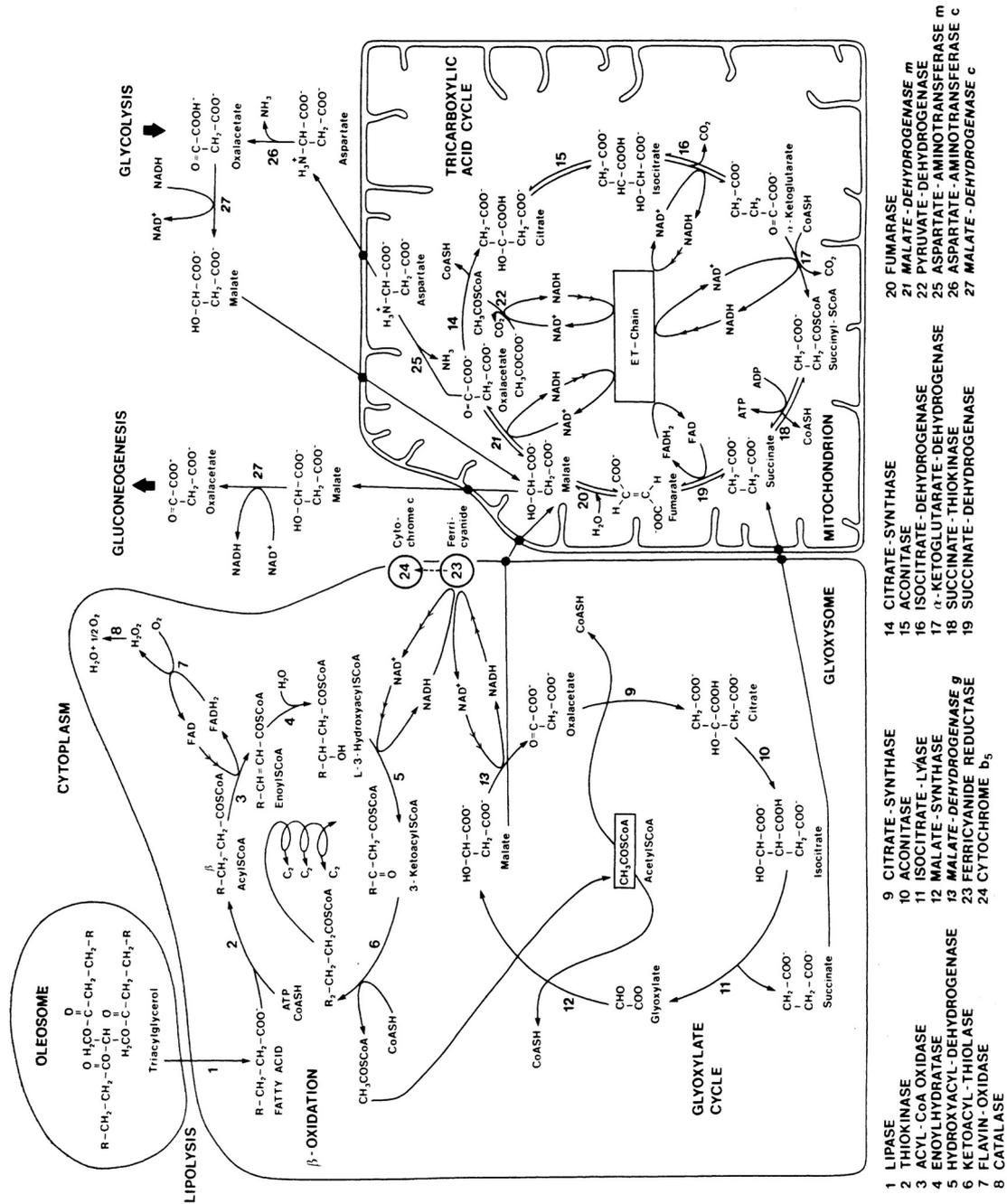


Abbildung 4: Zusammenwirken von Oleosomen, Glyoxysomen, Mitochondrien und Cytoplasma beim Aufbau von Saccharose aus Fettsäuren durch Lipolyse, β-Oxidation, Glyoxylat-Zyklus, Citrat-Zyklus und Gluconeogenese während der Keimung fettspeichernder Samen. Abbildung aus Gietl (1992).

Während in Säugern in Peroxisomen lediglich die β -Oxidation langkettiger Fettsäuren vollzogen wird und das gebildete Acetyl-CoA ausschließlich in den Citrat-Zyklus zur Energiegewinnung fließt, sind Pflanzen mittels des Glyoxylat-Zyklus zur Gluconeogenese aus Acetyl-CoA befähigt. In Abwesenheit des Glyoxylat-Zyklus, wie z.B. in den Isocitrat-Lyase Mutanten *icl1* und *icl2*, sind Pflanzen zwar zur β -Oxidation befähigt, das entstehende Acetyl-CoA wird dann allerdings analog zu Säugern direkt in die Mitochondrien zur Respiration transportiert. Diese Mutanten sind zur Keimung befähigt, so lange externe Saccharose oder ausreichend Licht zur Verfügung stehen. Der Glyoxylat-Zyklus ist demnach eine wichtige anaplerotische Kohlenstoffquelle, um die während der Keimung vieler Pflanzen auftretenden lichtarmen Bedingungen zu kompensieren (Eastmond, Germain et al., 2000).

1.4. Blatt-Peroxisomen und Photorespiration

Die Klasse der Blatt-Peroxisomen stellt den Hauptanteil der Peroxisomen photosynthetisch aktiver Gewebe dar.

Mit steigender Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre während der erdgeschichtlichen Entwicklung erlangten Peroxisomen zunehmende Bedeutung, da die für die CO_2 -Fixierung in photosynthetisierenden Organismen verantwortliche Ribulosebiphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) auch mit Sauerstoff reagiert. Die K_m -Werte für CO_2 und O_2 liegen bei ca. 9 μM bzw. 535 μM , wobei die relative Konzentration in der Luft und die Löslichkeit in Wasser von O_2 600- bzw. 20-fach höher sind als die von CO_2 und damit die niedrigere Affinität der RuBisCO für O_2 beinahe nivellieren (Woodrow and Berry, 1988). Daraus ergibt sich ein Verhältnis der Fixierungsraten beider Moleküle in C_3 -Pflanzen von zwischen 1:0,25 bis 1:0,5 (Sharkey, 1988). Trotz einiger Mechanismen zur Reduktion der Oxygenase-Aktivität, wie die Aktivierung der RuBisCO durch Carbamoylierung, katalysiert durch die RuBisCO-Aktivase (Lorimer, 1983), oder die modulierende Funktion der kleinen regulatorischen Untereinheit der RuBisCO, führt die Sauerstofffixierung in C_3 -Pflanzen neben 3-Phosphoglycerat auch zur Produktion von 2-Phosphoglycolat, das weder in den Calvin-Zyklus eingespeist noch zur Produktion von Zuckern verwendet werden kann und ohne den in Blatt-Peroxisomen lokalisierten Glycolat-Zyklus einen Kohlenstoffverlust darstellen würde (Tolbert, 1997). Mit Hilfe von wenigstens 11 Enzymen, die direkt und 4 Enzymen, die indirekt am Glycolat-Zyklus beteiligt sind, können 75% des in Form zweier Moleküle 2-Phosphoglycolats fixierten CO_2 zurück gewonnen werden und lediglich 1 mol CO_2 wird freigesetzt. Die Reaktionen des auch als Photorespiration bezeichneten Glycolat-Zyklus verteilen sich auf

Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen (Tolbert, Oeser et al., 1968) und sind in Abbildung 5 dargestellt (Gietl, 1992). Die Wichtigkeit der Photorespiration für C₃-Pflanzen wird u.a. durch die mengenmäßige Dominanz der Enzyme Katalase, Glycolat-Oxidase und Glycin-Decarboxylase (*Glycine Cleavage System*) in Peroxisomen und Mitochondrien unterstrichen (Reumann and Weber, 2006).

Durch die Oxygenase-Reaktion der RuBisCO entsteht neben 3-Phosphoglycerat 2-Phosphoglycolat, das im Stroma durch die Glycolat-Phosphatase dephosphoryliert wird. Glycolat gelangt über Translokatoren und Porin-ähnliche Kanäle in die Peroxisomenmatrix, wo es durch die Flavin-abhängige Glycolat-Oxidase zu Glyoxylat oxidiert wird. Bei diesem Schritt werden Elektronen auf Sauerstoff übertragen und H₂O₂ gebildet, das umgehend von der Katalase zu Wasser und Sauerstoff detoxifiziert wird. Glyoxylat wird von zwei Aminotransferasen transaminiert, die Glutamat bzw. Serin als Aminodonoren verwenden. Das resultierende Glycin wird in die Mitochondrien transportiert und mittels Glycin-Decarboxylase zu CO₂, NH₃, NADH sowie einer C₁-Einheit umgesetzt, die auf Tetrahydrofolat übertragen wird. Das resultierende 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat ist Substrat für die Serin-Hydroxymethyl-Transferase, die den C₁-Körper auf ein zweites Molekül Glycin überträgt, so dass Serin entsteht. Serin wird zurück in die Peroxisomen transportiert und durch die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase desaminiert. Das resultierende Hydroxypyruvat wird über die Hydroxypyruvat-Reduktase unter NADH-Verbrauch zu Glycerat reduziert. Die Stroma-lokalisierte Glycerat-Kinase phosphoryliert Glycerat, das als 3-Phosphoglycerat wieder dem Calvin-Zyklus zugeführt wird.

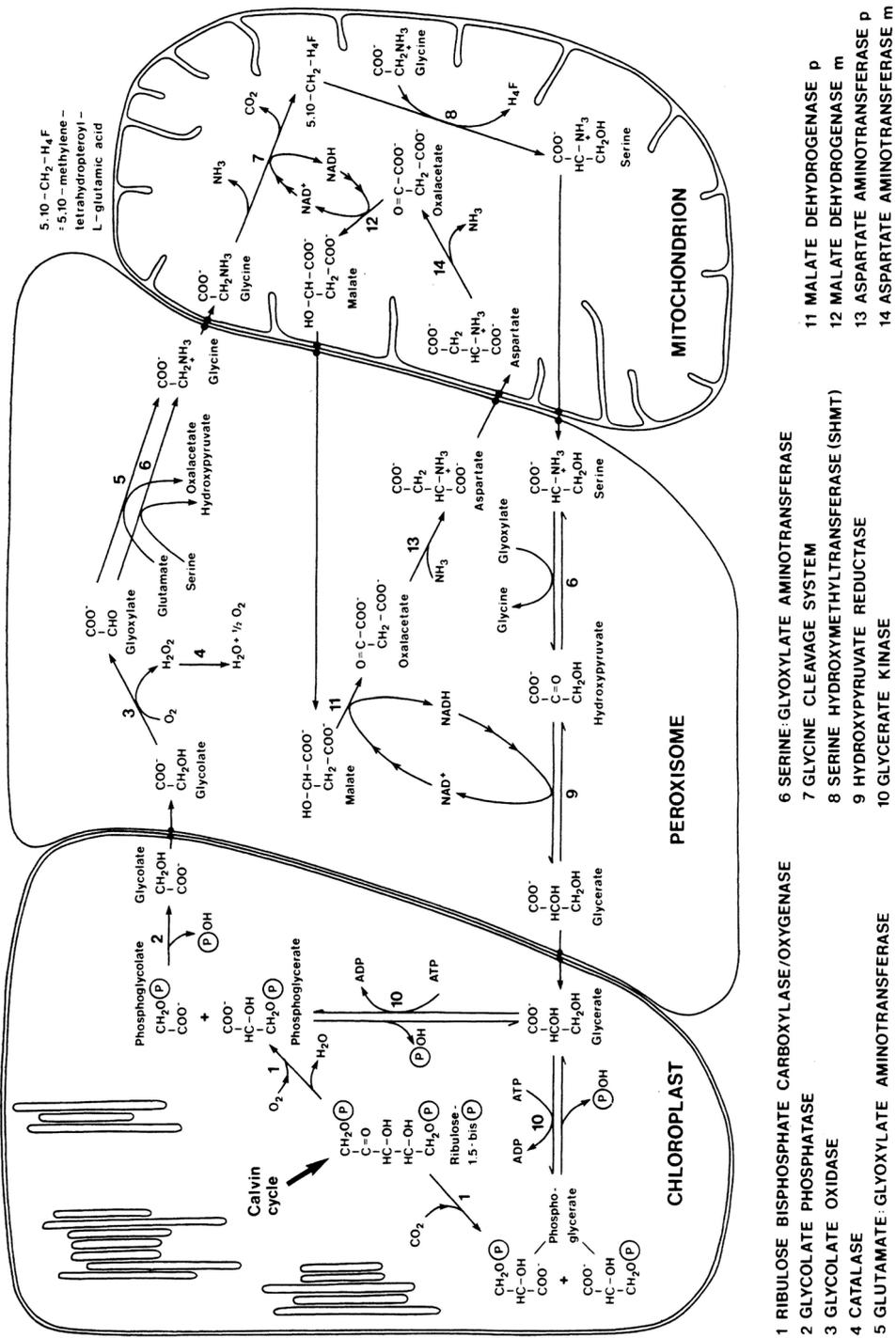


Abbildung 5: Photorespirations-Zyklus. Zusammenspiel von Chloroplasten, Peroxisomen und Mitochondrien, um das durch die Oxygenase-Reaktion der RuBisCO entstandene 2-Phosphoglycolat zu 3-Phosphoglycerat zu metabolisieren und zurück in den Calvin-Zyklus zu schleusen (aus Gietl, 1992).

Die hohe Glycolat-Produktion in der Photorespiration resultiert in hohen Flussraten für die Intermediate Glycolat, Glycerat, Malat, Oxalacetat, α -Ketoglutarat und die Aminosäuren Glycin, Serin und Glutamat und bedarf effizienter Transportmechanismen (Sharkey, 1988). Der Transport von Glycolat aus den Chloroplasten hinaus und Glycerat in die Chloroplasten hinein erfolgt über den Glycolat/Glycerat-Transporter (Howitz and McCarty, 1991; Howitz and McCarty, 1991). Der Transport der 6 anionischen Metaboliten Glycolat, Glycerat, Malat, Oxalacetat, α -Ketoglutarat und Glutamat über die Peroxisomenmembran erfolgt über einen Porin-ähnlichen Kanal mit Substratbindetasche im Inneren, der allerdings für die zwitterionischen Aminosäuren Glycin und Serin nicht durchlässig ist (Reumann, Maier et al., 1995; Reumann, Maier et al., 1998). Größere Moleküle wie NADH oder Coenzym-A können die Peroxisomenmembran nicht passieren (van Roermund, Elgersma et al., 1995; Antonenkov, Sormunen et al., 2004). Die Art des Transports der beiden Aminosäuren Glycin und Serin über die Peroxisomenmembran hinweg ist unklar; bei niedrigen Konzentrationen werden sie bevorzugt aktiv über die Mitochondrienmembran transportiert, während bei hohen Konzentrationen Diffusionsprozesse eine größere Rolle zu spielen scheinen. Dies könnte erklären, warum bis jetzt keine Mutanten identifiziert werden konnten, die diesen Prozess beeinträchtigen (Day and Wiskich, 1980; Yu, Claybrook et al., 1983). Für Peroxisomen kommen vermutlich ähnliche Transportprozesse wie in Mitochondrien in Betracht.

Durch die Mikrokompartimentierung der Reaktionen des Glycolatzyklus innerhalb eines Multi-Enzymkomplexes kann der Fluß des Glycolat-Zyklus beschleunigt und seine Effizienz dadurch gesteigert werden (Heupel, Markgraf et al., 1991). Die Anordnung der Proteine im Enzymkomplex läßt den Glycolat-Zyklus auch ohne intakte Peroxisomenmembran ablaufen (Heupel and Heldt, 1994). Durch dieses Metaboliten-*Channeling* wird die Freisetzung von H_2O_2 und der schwachen Säure Glyoxylat, die beide membranpermeabel sind, auf ein Minimum reduziert, da sowohl H_2O_2 als auch Glyoxylat Thioredoxin-aktivierte Enzyme wie die RuBisCO inhibieren könnten (Flügge, Freisl et al., 1980; Cook, Spellman et al., 1985; Campbell and Ogren, 1990). Da der Metabolitenfluß der Photorespiration durch das Metaboliten-*Channeling* bereits hoch effizient ist, bedarf es eventuell keiner weiteren komplexen Transportmechanismen mehr, so daß ein Anionen-selektiver Porin-ähnlicher Kanal und ein enger Kontakt der Membranen der Organellen, die am Glycolat-Zyklus beteiligt sind, für einen effektiven Austausch der Metaboliten auszureichen scheinen.

Der Photorespirationszyklus reduziert zwar den Kohlenstoffverlust, der durch die Oxygenaseaktivität der RuBisCO initiiert wird, ist zur CO_2 -Fixierung jedoch kontraproduktiv und führt zu einer Verminderung pflanzlicher Produktivität. Unter Bedingungen, in denen C_3 -Pflanzen zur Reduktion der Stomata-Öffnungen gezwungen

sind, um einem zu hohen Wasserverlust über den Transpirationsstrom vorzubeugen, wie unter starker Sonneneinstrahlung, kann CO₂ zum limitierenden Faktor der Photosynthese werden. Bei steigenden Temperaturen wird zusätzlich die Carboxylase-Reaktion durch sinkende Spezifität der RuBisCO für CO₂ weiter unterdrückt (Brooks and Farquhar, 1985). Dadurch sinkt die CO₂-Fixierungsrate innerhalb des Calvin-Zyklus und damit die Abnahme photochemischer Energie in Form von NADPH und ATP. Das hat einen Überschuß absorbiertes Lichtenergie zur Folge, der zur Produktion von H₂O₂ über das Superoxid-Anion O₂⁻ in der Mehlerreaktion an Photosystem I führt (Asada, 2006). Reichen die *scavenging* Mechanismen zur Detoxifikation des H₂O₂, wie der Wasser-Wasser-Zyklus, nicht aus, kann H₂O₂ zur Inhibition der Synthese des D1-Proteins des Photosynthese-Reaktionszentrums II führen (Nishiyama, Yamamoto et al., 2001; Nishiyama, Allakhverdiev et al., 2005; Nishiyama, Allakhverdiev et al., 2006; Takahashi and Murata, 2006). Dies wiederum macht es der Pflanze unmöglich, die oxidativen Schäden am D1-Protein im Photosynthese-Reaktionszentrum, die durch Photoinhibition entstanden sind, durch Neusynthese dieses Proteins zu beheben.

Des Weiteren entsteht durch verringerte Abnahme photochemischer Energie aus der Interaktion von in den Triplett-Zustand angeregtem P680 mit Sauerstoff der hochtoxische Singulett-Sauerstoff (Kozaki and Takeba, 1996; Osmond, Badger et al., 1997).

Der Glycolat-Zyklus hilft folglich, den Calvin-Zyklus unter CO₂-limitierenden Bedingungen am Laufen zu halten und die absorbierte Lichtenergie photochemisch umzuwandeln, um einer Photoinhibition vorzubeugen, deren Reparatur energieaufwändiger wäre, als die Respiration eines Moleküls O₂ unter ATP-Verbrauch und die Abgabe eines mols CO₂ (Takahashi, Bauwe et al., 2007).

Pflanzen mit photorespiratorischen Defekten sind nicht in der Lage sich unter Normalatmosphäre normal zu entwickeln, können aber durch erhöhten CO₂-Partialdruck gerettet werden, so daß seit 1979 eine Reihe von Photorespirationsmutanten isoliert werden konnte (Somerville and Ogren, 1979; Somerville and Ogren, 1980; Somerville, Portis et al., 1982; Ogren, 1984). Diese Pflanzen zeigen Lichtstreß-Symptome wie Photoinhibition und Chlorose unter Normalatmosphäre, jedoch nicht unter Bedingungen, die die Oxygenase-Aktivität der RuBisCO unterdrücken wie erhöhte CO₂- oder erniedrigte O₂-Werte.

1.5. Peroxisomaler Matrixprotein-Import

Der Matrixprotein-Import in Peroxisomen involviert die Mehrzahl der bekannten Peroxine, die aufgrund ihrer Funktion im Import als Klasse 1-Peroxine von den an der Biogenese

der Peroxisomenmembran und der Insertion peroxisomaler Membranproteine beteiligten Klasse 2-Peroxisomen unterschieden werden (Mullen, Flynn et al., 2001; Baker and Sparkes, 2005; Nito, Kamigaki et al., 2007). Der Import-Prozess kann in 4 Schritte unterteilt werden:

- die Interaktion eines cytoplasmatischen Rezeptors mit der Proteinfracht (Cargo)
- die Kontaktaufnahme des Rezeptor-Cargo-Komplexes mit Proteinen der Peroxisomenmembran
- die Translokation des Rezeptor-Cargo-Komplexes über die Membran
- das Rezeptor-*Recycling* ins Cytoplasma

Der Import peroxisomaler Matrix-Proteine erfolgt in gefaltetem Zustand über die Peroxisomenmembran und unterscheidet sich darin grundlegend vom Protein-Import in Mitochondrien oder Chloroplasten. An freien cytosolischen Ribosomen synthetisierte Proteine interagieren im Cytoplasma mit Rezeptor-Proteinen. Dies geschieht über die Wechselwirkung einer von zwei Peroxisomalen *Targeting*-Sequenzen (PTS1 bzw. PTS2) mit entsprechenden Motiven der beiden cytoplasmatischen Rezeptoren PEX5 bzw. PEX7. Proteom-Analysen in Verbindung mit *in-silico* Vorhersagen haben in den letzten Jahren zur Erweiterung der Prototypen-Motive SKL (als PTS1-Tripeptid am C-Terminus von Matrixproteinen) und RLX₅HL (als abzuspaltendes Nonapeptid PTS2 im N-Terminus von Matrixproteinen) geführt (Emanuelsson, Eloffson et al., 2003; Kamada, Nito et al., 2003; Reumann, 2004; Hawkins and Boden, 2006). Von insgesamt 280 vermutlich PTS1- bzw. PTS2-tragenden peroxisomalen Matrix-Proteinen in *A. thaliana* konnten bisher nur ca. 50 experimentell nachgewiesen werden (Zusammenfassung bei www3.uis.no/AraPeroxV1, ehemals www.araperox.uni-goettingen.de). Der Vorteil von Proteom-Analysen gegenüber *in-silico* Vorhersagen liegt in der Möglichkeit auch bisher unbekannte oder „versteckte“ *Targeting*-Motive zu identifizieren sowie die Lokalisation der im N-Terminus liegenden PTS2-Motive herauszufinden (Reumann, Babujee et al., 2007). Einige für die Peroxisomenmatrix bestimmte Proteine nutzen einen Importweg, der unabhängig von PTS1- bzw. PTS2-Motiven ist. Die Acyl-CoA-Oxidase aus *S. cerevisiae* besitzt weder ein PTS1 noch ein PTS2 und interagiert mit Pex5p vermutlich über ein internes, bislang unbekanntes PTS3, das ein Konformations-Epitop bildet (Klein, van den Berg et al., 2002).

Ein weiterer Weg, der Proteine in die Peroxisomen geleitet, wird als *piggy-back* Import bezeichnet und beschreibt die Komplexbildung zwischen PTS-losen Proteinen und solchen, die ein Targeting-Signal tragen (Glover, Andrews et al., 1994; McNew and Goodman, 1994).

1.5.1. Rezeptor-Cargo Interaktion

Die Interaktion des PTS1-Motivs mit dem cytoplasmatischen Rezeptor Pex5p wird durch einen siebenfachen *Tetratricopeptide Repeat* (TPR) und ein α -Helix-Bündel in der C-terminalen Hälfte vermittelt, die nach Ligandenbindung zusammen eine ringförmige Konformation bilden (Gatto, Geisbrecht et al., 2000; Stanley, Filipp et al., 2006). Der aminoterminalen Bereich von Pex5p enthält ein konserviertes *Multiple Pentapeptide Repeat* (WXXXF/Y) und trägt die *Targeting*-Information, die Pex5p sogar ohne Cargo in die Peroxisomen wandern lässt; eine Mutation im C-terminalen Bereich des Proteins (N526K) führte zu Konformationsänderungen im Aminoterminus, die denen nach Cargo-Bindung an Wildtyp-Pex5p ausgelösten Konformationsänderungen glich (Saidowsky, Dodt et al., 2001; Otera, Setoguchi et al., 2002; Carvalho, Grou et al., 2007). Die Interaktion PTS2-tragender Proteine mit dem ebenfalls zwischen Cytoplasma und Peroxisomenmatrix pendelnden Rezeptor Pex7p (Nair, Purdue et al., 2004) findet über sieben β -Faltblätter statt, die jeweils einen WD40-*Repeat* umfassen (Marzioch, Erdmann et al., 1994; Zhang and Lazarow, 1995). Der pflanzliche PTS2-Rezeptor PEX7 wurde erstmals 1999 kloniert (Schumann, Gietl et al., 1999). In *A. thaliana* ist der PTS2- an den PTS1-Import gekoppelt. Eine Mutation innerhalb des aminoterminalen Bereichs von PEX5, der für die Interaktion mit dem carboxyterminalen Bereich in PEX7 verantwortlich ist, führte zum Verlust des PTS2-Imports, ohne den PTS1-Import zu stören (Woodward and Bartel, 2005). Des weiteren betrifft die Herabregulierung von PEX5 ebenso den PTS2-Import (Hayashi, Yagi et al., 2005).

In Hefen sind für den PTS2-Import die accessorischen Proteine Pex18p, Pex20p und Pex21p als Co-Rezeptoren nötig, jedoch keine direkte Interaktion von Pex7p mit Pex5p (Stein, Schell-Steven et al., 2002; Sichtung, Schell-Steven et al., 2003; Otzen, Wang et al., 2005). Die Co-Rezeptoren weisen allerdings strukturelle Ähnlichkeiten mit Pex5p auf und sind teils redundant, sie werden in *pex5*-Mutanten ebenfalls schlecht exprimiert (Moscicka, Klompaker et al., 2007). Dies könnte eine Art Koppelung beider Importwege wie in *Arabidopsis* darstellen.

In Säugern steht für den PTS2-Import eine lange *Splice*-Variante von PEX5, PEX5L, zur Verfügung. Obwohl die kurze so wie die lange Variante PTS1-tragende Proteine bindet, interagiert nur die lange Variante mit dem PTS2-Rezeptor PEX7 (Matsumura, Otera et al., 2000).

Die große Mehrheit peroxisomaler Matrixproteine wird über das PTS1 in die Peroxisomen transportiert und nur ein geringer Teil über PTS2. Verglichen mit anderen Organismen besitzen Pflanzen verhältnismäßig viele PTS2-tragende Proteine. Als Beispiel seien Acyl-CoA-Oxidase 3, die peroxisomale Aspartat-Aminotransferase (Schultz and Coruzzi,

1995), Thiolase, Citrat-Synthase und das Hitzeschock-Protein Hsp70 genannt. Die glyoxysomale Malatdehydrogenase wurde als erstes pflanzliches PTS2-tragendes Protein identifiziert (Gietl, Faber et al., 1994).

Nach dem Import PTS2-tragender Proteine wird die *Targeting*-Sequenz von der Glyoxysomalen Processing Protease (GPP), die als DEG15 identifiziert wurde, in Säugern und Pflanzen abgespalten (Helm, Lück et al., 2007).

1.5.2. Kontaktaufnahme des Rezeptor-Cargo-Komplexes mit der Peroxisomenmembran

Der Komplex aus Pex5p/Pex7p und Matrixprotein muß für einen erfolgreichen Import in die Peroxisomen mit Proteinkomponenten der Peroxisomenmembran interagieren, dem so genannten Docking-Komplex, der sich aus Pex13p und Pex14p zusammensetzt.

Der *Docking*-Mechanismus besteht aus einer Interaktion des Aminoterminus des integralen Membranproteins Pex13p mit Pex7p in Hefe, Säugern und Pflanzen. Der C-Terminus von Pex13p interagiert in Hefe und *Arabidopsis* mit Pex5p und der zweiten Komponente des Docking-Apparates Pex14p (Pires, Hong et al., 2003; Mano, Nakamori et al., 2006). In Hefe ist zusätzlich das über Pex14p membranassoziierte Pex17p am Import beteiligt, denn *pex17*-Mutanten zeigen zwar noch Membran-*ghosts* (Peroxisomen ohne Matrixinhalt), aber weder PTS1- noch PTS2-vermittelten Protein-Import (Huhse, Rehling et al., 1998).

In Säugern und Pflanzen bindet der *Multiple Pentapeptide Repeat* (WXXXF/Y) in PEX5 hochaffin an PEX14 (Saidowsky, Dodt et al., 2001; Nito, Hayashi et al., 2002; Otera, Setoguchi et al., 2002). Da diese Bindung von PEX14 und mit Fracht beladenem PEX5 stärker ist als die Bindung von PEX5 an PEX13, wird davon ausgegangen, daß die Interaktion PEX5-PEX14 die für das *Docking* von PTS1-Proteinen an die Peroxisomenmembran wichtige ist (Urquhart, Kennedy et al., 2000). In *pex14*-Mutanten von Säugern akkumulierten PEX5 und PEX7 in höherem Maße an der Peroxisomenmembran als in *pex13*-Mutanten (Otera, Harano et al., 2000).

Auch der Co-Rezeptor Pex20p in Hefe enthält ein *Multiple Pentapeptide Repeat*, das die Bindung an den *Docking*-Komplex vermittelt (Leon, Zhang et al., 2006). In Pex14p-defizienten Mutanten ist Pex20p ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert (Leon, Zhang et al., 2006). *Arabidopsis*-Mutanten in PEX13 (*apm2*) und PEX14 (*ped2*) weisen wie Säuger- und Hefe-Mutanten Störungen in beiden Importwegen, PTS1- bzw. PTS2-vermittelt, auf (Hayashi, Nito et al., 2000; Mano, Nakamori et al., 2006).

1.5.3. Translokation des Rezeptor-Cargo-Komplexes und Freisetzung der Fracht

Der genaue Mechanismus über den die Matrixproteine das peroxisomale Lumen erreichen, ist nach wie vor nicht geklärt. Diese Matrixproteine werden posttranslational, in gefaltetem Zustand, ja sogar als Oligomere importiert, was den peroxisomalen Importprozess von dem anderer Organellen deutlich unterscheidet (Schnell and Hebert, 2003). Es existieren zwei Modelle, die sich im Ausmaß der Translokation des Rezeptor-Cargo-Komplexes unterscheiden. Im *simple-shuttle* Modell findet die Freisetzung der Fracht durch Integration des Rezeptors in die Peroxisomenmembran statt. Das von Erdmann et al (2005) vorgeschlagene *transient-pore* Modell, bei dem die cytosolischen Rezeptoren eine zeitlich begrenzte Pore für den Import von Matrixproteinen in der Peroxisomenmembran bilden, fällt unter das *simple-shuttle* Modell.

Das *extended-shuttle* Modell läßt den Rezeptor-Cargo-Komplex bis in das peroxisomale Lumen hineinwandern. In beiden Modellen sind die Rezeptoren Pex5p, Pex7p und Pex20p Protease geschützt (Leon, Zhang et al., 2006).

In Säugern konnte gezeigt werden, daß PEX5 zwischen Cytoplasma und Peroxisomenmembran zyklisch wandert (Dammai and Subramani, 2001). In *S. cerevisiae* interagiert Pex5p mit Pex8p, dem einzigen Peroxin, das auf der peroxisomalen Lumenseite gebunden ist. Das zeigt, daß Pex5p entweder bis ins Lumen wandert oder zumindest so weit in die Peroxisomenmembran integriert wird, daß es zur Lumenseite hin exponiert ist (Rehling, Skaletz-Rorowski et al., 2000). Auch Pex7p wandert zyklisch ins Peroxisomenlumen und zurück ins Cytoplasma, wie an Pex7p-GFP-Fusionen gezeigt werden konnte. Nach proteolytischer Spaltung des *Linkers* zwischen GFP und Pex7p, verblieb GFP in der Peroxisomenmatrix (Nair, Purdue et al., 2004). Der Co-Rezeptor Pex20p bleibt in *S. cerevisiae* Membran assoziiert, wenn Komponenten des Rezeptor-Recyclings deletiert werden (Leon, Zhang et al., 2006). Ob die beiden anderen Co-Rezeptoren in Hefe, Pex18p und Pex21p, während des Import-Zyklus ins Peroxisomenlumen wandern, ist unklar (Purdue, Yang et al., 1998).

Es ist möglich, daß auch die Komponenten des Docking-Apparates, Pex13p, Pex14p und Pex17p, Teil des Translokationsmechanismus sind und Pex5p über eine Importkaskade mit mehreren Proteinen in der Membran interagiert (Baker and Sparkes, 2005). In einem als Importomer bezeichneten Komplex konnte sogar eine Interaktion von Pex5p mit dem *Docking*-Apparat, mit Pex8p und dem RING-Finger-Komplex, bestehend aus Pex2p, Pex10p und Pex12p, nachgewiesen werden (Agne, Meindl et al., 2003).

In einer Studie an Rattenleber verhielt sich PEX5 wie ein integrales Membranprotein. Es ließ sich durch eine milde Proteasebehandlung, die zur teilweisen Degradation von

PEX13 führte, nicht inaktivieren und konnte als 250 kD-Komplex isoliert werden, der sich aus PEX5 und PEX14 zusammensetzte (Gouveia, Reguenga et al., 2000). Auch war Pex5p zu spontaner Insertion in Lipid-Membranen von *S. cerevisiae* fähig, wenn die für die Interaktion mit dem Docking-Komplex nötigen Motive mutiert wurden. Daraus wurde geschlossen, daß für die initiale Kontaktaufnahme des Rezeptor-Cargo-Komplexes mit der Peroxisomenmembran Protein-Lipid-Interaktionen wichtig sind, bevor er mit anderen Peroxinen fest assoziiert (Kerssen, Hambruch et al., 2006). Diese Befunde unterstützen das von Erdmann und Mitarbeiter (2005) aufgestellte *transient-pore* Modell, in dem Pex5p mit Fracht beladen zu einer zeitlich begrenzten Pore durch die Peroxisomenmembran oligomerisiert, ähnlich porenbildender Toxine, die eine bis zu 30 nm weite Pore in Cytoplasmamembranen ihrer Zielzellen bilden. Durch diese Poren werden toxisch wirkende Proteine eingeschleust (Gouaux, 1997; Dalla Serra and Menestrina, 2003). Eine weitere Gemeinsamkeit ist die ATP-Unabhängigkeit der Ausbildung dieser Toxin-Poren und der Insertion von Pex5p in die Peroxisomenmembran (Oliveira, Gouveia et al., 2003). Für die Translokation PTS2-tragender Proteine in Hefe könnten die Co-Rezeptoren, z.B. Pex18p, eine dem Pex5p ähnliche Aufgabe übernehmen, da sie der N-terminalen Hälfte von Pex5p funktionell ähnlich sind (Schafer, Kerssen et al., 2004).

Abbildung 6 zeigt den Mechanismus des peroxisomalen Matrixprotein-Imports schematisch (Abbildung verändert nach Brown und Baker (2008)).

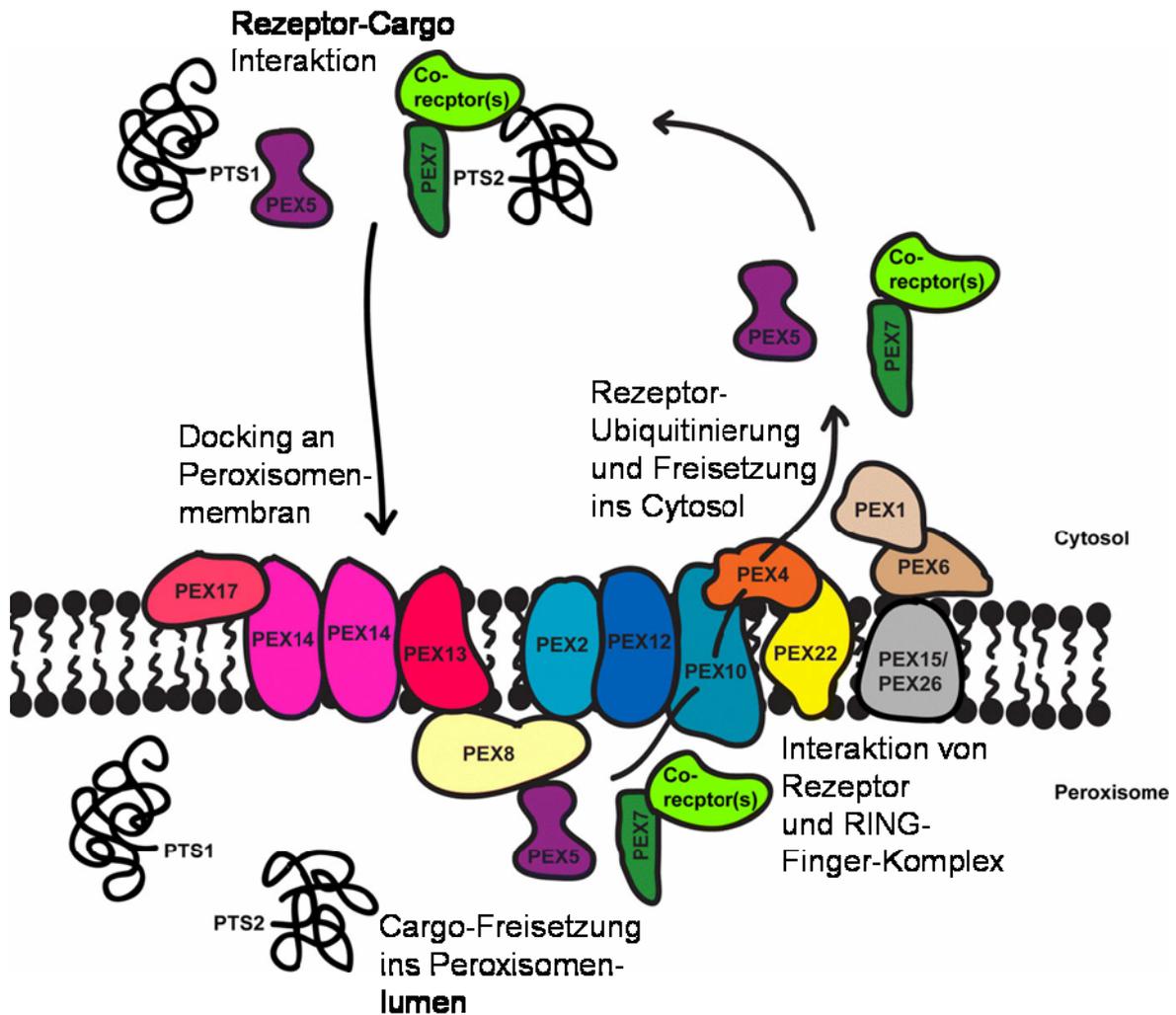


Abbildung 6: Peroxisomaler Matrixprotein-Import. Matrixproteine (Knäuel) binden über ihre peroxisomalen *Targeting*-Signale PTS1 bzw. PTS2 an ihre cytoplasmatischen Rezeptoren PEX5 bzw. PEX7. In Hefen sind weitere Co-Faktoren für diese Interaktion nötig. Es folgt das *Docking* des Rezeptor-Cargo-Komplexes an die Peroxisomenmembran über PEX14 und PEX13 (in Hefe auch über PEX17). Die Rezeptoren wandern mit ihrer Fracht ins peroxisomale Lumen und entlassen diese dort, um selbst wieder zurück ins Cytoplasma gebracht zu werden. In Hefe assoziiert der RING-Finger-Komplex (bestehend aus PEX10, PEX2 und PEX12) über PEX8 mit dem Docking-Komplex (PEX13, PEX14 und PEX17). PEX10 bindet an das E2-Ubiquitin-konjugierende PEX4, das über PEX22 membranverbunden ist. Die PEX4-vermittelte Monoubiquitinierung ist die Voraussetzung für das Recycling von PEX5 zurück ins Cytoplasma und die RING-Finger-Peroxine sind vermutlich die E3-Ubiquitin-Ligasen in diesem Prozess. Die Energie für die Freisetzung von PEX5 von der Peroxisomenmembran liefern die AAA-ATPasen PEX1 und PEX6, die in Hefe über PEX15 und in Säugern über PEX26 mit der Peroxisomenmembran verbunden sind. Über das Recycling von PEX7 ist wenig bekannt, obwohl zwei seiner Co-Rezeptoren ubiquitiniert werden. Die Co-Rezeptoren so wie PEX17, PEX8, PEX15 und PEX26 haben keine Homologen in *A. thaliana*. Die Abbildung ist nach Brown und Baker (2008) abgewandelt.

1.5.4. Recycling des Rezeptors ins Cytosol

Nachdem die Proteinfracht im Lumen der Peroxisomen freigesetzt wurde, müssen die Rezeptoren zurück ins Cytoplasma gelangen, um für weitere Runden des Imports zur Verfügung zu stehen. Die Ubiquitinierung der Rezeptoren ist eine Voraussetzung für diesen Prozess (Carvalho, Pinto et al., 2007; Platta, El Magraoui et al., 2007). Ubiquitinierung ist eine posttranslationale Protein-Modifikation und beschreibt das kovalente Anhängen eines 76 Aminosäuren langen Ubiquitin-Polypeptids an Substratproteine (Hicke, Schubert et al., 2005). Polyubiquitinierungen dienen als Signal für den Abbau Ubiquitin-modifizierter Proteine über das Proteasom (Adhikari and Chen, 2009), in der DNA-Reparatur (Hoegel, Pfander et al., 2002) sowie in der Entfernung defekter Proteine aus dem Sekretionsweg des Endoplasmatischen Reticulums (Hirsch, Gauss et al., 2009). Monoubiquitinierung hingegen dient unter anderem als Signal für Abknospungen von Vesikeln von der Plasmamembran (Galan and Haguenaer-Tsapis, 1997).

Die Ubiquitinierung wird durch eine Kaskade von drei aufeinanderfolgenden enzymatischen Schritten bewerkstelligt. Zuerst wird das C-terminale Glycin des Ubiquitins durch Verknüpfung mit einem Cystein-Rest eines Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1) aktiviert. Es folgt der Transfer dieses Ubiquitins auf einen Cystein-Rest eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2 oder UBC). Die Peptidbindung zwischen Ubiquitin und Substrat wird im dritten Schritt durch Interaktion des E2 mit einer Ubiquitin-Ligase (E3) vermittelt (Bachmair, Novatchkova et al., 2001).

In *Saccharomyces cerevisiae* sind 11 E2-Enzyme beschrieben, die zum Teil überlappende Funktionen aufweisen. Das *Arabidopsis*-Genom codiert mindestens ein Homologes für zehn der Hefe-Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (Jentsch, 1992). Die E3-Ligasen sind für die Spezifität der jeweiligen Ubiquitinierung verantwortlich, was sich in der weit höheren Anzahl möglicher E3-Ligasen in Hefe und *Arabidopsis* widerspiegelt, die mehr als 80 bzw. mehr als 300 beträgt (Hershko and Ciechanover, 1998; Bachmair, Novatchkova et al., 2001; Hicke, Schubert et al., 2005).

In Hefe konnte die Ubiquitinierung der PTS-Rezeptoren Pex5p, Pex18p und Pex20p nachgewiesen werden (Brown and Baker, 2008). Für Pex5p wurden sowohl Mono- als auch Polyubiquitinierung beobachtet. Die Monoubiquitinierung eines Cysteins von Pex5p ist abhängig von Pex4p, dessen E2-Aktivität in Hefe erstmals 1992 nachgewiesen wurde (Wiebel and Kunau, 1992), und von UbcH5a/b/c im Menschen (Platta, El Magraoui et al., 2007; Williams, van den Berg et al., 2007; Grou, Carvalho et al., 2008). Pex4p ist in Hefe und *Arabidopsis* über Pex22p mit der Peroxisomenmembran verbunden (Koller, Snyder et al., 1999). Die Funktion des pflanzlichen PEX4 scheint jedoch nicht in einer

Monoubiquitinierung von PEX5 zu liegen, da eine *pex4/pex22*-Doppelmutante keinen gestörten Matrixprotein-import zeigte, jedoch das glyoxysomale Markerenzym Isocitrat-Lyase in Peroxisomen anreicherte (Zolman, Monroe-Augustus et al., 2005). Die Autoren wiesen dem pflanzlichen PEX4 deshalb eine Funktion im Matrixprotein-Austausch im Zuge der Umwandlung von Glyoxysomen in Peroxisomen zu.

Die in Hefe und Säugern beobachtete Pex4p-abhängige Monoubiquitinierung von Pex5p ist das Signal für das Recycling dieses Peroxins zurück ins Cytoplasma, wo es für neue Importrunden vermutlich deubiquitiniert wird (Carvalho, Pinto et al., 2007; Platta, El Magraoui et al., 2007).

Polyubiquitinierung eines Lysin-Restes von Pex5p ist dagegen abhängig von den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen Ubc4p bzw. den teils redundanten Ubc5p und Ubc1p und konnte in Hefestämmen beobachtet werden, die defizient für Pex4p, Pex22p, Pex1p, Pex6p und Pex15p waren. In diesen Mutanten trat diese Form der Ubiquitinierung erst auf, wenn die Freisetzung von Pex5p über Monoubiquitinierung behindert war. Die Polyubiquitinierung stellt folglich eine Qualitätskontrollfunktion dar, die entweder dysfunktionales oder an der Membran akkumuliertes Pex5p dem Abbau über das Proteasom zuführt (Platta, Girzalsky et al., 2004; Kiel, Emmrich et al., 2005).

Sowohl Mono- als auch Polyubiquitinierung sind essentiell für die Freisetzung des PTS1-Rezeptors von der Peroxisomenmembran (Platta, El Magraoui et al., 2007). Eine Beeinträchtigung des PTS2-Imports konnte in *pex4*-Hefe-Mutanten ebenfalls beobachtet werden. Ob Pex4p direkt an der Ubiquitinierung des PTS2-Rezeptors Pex7p beteiligt ist, oder ob die Co-Rezeptoren, die an Pex7p gekoppelt sind, ubiquitiniert werden, muß noch gezeigt werden.

Der letzte Schritt in der Freisetzung der PTS-Rezeptoren von der Peroxisomenmembran ins Cytoplasma ist ATP-abhängig und wird über die beiden AAA (*ATPase associated with various cellular activities*) ATPasen Pex1p und Pex6p katalysiert, was *in-vitro* Rekonstitutionen des kompletten Pex5p-Zyklus in *S. cerevisiae* und menschlichen Fibroblastenzellen gezeigt haben (Oliveira, Gouveia et al., 2003; Miyata and Fujiki, 2005; Platta, Grunau et al., 2005; Miyata, Hosoi et al., 2009). Pex1p und Pex6p sind in Hefe und Säugern sowohl cytoplasmatisch als auch an der Peroxisomenmembran lokalisiert, mit der sie über Pex15p in Hefe und PEX26 in Säugern Kontakt aufnehmen (Miyata and Fujiki, 2005; Platta, Grunau et al., 2005). Der genaue Mechanismus der Extraktion des Rezeptors aus der Membran ist jedoch unbekannt. Aufgrund struktureller Ähnlichkeit der beiden ATPasen mit anderen Mitgliedern der AAA-Familie, die am Degradierungssystem des Endoplasmatischen Reticulums (ERAD) beteiligt sind, wird eine durch ATP-Hydrolyse induzierte Konformationsänderung als treibende Kraft für das Herausziehen des Rezeptors aus der Membran vermutet (Shiozawa, Maita et al., 2004; Park, Isaacson et al.,

Beeinträchtigungen des RING-Finger-Komplexes durch Mutationen in einem der drei Peroxine führen zu Störungen des Matrixprotein-Imports und der Ubiquitinierung von Pex5p, wie für Pex10p in Hefe gezeigt werden konnte (Platta, Girzalsky et al., 2004).

In menschlichen *pex10* Fibroblastenzellen (Chang, Warren et al., 1999) und in *pex2*- und *pex12*-Mutanten akkumuliert PEX5 an der Peroxisomenmembran (Dodt and Gould, 1996). In Säugern interagiert PEX12 über seinen Zink RING-Finger sowohl mit PEX5 als auch mit PEX10 (Chang, Warren et al., 1999; Okumoto, Abe et al., 2000). Das Fehlen auch nur eines der drei RING-Peroxine führt in *Arabidopsis* zu Embryoletalität im Herzstadium (Hu, Aguirre et al., 2002; Schumann, Wanner et al., 2003; Sparkes, Brandizzi et al., 2003; Fan, Quan et al., 2005), wohingegen RNAi-Strategien zu schwächeren Phänotypen führten und die Beteiligung der RING-Finger-Peroxine am Matrixprotein-Import in Pflanzen zeigen konnten (Fan, Quan et al., 2005; Nito, Kamigaki et al., 2007).

Den direkten Nachweis einer E2-abhängigen E3-Ligase-Aktivität für RING-Finger-Proteine vom Typ HCa konnte in einem *in-vitro* Ubiquitinierungs-Assay gemacht werden (Stone, Hauksdottir et al., 2005).

Eine direkte Beteiligung der RING-Finger-Peroxine an der Ubiquitinierung des peroxisomalen Importrezeptors Pex5p durch E3-Ligase-Aktivität konnte erst durch Williams und Kollegen (2008) in Hefe belegt werden. Pex10p zeigte E3-Ligase-Aktivität in Kombination mit Ubc4p und dem Homologen Ubch5a aus Menschen, jedoch nicht in Kombination mit Pex4p *in vitro*. Eine *pex10*-Mutante mit fehlendem Zink-Finger zeigte *in-vivo* gestörte Polyubiquitinierung, jedoch keine Beeinträchtigung der Monoubiquitinierung von Pex5p. Pex10p konnte somit als eine E3-Ligase mit einer Aufgabe in der Polyubiquitinierung von Pex5p gezeigt werden (Williams, van den Berg et al., 2008).

In Pflanzen wurden noch keine Ubiquitinierungs-Assays mit den RING-Finger-Peroxinen durchgeführt und die E2-Substrate sind unbekannt. Allerdings existieren indirekte Hinweise auf eine Beteiligung der RING-Peroxine am Recycling von PEX5 und PEX7, da RNAi-Linien mit reduzierten Transkriptmengen der RING-Peroxine einen gestörten Matrix-Import des GFP-PTS1 und PTS2-GFP zeigen (Nito, Kamigaki et al., 2007).

Die Interaktion des pflanzlichen PEX12 mit dem PTS2-Rezeptor PEX7 konnte kürzlich über Bimolekulare-Fluoreszenz-Komplementierung und Hefe-2-Hybrid-Analyse dargestellt werden (Singh, Hayashi et al., 2009). PEX12 könnte somit der Kontaktvermittler zwischen Rezeptor-Cargo-Komplex, der über den Docking-Apparat an die Peroxisomenmembran gebunden wird, und den beiden anderen RING-Finger-Peroxinen PEX2 und PEX10 sein. Eine Rolle für PEX12 als E3-Ligase kann daraus jedoch nicht abgeleitet werden.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die Aufgabe der Zink RING-Finger der drei Peroxine PEX2 (At1g79819), PEX10 (At2g26350) und PEX12 (At3g04460) ist in Pflanzen nicht geklärt. Ein Ausfall eines der drei Peroxine führt in *Arabidopsis* zu Embryoletalität im Herzstadium (Hu, Aguirre et al., 2002; Schumann, Wanner et al., 2003; Sparkes, Brandizzi et al., 2003; Fan, Quan et al., 2005). Zur Funktionsanalyse der Zink RING-Finger wurden konditional subletale Δ Zn-Mutanten erzeugt, die einen dysfunktionalen RING-Finger im Wildtyp-Hintergrund überexprimieren. Die Punktmutationen im dysfunktionalen RING-Finger führen zum Verlust der Zink-Koordinationsfähigkeit. In Abbildung 8 ist die *site*-gerichtete Mutagenese der Zink RING-Finger veranschaulicht.

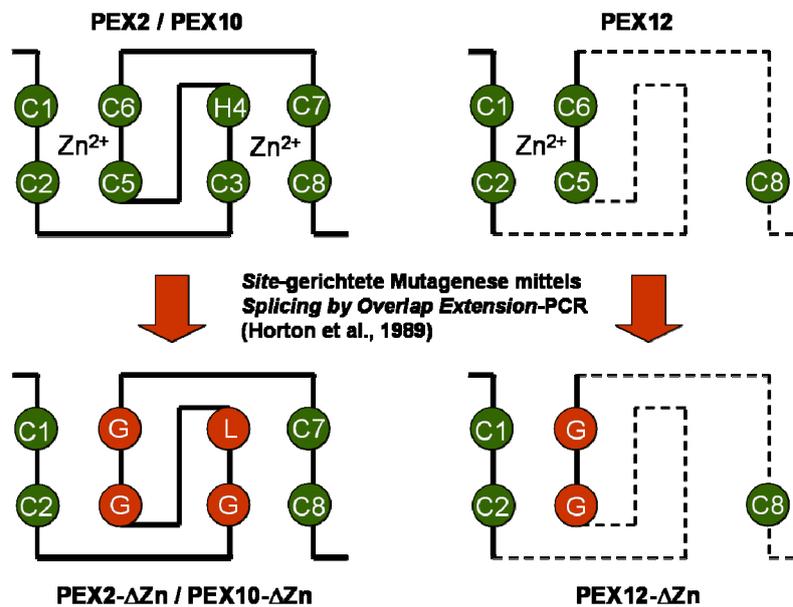


Abbildung 8: Schematische, zweidimensionale *cross-brace* Darstellung der Zink RING-Finger der Peroxine PEX2, PEX10 und PEX12 (Kosarev, Mayer et al., 2002). C (Cystein), H (Histidin), G (Glycin) und L (Leucin). Die nach *site*-gerichteter Mutagenese substituierten Aminosäuren, die eine weitere Zink-Bindung unmöglich machen, sind rot unterlegt. Die Nummerierung der Aminosäuren gibt ihre relative Lage innerhalb des Zink RING-Fingers an.

In PEX10- Δ Zn-Pflanzen waren photorespiratorische Defekte, wie zwergenhafter Wuchs und Chlorose, die sich mit beginnender Photoautotrophie einzustellen begannen, reduzierte Chlorophyll-Gehalte und eine Reduktion der Photosyntheseleistung unter Normalatmosphäre bereits beschrieben (Uwe Schumann, Dissertation, TU-München, 2003). Die Ursache dieses photorespiratorischen Phänotyps sollte über Licht- und

Elektronenmikroskopie auf subzellulärer Ebene, sowie Markerenzymassays untersucht werden. Der Einfluß der T-DNA-Integration selbst auf die Ausbildung des Photorespirations-Phänotyps in PEX10- Δ Zn-Pflanzen wird durch Bestimmung der T-DNA-Integrationsstellen, Transkriptanalyse der betroffenen Gene und Untersuchung von SALK-Linien ermittelt, die T-DNAs in den Genen tragen, die von der T-DNA-Integration in den PEX10- Δ Zn-Linien betroffen sind.

Der Einfluß des N-Terminus von PEX10 auf die pflanzliche Entwicklung wird an TILLING-Linien, die Punktmutationen in konservierten Bereichen des Proteins tragen, am Licht- so wie Elektronenmikroskop untersucht. Eine Metabolom-Analyse soll die Metabolitenverhältnisse in ausgewählten TILLING-Linien klären, die einen Phänotyp zeigen.

Die Beteiligung des Zink RING-Fingers von PEX10 am Matrixproteinimport sollte auch durch Kreuzung der phänotypisch auffälligsten PEX10- Δ Zn1-Linie mit einer Pflanze, die GFP mit peroxisomalem Targetingsignal überexprimiert (At-GFP-PTS), gezeigt werden. Analoge Δ Zn-Linien mit dysfunktionalem Zink RING-Finger und N-terminalem T7-tag wurden erzeugt, die pex10- Δ Zn-T7, pex2- Δ Zn-T7 bzw. pex12- Δ Zn-T7 im At-GFP-PTS-Hintergrund überexprimieren. Markerenzymassays, Licht-, Elektronen- sowie Confocale Laserscanning-Mikroskopie, die Bestimmung der Photosyntheseleistung und Metabolom-Analysen sollten die Beteiligung des RING-Fingers der drei Peroxine an Photorespiration, Peroxisomenproliferation, Organellenkontakt mit Chloroplasten und Matrixprotein-Import untersuchen.

Ein *Suppressorscreen* einer EMS-mutagenisierten Population von PEX10- Δ Zn1 sollte Revertanten des photorespiratorischen Phänotyps hervorbringen und neue Einblicke in den Mechanismus der Photorespiration gewähren.

In einem unabhängigen Projekt sollte die cDNA der Wassermelonen-DEG15 Protease mittels reverser Genetik und degenerierten Primern kloniert werden, um mittels cDNA-Sequenzinformation, und daraus ableitbarer Aminosäuresequenz, die Masse tryptischer Fragmente eines ca. 72 kD großen Proteins als Bruchstücke der Wassermelonen-DEG15 identifizieren zu können.

2. Ergebnisse

2.1. Die Überexpression des PEX10 mit dysfunktionalem Zink RING-Finger führt zu peroxisomaler Formstörung und zu Kontaktverlust zwischen Peroxisom und Chloroplast bei kaum beeinträchtigtem Import von Matrixproteinen

Die Funktionsanalyse des Zink RING-Fingers von PEX10 wurde an vier unabhängigen Arabidopsis-Linien vorgenommen, in denen PEX10 mit mutiertem Zink RING-Finger unter der Kontrolle des 35S-Promotors im Columbia Wildtyphintergrund exprimiert wird (Uwe Schumann, Dissertation, TU-München, 2003; Schumann, Prestele et al 2007). Diese vier Linien (PEX10- Δ Zn1, PEX10- Δ Zn2, PEX10- Δ Zn3 und PEX10- Δ Zn4) sollten hinsichtlich ihres photorespiratorischen Phänotyps untersucht werden, der sich durch Anzucht der Pflanzen unter Hoch-CO₂-Bedingungen normalisieren lässt. Mittels Licht- und Elektronenmikroskopie (in Kooperation mit AG Wanner, LMU München) konnte eine Kontaktstörung zwischen Peroxisomen und Chloroplasten gezeigt werden, die durch eine Metabolom-Analyse bestätigt wurde. Zur Klärung der Beteiligung des Zink RING-Fingers von PEX10 am Import peroxisomaler Matrixproteine wurde PEX10- Δ Zn1 mit einer Linie gekreuzt, die GFP mit peroxisomalem Targetingsignal überexprimiert (At-GFP-PTS1 bzw. At-PTS2-GFP) und Peroxisomen spezifisch grün färbt (Mano, Nakamori et al., 2002). Diese Kreuzung wird im Folgenden mit PEX10- Δ Zn1xGFP-PTS1 bezeichnet. Ein generell gestörter Matrixprotein-Import lässt sich durch die Fehllokalisierung des GFP ins Cytoplasma verfolgen. Der Matrixprotein-Import in dieser Kreuzung war nicht gestört.

In einem analogen Ansatz wurde ein PEX10 mit dysfunktionalem Zink RING-Finger erzeugt, N-terminal mit einem 11 Aminosäuren langen T7-tag versehen und in die At-GFP-PTS-Linien transformiert. Diese Linien sollten mittels T7-tag die Lokalisation des dysfunktionalen PEX10 in der Immuno-Elektronenmikroskopie, sowie seine Reinigung über Säulenchromatographie ermöglichen und werden im Folgenden als PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1 bezeichnet. Diese T7-tag-haltigen Linien zeigten eine leichte Fehllokalisierung des GFP ins Cytoplasma.

2.1.1. PEX10- Δ Zn-Pflanzen zeigen eine Kontaktstörung zwischen Peroxisomen und Chloroplasten

Die PEX10- Δ Zn1-Linie wurde nach Sichtbarmachung der Peroxisomen mittels Katalasafärbung über Diaminobenzamidin (DAB) (Wanner and Theimer, 1982) an Licht- und Elektronenmikroskop untersucht, um eine Erklärung für den photorespiratorischen Phänotyp auf subzellulärer Ebene zu erhalten.

Die Peroxisomen des Wildtyps auf den lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 9 sind einheitlich rund bis oval geformt und liegen eng an Chloroplasten an.

Die Peroxisomen der PEX10- Δ Zn-Linien lassen sich vergleichbar mit dem Wildtyp Katalase färben, variieren aber in Form und Größe erheblich. Sie bilden innerhalb des Cytoplasmas Ketten, Ausstülpungen und untereinander verbundene Konglomerate (Abbildung 9, Δ Zn1 bis Δ Zn4). Die als Kontrolle dienende PEX10-Überexpressions-Linie (Überexpr. in Abbildung 9) zeigt ein dem Wildtyp gleichendes Bild.

Die Auszählung und Vermessung von je 50 Peroxisomen auf transmissionselektronenmikroskopischen Bildern ergab für den Wildtyp bei runder bis ovaler Form der Peroxisomen einen mittleren Durchmesser von $0,88 \pm 0,23 \mu\text{m}$ ($n = 50$) auf, und $88 \pm 16\%$ ($n = 25$) der Peroxisomen sind mit einem Chloroplasten assoziiert (Abbildung 10, Wildtyp). Die Dicke der Peroxisomen der Δ Zn-Linien weicht mit $1,28 \pm 0,78 \mu\text{m}$ nicht signifikant von der des Wildtyps ab (***, $P = 0,07$), die Peroxisomenlänge jedoch stark, wobei zwei Populationen von Peroxisomen existieren, eine mit normaler Länge von $0,68 \pm 0,15 \mu\text{m}$ ($n = 29$) und eine zweite, davon stark abweichende mit einer Länge von $3,51 \pm 1,93 \mu\text{m}$ (***, $P < 0,001$, $n = 21$). Die Peroxisomen der PEX10- Δ Zn-Linien sind mit $31 \pm 21\%$ (***, $P < 0,001$) weniger häufig und eng mit Chloroplasten assoziiert (Abbildung 10). Die vereinzelt bis zu $7 \mu\text{m}$ langen Peroxisomen der Δ Zn-Linien (Abbildung 9, Δ Zn1 und Δ Zn4), erscheinen am TEM als viele kleine, aneinander liegende Peroxisomen (Abbildung 10, unten). Zur Beurteilung der Peroxisomenform ist folglich die parallele Auswertung licht- und elektronenmikroskopischer Aufnahmen notwendig.

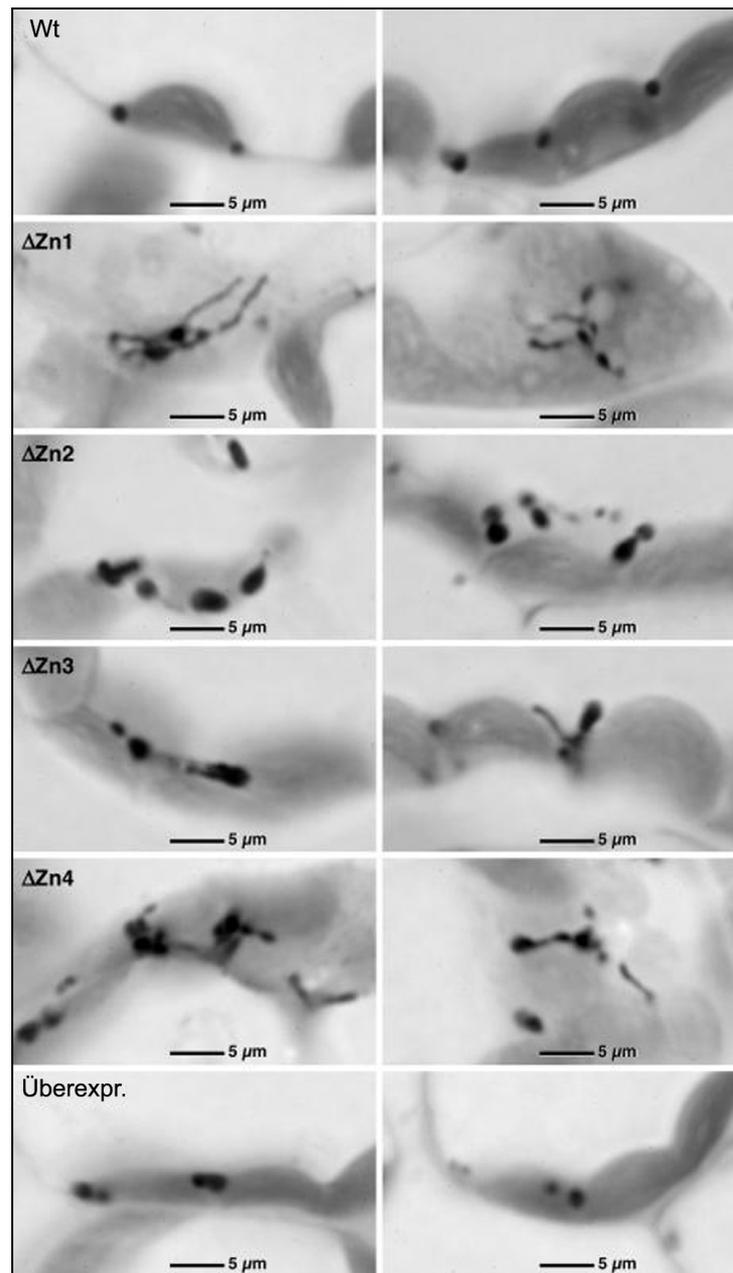


Abbildung 9: Peroxisomale Formstörung durch Überexpression des PEX10 mit dysfunktionalem Zink RING-Finger im Wildtyphintergrund. In allen vier PEX10- Δ Zn-Linien (Δ Zn1-4) ist die Peroxisomenform, verglichen mit dem Wildtyp (Wt) und der als Kontrolle dienenden PEX10-Überexpressionslinie (Überexpr.), gestört. Die Peroxisomen der Δ Zn-Linien sind um bis zu das 7-fache elongiert bei einer Dicke, die dem Wildtyp gleicht. Lichtmikroskopie 500 nm dünner Blatt-Sektionen von 12 Tage alten Rosettenblättern in Epoxydharz eingebettet. Peroxisomen wurden mit Diaminobenzamidin (DAB) sichtbar gemacht (Wanner and Theimer, 1982). Vergrößerung 80x.

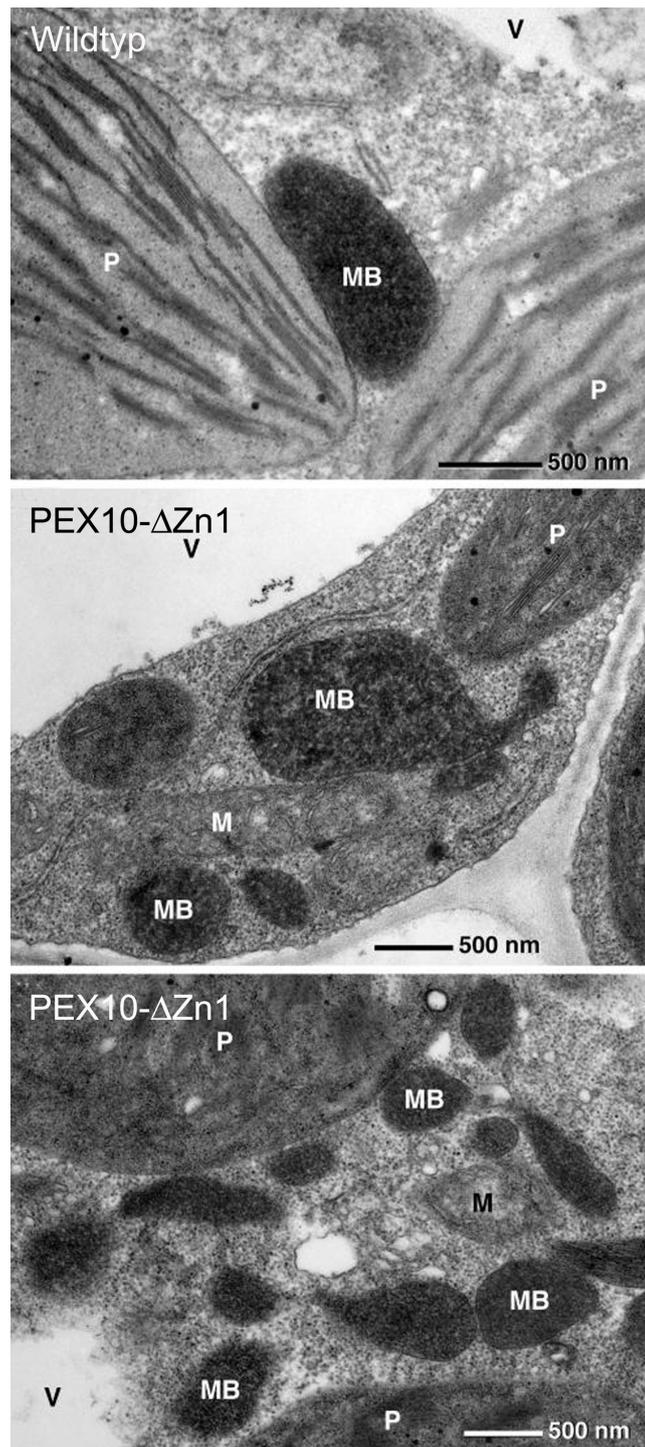


Abbildung 10: Peroxisomale Formstörung und Kontakt-Verlust zwischen Chloroplasten und Peroxisomen durch Überexpression des PEX10 mit dysfunktionalem Zink RING-Finger im Wildtyphintergrund. In Zellen des Wildtyps sind die Peroxisomen (MB = *Microbody* = Peroxisom) eng mit Chloroplasten (P = Plastid) assoziiert (oberes Bild). In der PEX10-ΔZn1-Mutante (mittleres und unteres Bild) sind sowohl dieser Organellenkontakt als auch die Form gestört. Die Peroxisomen weisen Ausstülpungen auf (mittleres Bild) und zeigen lokale Konglomerate ohne ausgeprägten Kontakt mit Chloroplasten (unteres Bild). Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Mesophylls von 12 Tage alten Rosettenblätter von Wildtyp und PEX10-ΔZn1.

Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, dass das Peroxin PEX10 mit seinem Zink RING-Finger entweder direkt oder indirekt an der Kontaktvermittlung zwischen Chloroplasten und Peroxisomen beteiligt ist. Dieser Befund soll anhand einer Metabolom-Analyse weiter untersucht werden.

2.1.2. Eine Metabolom-Analyse spiegelt den gestörten Organellenkontakt in PEX10- Δ Zn-Pflanzen wider

Ein gestörter Organellenkontakt wie in den PEX10- Δ Zn-Linien sollte sich auf metabolischer Ebene derart niederschlagen, dass sich die Menge an Intermediaten des Glycolat-Zyklus ändert. Hierfür wird in Kooperation mit der AG Wolfram Weckwerth (MPI, Golm) eine Metabolom-Analyse durchgeführt, um den gestörten Organellenkontakt mit einer unabhängigen Methode zu verifizieren.

Pflanzen des Wildtyps und der PEX10- Δ Zn1-Mutante wurden jeweils 14 Tage unter Normalatmosphäre im Gewächshaus (1. Experiment) bzw. 14 Tage unter Normalatmosphäre in einer Conviron Phytokammer (2. Experiment) angezogen. Nach Aufarbeitung und Derivatisierung werden die Pflanzenproben über Gaschromatographie und daran gekoppelte Massenspektrometrie vermessen. In Abbildung 11 ist die Auswertung der Metabolitprofile beider unabhängiger Experimente mittels Hauptkomponenten-Analyse (*PCA, Principal Component Analysis*) dargestellt.

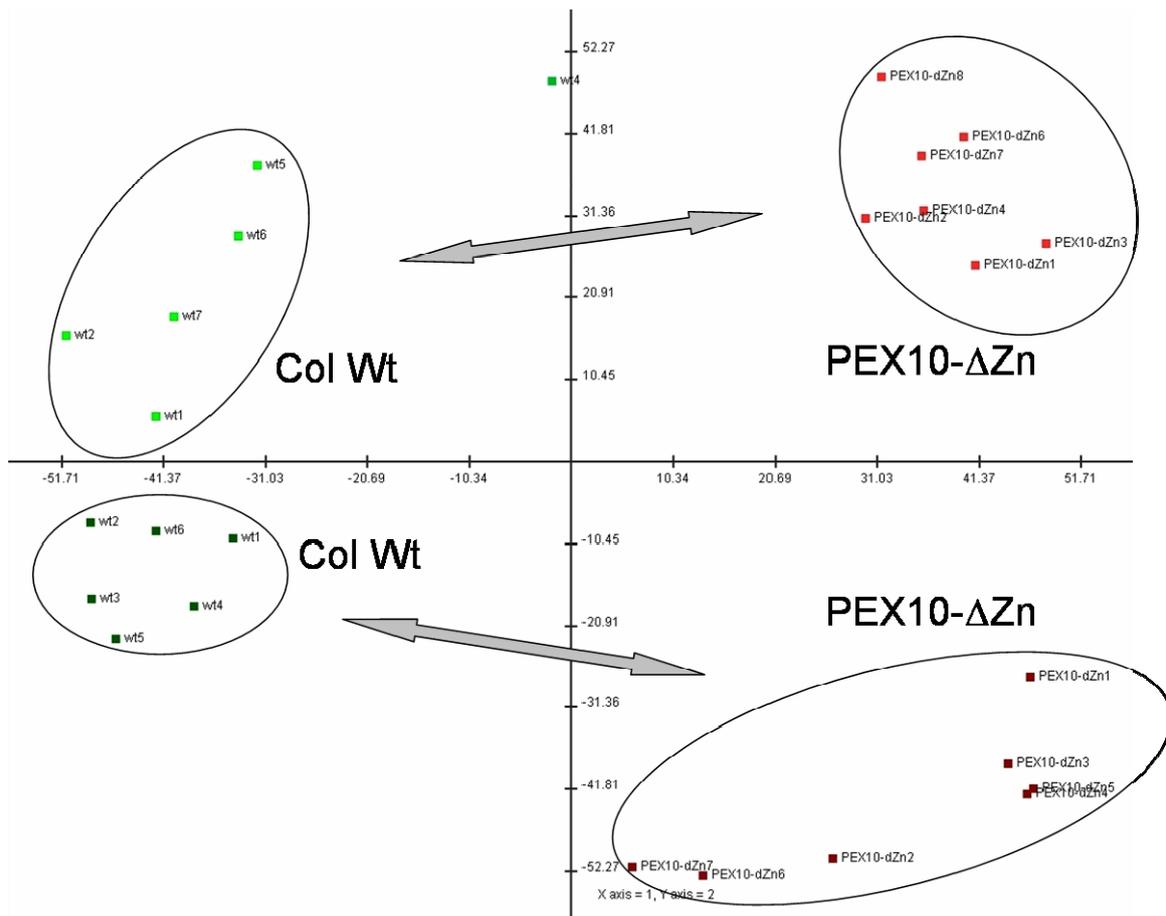


Abbildung 11: Die Überexpression des dysfunktionalen PEX10 im Wildtyphintergrund führt in PEX10-ΔZn1 zu Unterschieden zwischen Mutante und Wildtyp auf Metabolom-Ebene. Hauptkomponenten-Analyse (PCA) zweier unabhängiger Experimente: grüne Punkte = wt (Columbia Wildtyp), hellgrün: 1. Experiment; dunkelgrün: 2. Experiment; rote Punkte = PEX10-ΔZn1-Mutante, hellrot: 1. Experiment; dunkelrot: 2. Experiment. Dargestellt sind die normalisierten Metabolitdaten ($x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$), wobei die ersten beiden Komponenten 46% der Gesamtvarianz wiedergeben. Jeder Punkt repräsentiert 77 quantitativ bestimmte Metaboliten. Aufgearbeitet wurden je 4 biologische Replika zu je 2 technischen Replika, von denen einige während der Aufarbeitung und Derivatisierung verloren gegangen sind und nicht dargestellt werden konnten.

In beiden Experimenten separieren sich die Proben der PEX10-ΔZn1-Mutante von den WT-Proben auf der 1. Hauptkomponente der PCA aufgrund unterschiedlicher Metabolit-Abundanzen. Wildtyp und PEX10-ΔZn1-Mutante unterscheiden sich demnach auf Metabolom-Ebene voneinander.

Entlang der zweiten Hauptkomponente ist zwischen den beiden unabhängigen Experimenten ebenfalls eine Trennung der Probenwolken erkennbar. Das erste Experiment kommt oberhalb, das zweite unterhalb der ersten Hauptkomponente zu

liegen, was auf die leicht variierenden Anzuchtbedingungen in Gewächshaus und Phytokammer zurückführbar ist. Da aber deutlich mehr Varianz innerhalb der jeweiligen Experimente (auf der 1. Komponente der PCA abgebildet) als zwischen den Experimenten auftritt, ist letztere nicht störend für die Beurteilung metabolischer Unterschiede zwischen PEX10- Δ Zn1-Mutante und WT. Die unterschiedlichen Anzuchtbedingungen in Gewächshaus und Phytokammer scheinen auf PEX10- Δ Zn1 jedoch mehr Einfluß zu haben als auf den Wildtyp, da die Punktwolken deutlich stärker voneinander getrennt sind als im Wildtyp.

Die metabolischen Unterschiede zwischen Wildtyp und PEX10- Δ Zn1 lassen sich mittels T-Test und integriertem *Clustering* herausstellen (Abbildung 12). In der Kombination beider Experimente ergeben sich 22 signifikant unterschiedliche Metaboliten zwischen Wildtyp und PEX10- Δ Zn1, deren unterschiedliche Abundanz farblich dargestellt ist. Grün bedeutet eine relative Erniedrigung und rot eine relative Erhöhung der jeweiligen Metabolit-Konzentration der PEX10- Δ Zn1-Mutante gegenüber dem Vergleichspartner im Experiment, hier der Columbia-Wildtyp. Unter den 22 signifikant unterschiedlichen Metaboliten befinden sich auch Intermediate des Glycolat-Zyklus.

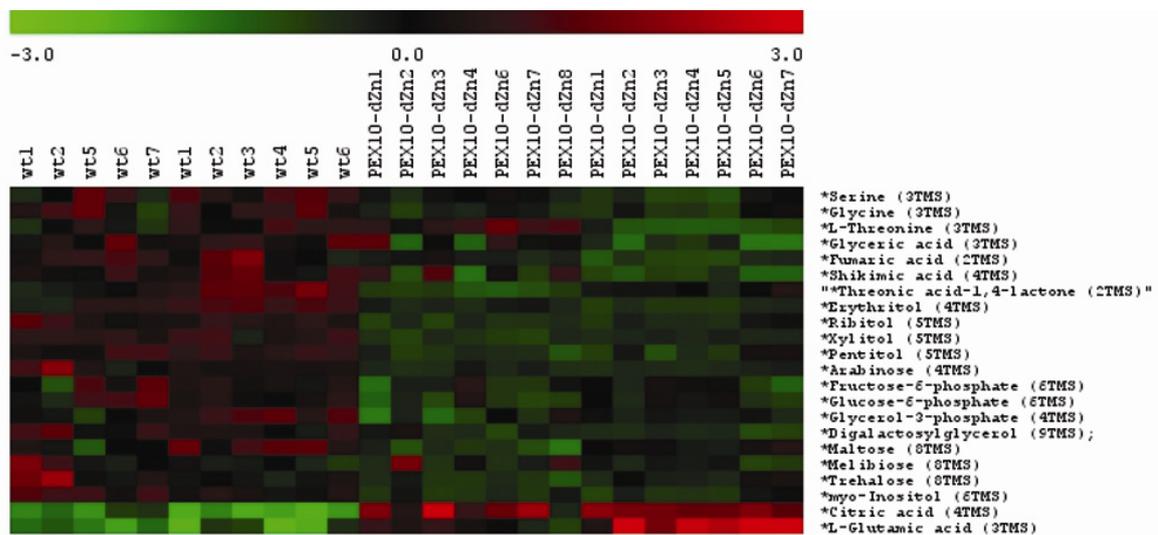


Abbildung 12: Die Metaboliten des Glycolat-Zyklus Glycin, Serin und Glycerat tragen signifikant zum Unterschied zwischen PEX10- Δ Zn1-Mutante und Wildtyp auf Metabolom-Ebene bei. T-Test-*Clustering* zwischen Wildtyp (wt) und PEX10- Δ Zn1 (PEX10-dZn). Farbcodierte Darstellung signifikanter Unterschiede der Metabolit-Konzentrationen. Die rote Farbcodierung repräsentiert erhöhte relative Konzentrationen und grüne Farbcodierung verminderte relative Konzentrationen der jeweiligen Metaboliten zwischen Columbia-Wildtyp und PEX10- Δ Zn1-Mutante. Die relativen Abundanzen der Glycolat-Zyklus Intermediate Glycin, Serin und Glycerat sind in PEX10- Δ Zn1 erniedrigt und die Werte für Glutamat erhöht. Als Signifikanztest wurde der *Welch T-*

Test zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($p=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$. Aufgearbeitet wurden je 4 biologische Replika zu je 2 technischen Replika in zwei unabhängigen Experimenten, von denen einige während der Aufarbeitung und Derivatisierung verloren gegangen sind und nicht dargestellt werden konnten.

In beiden Experimenten sind die relativen Abundanzen für Serin, Glycin und Glycerat in PEX10- Δ Zn1 gegenüber dem Wildtyp reduziert, wohingegen die Werte für Glutamat erhöht sind. In folgender Abbildung sind die relativen Abundanzen dieser Metaboliten graphisch dargestellt.

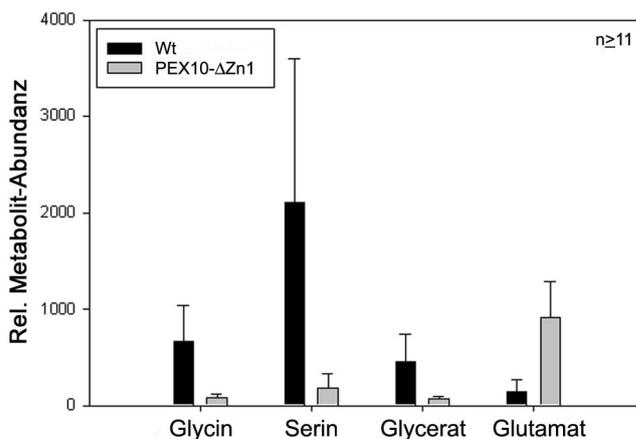


Abbildung 13: Die relative Abundanz der Glycolat-Zyklus-Intermediate Glycin, Serin und Glycerat ist in PEX10- Δ Zn1 hochsignifikant reduziert, Glutamat hochsignifikant erhöht (*, $P < 0,001$). Die Mittelwerte resultieren aus den vermessenen Replika von zwei unabhängigen Experimenten ($n \geq 11$).**

Weitere Unterschiede können für einige organische Säuren (z.B. Fumarat, Shikimat, Citrat), Zucker (Maltose, Trehalose, Arabinose, Myo-Inositol) sowie für Aminosäuren (Alanin, Threonin) registriert werden. Aufgrund der oben beschriebenen Variationen in den Anzuchtbedingungen zwischen den beiden Experimenten zeigen weitere Intermediate wie 2-Ketoglutarat, Hydroxyglutarat, Alanin und Prolin in nur einem Experiment Auffälligkeiten, die im zweiten nicht validiert werden konnten.

Um ein Bild vom Metabolitenfluß innerhalb des Glycolat-Zyklus in der PEX10- Δ Zn1-Mutante zu erhalten, wurden die relativen Abundanzen von Serin und Glycerat zueinander ins Verhältnis gesetzt (s. Abbildung 14), da der eine Metabolit aus dem anderen im Laufe der Photorespiration gebildet wird. Die Ausgangsmetaboliten der Photorespiration 2-Phospho-Glycolat oder Glycolat konnten mit gegebener GC-TOF-MS-Applikation nicht detektiert werden. Glycin wurde nicht mit Glycerat ins Verhältnis gesetzt, da die Unterschiede zwischen beiden Metaboliten weniger deutlich waren, als die zwischen Serin und Glycerat. Glycin ist darüber hinaus eine Quelle für die Produktion von Glutathion (Noctor, Arisi et al., 1999), unterliegt folglich auch noch anderen metabolischen

Wegen und ist dadurch für eine Darstellung des Metabolitenflusses innerhalb des Glycolat-Zyklus weniger geeignet.

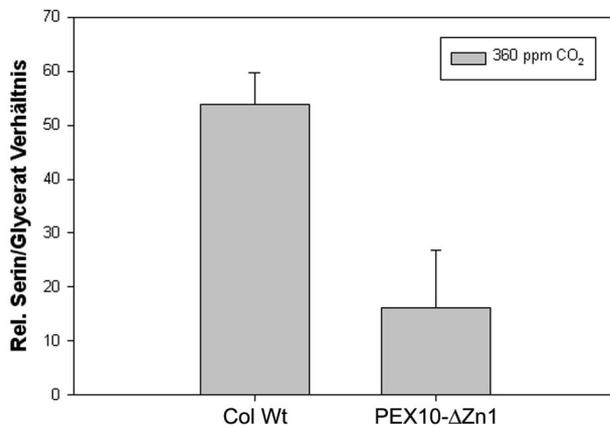


Abbildung 14: Der Metabolitenfluß innerhalb des Glycolat-Zyklus ist in PEX10-ΔZn1 hochsignifikant auf 30% reduziert. Relatives Metaboliten - Verhältnis zwischen Serin und Glycerat in Wildtyp und PEX10-ΔZn1-Mutante zur Demonstration des Metabolitenflusses innerhalb des Glycolat-Zyklus. Da in PEX10-ΔZn1 weniger Serin im Verhältnis zum Glycerat vorliegt als im Wildtyp,

scheint der „Nachschub“ von Serin über den Glycolat-Zyklus gestört zu sein (***, $P < 0,001$).

Im Wildtyp ist die relative Abundanz von Serin ca. 55-mal so hoch wie die von Glycerat. In der PEX10-ΔZn1-Mutante ist lediglich 15-mal so viel Serin wie Glycerat nachweisbar. Diese Reduktion des Serin-Glycerat-Verhältnisses in PEX10-ΔZn1 ist hochsignifikant (***, $P < 0,001$), der Nachschub des Metaboliten Serin über den Glycolat-Zyklus ist demnach gestört. Die Ursache hierfür kann in einem reduzierten Organellenkontakt zwischen Peroxisom und Chloroplast und eventuell auch Mitochondrium liegen, da Serin aus den Mitochondrien in die Peroxisomen transportiert wird.

2.1.3. Der Matrixprotein-Import ist in PEX10-ΔZn-Pflanzen nicht beziehungsweise kaum beeinträchtigt

Die Beteiligung des Zink RING-Fingers von PEX10 am peroxisomalen Matrixprotein-Import wurde an den vier unabhängigen PEX10-ΔZn-Linien (PEX10-ΔZn1 bis PEX10-ΔZn4), der Kreuzung von PEX10-ΔZn1 mit einer Linie, die GFP mit peroxisomalem Targetingsignal überexprimiert (At-GFP-PTS) (Mano, Nakamori et al., 2002), sowie an Linien untersucht, die ein dysfunktionales PEX10 mit N-terminalem T7-tag im At-GFP-PTS-Hintergrund exprimieren.

2.1.3.1. Die Erzeugung der PEX10- Δ Zn-T7-Linien und der Kreuzung zwischen PEX10- Δ Zn1 und At-GFP-PTS-Pflanzen

Das N-terminale Anhängen des 11 Aminosäuren langen T7-tags an das PEX10- Δ Zn-Konstrukt würde eine potentielle Säulenreinigung des PEX10 und eventuell interagierender Peroxin/Proteinpartner, sowie eine Lokalisation des Proteins mittels Immun-Elektronenmikroskopie ermöglichen. Die Überexpression dieses PEX10- Δ Zn-T7-Konstrukts im At-GFP-PTS-Hintergrund erlaubt die Analyse des Matrixprotein-Imports anhand der Fehllokalisierung des GFP-PTS ins Cytoplasma.

Das *Screening* nach Basta-resistenten PEX10- Δ Zn-T7-Primärtransformanden im At-GFP-PTS-Hintergrund wurde durch Ausbringen von ca. 60.000 T₀-Samen auf Basta-getränkter Erde unter Hoch-CO₂-Bedingungen von 1800 ppm durchgeführt, um auch starke Allele zur Entwicklung und Samenreife zu bringen. Aus dem *Screen* gingen 3 Basta-resistente unabhängige Primärtransformanden, die PEX10- Δ Zn-T7 im At-GFP-PTS1-Hintergrund exprimieren und 5 unabhängige Primärtransformanden, die PEX10- Δ Zn-T7 im At-PTS2-GFP-Hintergrund exprimieren, hervor. Im Folgenden wird die Linie, deren PEX10- Δ Zn-T7-Konstrukt in den GFP-PTS1-Hintergrund transformiert wurde, als „PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1“ bezeichnet. Da die At-PTS2-GFP-Ausgangslinie bereits ein kaum detektierbares GFP-Signal aufwies, konnten die Linien, die im At-PTS2-GFP-Hintergrund erzeugt wurden, für die Analyse des Matrixprotein-Imports am Confocalen Laserscanning-Mikroskop nicht verwendet werden und sind in dieser Arbeit nicht weiter beschrieben.

In Abbildung 15 ist der Nachweis der Transkription des überexprimierten PEX10- Δ Zn-T7-Konstruktes in At-GFP-PTS1-Primärtransformanden beispielhaft gezeigt. Die beiden Primer AtPEX10-T7-se2 und AtPEX10-T7-as amplifizieren ein 1214 bp cDNA-Fragment, das spezifisch für das überexprimierte Konstrukt ist, da AtPEX10-T7-se2 auf dem in der Klonierung verwendeten T7-tag bindet, so dass in At-GFP-PTS1-Mutterlinie und Wildtyp keine Amplifikation stattfinden kann.

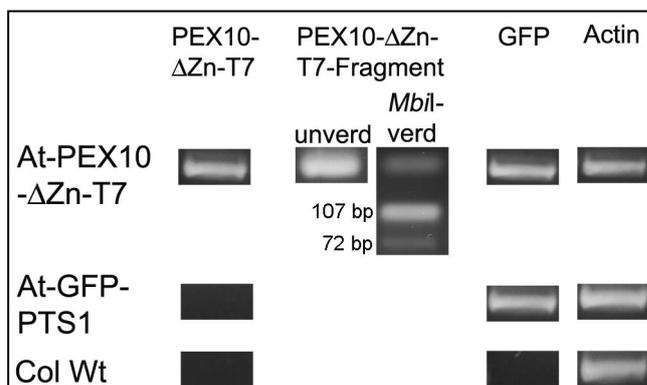


Abbildung 15: Die Transkription des PEX10- Δ Zn-T7-Konstruktes in Primärtransformanden wird mit *Mbi*I-Verdau bestätigt. RT-PCR auf Basta-resistentem Primärtransformanden des *Screens* nach At-PEX10- Δ Zn-T7-Pflanzen im At-GFP-PTS1-Hintergrund. Das überexprimierte Konstrukt PEX10- Δ Zn-T7

wird ausschließlich in Primärtransformanten amplifiziert (1214 bp), weder in At-GFP-PTS1 noch im Columbia Wildtyp, da der im Text erwähnte Sense-Primer spezifisch für den T7-tag ist. Der Verdau des *nested* zum 1214 bp langen PCR-Produkts liegenden 179 bp langen PEX10- Δ Zn-T7 Re-PCR-Fragments (PEX10- Δ Zn-T7-Fragment) liefert eine 107- und eine 72-bp-Bande und beweist die Δ Zn-Mutation im Zink RING-Finger. Der Nachweis des GFP-Transkriptes erfolgt mit im Text erwähnten Primern anhand einer 700 bp Bande. Ein 400 bp Actin-Fragment dient als Kontrolle der Reversen Transkription.

Der anschließende Verdau des mit den Primern PEX10fwd1-Sense und At-PEX10-T7-as erhaltenen 179 bp-PEX10- Δ Zn-T7-Fragments mit *Mbi*I liefert eine 107- und eine 72-bp-Bande, die die Präsenz der Δ Zn-Mutation im Zink RING-Finger belegt. Der Nachweis des GFP-Konstruktes erfolgt mittels der Primer EGFP-for-atg und EGFP-rev-stop und liefert ein 700 bp-Fragment. Als Kontrolle der Reversen Transkription dienen die Actin amplifizierenden Primer Actin-fw und Actin-rev, die auf cDNA-Ebene 400 bp und im Falle einer genomischen Kontamination 500 bp ergeben.

Des Weiteren wird das PEX10- Δ Zn-T7-Konstrukt zurück in die PEX10- Δ Zn1-Linie sowie ein PEX10-wt-T7-Konstrukt in die PEX10-KO-Mutante (Schumann, Wanner et al., 2003) transformiert, um Information über die Lokalisation des Peroxins PEX10 im Δ Zn- bzw. Wildtyp-Kontext in der Immuno-Elektronenmikroskopie zu erhalten. Aus diesen *Screens* sind nach Ausbringen von ebenfalls ca. 60.000 T₀-Samen 5 bzw. 2 unabhängige Linien hervorgegangen, die im Zuge dieser Arbeit jedoch physiologisch nicht mehr näher untersucht wurden und somit auch nicht eingehender beschrieben werden.

Die vier unabhängigen PEX10- Δ Zn-Linien (PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4) wurden mit Pflanzen der At-GFP-PTS1- bzw. At-PTS2-GFP-Linien (Mano, Nakamori et al., 2002) gekreuzt. In dieser Arbeit wurde jedoch nur die Kreuzung zwischen PEX10- Δ Zn1 und At-GFP-PTS1 näher untersucht und ist im Folgenden als PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1 bezeichnet.

Die Kreuzung der beiden Linien und Selbstung der heterozygoten F1-Generation resultiert in einem Sechzehntel der F2-Generation, das sowohl für das überexprimierte GFP als auch für das dysfunktionale, überexprimierte PEX10- Δ Zn-Konstrukt homozygot ist. Die Auswahl der Pflanzen, die zumindest für das dysfunktionale PEX10- Δ Zn-Konstrukt homozygot sind, wurde durch den photorespiratorisch, zwergewüchsigen Phänotyp unter Normalatmosphäre ermöglicht, der bereits von der Ausgangslinie PEX10- Δ Zn1 bekannt war; die Expression des GFP wurde unter dem Confocalen Laserscanning-Mikroskop bestätigt.

In Abbildung 16 ist der Nachweis der erfolgreichen Kreuzung zwischen PEX10- Δ Zn1 und At-GFP-PTS1 dargestellt. Mittels der Primer PEX10fwd1-Sense und PEX10rev2-Antisense wird ein 248 bp langes PEX10- Δ Zn-Konstrukt sowie parallel ein 491 bp genomisches Fragment von PEX10 amplifiziert, die beide das Zink RING-Finger-Motiv beinhalten. Das die Δ Zn-Punktmutationen tragende 248 bp lange cDNA-Fragment lässt sich spezifisch durch den Verdau mit *Mbi*I in ein 176 bp und ein 72 bp langes Fragment spalten.

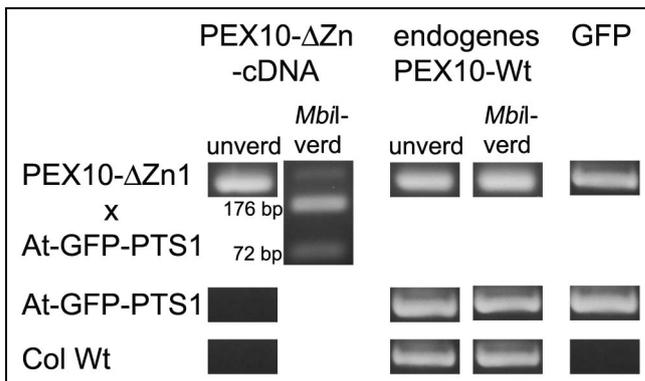


Abbildung 16: Nachweis der erfolgreichen Kreuzung zwischen PEX10- Δ Zn1 und At-GFP-PTS1 auf genomischer Ebene. Das mit im Text erwähnten Primern amplifizierte 248 bp lange PEX10- Δ Zn-cDNA-Fragment lässt sich mit *Mbi*I in eine 176- und eine 72 bp lange Bande verdauen, was die Δ Zn-Mutation im Zink RING-Finger beweist.

Das parallel amplifizierte 491 bp lange endogene PEX10-Wt-Fragment lässt sich aufgrund Fehlens der *Mbi*I-Schnittstelle, die nur für die Δ Zn-Version des RING-Fingers spezifisch ist, nicht verdauen. Der Nachweis des GFP erfolgt mit im Text erwähnten Primern und liefert eine 700 bp lange Bande.

2.1.3.2. Die PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Pflanzen zeigen Wachstumsstörung jedoch keine Chlorose; die Kreuzung aus PEX10- Δ Zn1 und At-GFP-PTS1 bestätigt den bereits bekannten photorespiratorischen Phänotyp

Die T1-Samen der drei unabhängigen Primärtransformanten segregieren auf MS-Agar, dem Basta in einer Konzentration von 30 μ l/l zugegeben wird. Von den 75% Überlebenden Heterozygoten und Homozygoten werden zufällig ausgewählte Keimlinge in Erde pikiert und unter Normalatmosphäre herangezogen. Eine systematische Analyse der Rosettenblätter der PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Pflanzen unter dem Confocalen Laserscanning-Mikroskop zeigte nur in einem Drittel formgestörte Peroxisomen. Diese Pflanzen konnten nach Segregationsanalyse der T2-Samen als die Homozygoten identifiziert werden. Homozygotie für das überexprimierte PEX10- Δ Zn-T7-Konstrukt ist folglich für die Ausprägung eines Phänotyps notwendig.

Abbildung 17 stellt die Phänotypen der Kreuzung PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS sowie der drei PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Pflanzen dar.

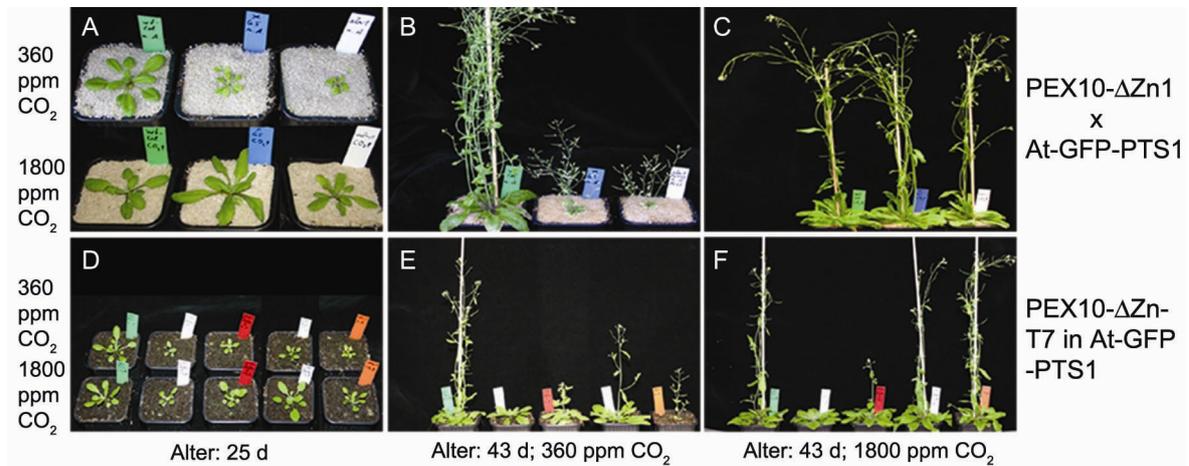


Abbildung 17: Der Phänotyp der Kreuzung zwischen PEX10- Δ Zn1 und At-GFP-PTS1 (A-C) ist chlorotisch und in der Entwicklung retardiert, der Phänotyp der drei unabhängigen Linien PEX10- Δ Zn-T7, die in den At-GFP-PTS1-Hintergrund transformiert wurden (D-F) ist nur retardiert aber nicht chlorotisch. Jedes Bild zeigt links außen die für die Transformation verwendete Mutterlinie At-GFP-PTS1 und rechts außen die PEX10- Δ Zn1-Linie als Kontrolle. In A und D (Pflanzen 25 Tage alt) ist die Normalatmosphären-Bedingung in oberer Reihe, die Hoch-CO₂-Bedingung in unterer Reihe dargestellt. B und E repräsentieren 43 Tage alte Pflanzen unter Normalatmosphäre gewachsen, C und F 43 Tage alte unter Hoch-CO₂ gewachsen. Die Kreuzung zeigt erwartungsgemäß wie die Kontroll- und Ausgangslinie PEX10- Δ Zn1 einen photorespiratorischen Phänotyp unter Normalatmosphäre (A-C) und entwickelt sich unter 1800 ppm CO₂ wie Wildtyp. Von den 3 PEX10- Δ Zn-T7-Linien lässt sich nur Linie 3 durch erhöhte CO₂-Werte retten. Jedoch zeigen alle 3 Linien unter Normalatmosphäre einen von PEX10- Δ Zn1 abweichenden Phänotyp. Sie sind zwar in ihrer Entwicklung stark retardiert, weisen aber keine Chlorose auf.

Die Kreuzung zeigt unter Normalatmosphäre (360 ppm CO₂) den gleichen photorespiratorischen Phänotyp wie die Ausgangslinie PEX10- Δ Zn1, die in Abbildung 17 an jedem rechten Bildrand dargestellt ist, und lässt sich unter Hoch-CO₂ (180 ppm CO₂) zu normalem Wachstum anregen.

Die 3 unabhängigen PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Linien sind zwar ähnlich der PEX10- Δ Zn1-Linie um ca. sechs Wochen in ihrer Entwicklung verzögert, weichen von dieser jedoch darin ab, daß in keiner der drei Linien eine Chlorose festgestellt werden kann (s. Abbildung 17, D-F). Unter Normalatmosphäre wie unter Hoch-CO₂ bleiben die ersten beiden Linien im Wuchs retardiert, lassen sich also nicht durch erhöhte CO₂-Werte retten.

Lediglich die dritte Linie wird wie PEX10- Δ Zn1 von Hoch-CO₂-Bedingungen zu Wildtypwuchs angeregt.

2.1.3.3. Die Photosyntheseleistung ist in PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Pflanzen kaum reduziert

Die Reduktion der Photosyntheseleistung der PEX10- Δ Zn1-Linie unter Normalatmosphäre (360 ppm CO₂) und deren Erholung unter 1800 ppm CO₂ ist eines der Charakteristika des Δ Zn-Phänotyps der PEX10- Δ Zn-Linien und veranlasste zur Annahme, dass die Photorespiration in den PEX10- Δ Zn-Linien gestört sei. Sowohl die Kreuzung PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1 als auch die drei neu transformierten PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Linien sollten auf ihre Photosyntheseleistung hin untersucht werden.

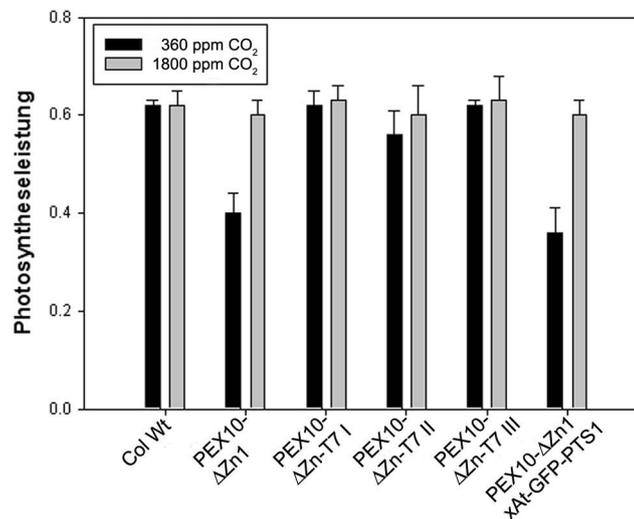


Abbildung 18: Die Photosyntheseleistung der PEX10- Δ Zn-T7-Linien ist kaum beeinträchtigt.

Die Photosyntheseleistung wurde mit portablem Fluorometer PAM 2000 (Waltz-Effeltrich, Deutschland) in drei unabhängigen, 37 Tage alten PEX10- Δ Zn-T7-Linien (I-III), die in den At-GFP-PTS1-Hintergrund transformiert wurden, sowie in der Kreuzung zwischen PEX10- Δ Zn1 (Schumann et al., 2007) und der At-GFP-PTS1-Linie (Mano, Nakamori et al., 2002) gemessen (PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1). Außer der Linie PEX10- Δ Zn-T7 II, die eine leicht reduzierte Photosyntheseleistung unter 360 ppm CO₂ aufweist, zeigt keine der T7-tag Linien die in der Kreuzung (PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1) und in der als Kontrolle dienenden PEX10- Δ Zn1-Pflanze (Kontr.) beobachtete Reduktion der Photosyntheseleistung und deren Erholung unter 1800 ppm CO₂.

Die Kreuzung PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1 zeigt wie die Ausgangslinie PEX10- Δ Zn1 eine reduzierte Leistung des Photosystems II unter Normalatmosphäre und eine Erholung der Photosyntheseleistung unter Hoch-CO₂.

Von den 3 PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Linien zeigt lediglich Linie II eine leichte, nicht signifikante Reduktion ihrer Photosyntheseleistung ($P > 0,05$), wenn auch nicht vergleichbar mit der in Abbildung 18 als Kontrolle dienenden PEX10- Δ Zn1 (Kontr.). Linie I und III verhalten sich wie der Wildtyp und zeigen keinerlei Beeinträchtigung ihres Photosystems II. Die Reduktion der Photosyntheseleistung unter Normalatmosphäre scheint mit der Entwicklung einer Chlorose einherzugehen, die in allen drei PEX10- Δ Zn-T7-Linien nicht beobachtet werden kann.

2.1.3.4. PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1 zeigt keine generelle Importstörung, PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Pflanzen zeigen eine leichte Importstörung bei gestörter Peroxisomenform

Die Teilnahme des PEX10 und seines Zink RING-Fingers am Import peroxisomaler Matrixproteine sollte an der Kreuzung PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1 und an den drei PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Linien am Confocalen Laserscanning-Mikroskop untersucht werden. Eine generelle Beeinträchtigung des Matrixprotein-Imports kann an der Mislokalisierung des GFP-PTS1 von den Peroxisomen ins Cytoplasma fest gemacht werden.

In Abbildung 19 sind die confocalen Aufnahmen aller 3 unabhängigen PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Linien sowie der Kreuzung PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1 im Vergleich mit At-GFP-PTS1 dargestellt. Alle Mutanten zeigen peroxisomale Formstörung, die wie im Falle der Kreuzung PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1 verzweigt sein kann (Abbildung 19, D und F) und die lichtmikroskopischen Befunde der 4 PEX10- Δ Zn-Linien bestätigt (s. Abbildung 9). In Linie PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1 I zeigt sich zusätzlich zur Formabberanz eine kaum wahrnehmbare und in Linie II eine etwas deutlichere Importstörung des GFP-PTS1, ersichtlich an einem grünen cytoplasmatischen Saum (Abbildung 19, G und J). Ein Vergleich dieses cytoplasmatischen Signals mit dem in PEX2- Δ Zn-Pflanzen beobachteten Signal (s. Abbildung 54), relativiert diesen Saum allerdings auf die Aussage, dass der Import des GFP-PTS1 in den PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Linien nur sehr schwach gestört ist. PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1 III zeigt wie die Kreuzung PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1 ausschließlich peroxisomale Formstörung ohne Beeinträchtigung des GFP-PTS1-Imports.

In Abbildung 19 (D-O) sind unterschiedliche Blattyten dargestellt (s. Legende), um zu zeigen, dass peroxisomale Formabberanzen keine Folge von Entwicklungszuständen sind, sondern in allen untersuchten PEX10- Δ Zn-Mutanten in jedem Gewebe auftreten. Die Beobachtung elongierter Peroxisomen in sich im Streckungswachstum befindlichen Pflanzenteilen, wie dem Hypokotylhaken oder der Blattbasis (Mano, Nakamori et al., 2002) der Ausgangslinie At-GFP-PTS1, konnte im Mesophyll der untersuchten Pflanzen nie beobachtet werden. Die At-GFP-PTS1-Linie zeigte in der vorliegenden Untersuchung in allen beobachteten Entwicklungsstadien, Blattyten und -regionen einheitlich runde bis ovale Peroxisomen.

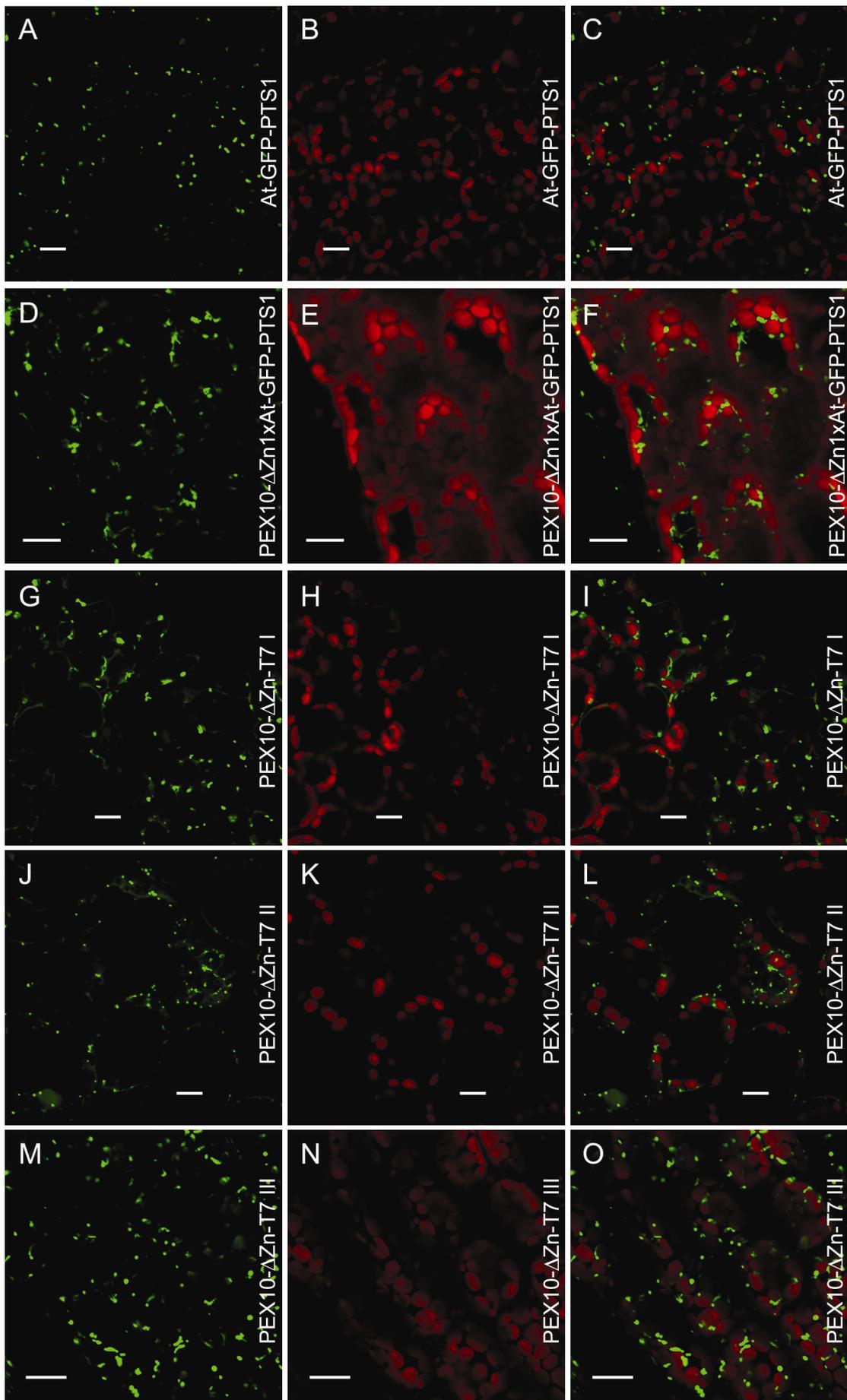


Abbildung 19: Der Import des GFP-PTS1 in die Peroxisomen von PEX10- Δ Zn-Pflanzen ist kaum beeinträchtigt, die Peroxisomenform allerdings deutlich gestört. Confocale Mikroskopaufnahmen zur Untersuchung peroxisomaler Matrixprotein-Importstörung anhand des GFP-PTS1. Die Peroxisomen der At-GFP-PTS1-Linie (A-C) sind rund und einheitlich grün gefärbt. Die Kreuzung PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1 weist eine deutliche Formstörung der Peroxisomen auf, die länglich, wurmförmig sind ohne einhergehende Importstörung des GFP-PTS1 (D-F). Die PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Linien I bis III zeigen ebenfalls formgestörte Peroxisomen (G-O). PEX10- Δ Zn-T7 I (G-I) weist zusätzlich eine schwache Importstörung auf, die in PEX10- Δ Zn-T7 II (J-L) etwas deutlicher ist. PEX10- Δ Zn-T7 III (M-O) zeigt ausschließlich Formabberanz. Die confocalen Aufnahmen entstammen 15 Tage alten, grünen Primärblättern mit Ausnahme A-C, hier wurde ein 15 Tage altes Sekundärblatt dargestellt und D-F, hier wurde ein Kotyledo abgebildet, um die die Unabhängigkeit peroxisomaler Formstörung von Entwicklungsstadien darzustellen. Die At-GFP-PTS1-Linie zeigte in keiner der in den Mutanten dargestellten Blattyten und -regionen die dort beobachteten Formveränderungen der Peroxisomen. Größenmaßstab 10 μ m.

Anhand der CLSM-Aufnahmen ist ersichtlich, dass die Mutation im Zink RING-Finger des Peroxins PEX10 hauptsächlich die Form der Peroxisomen beeinträchtigt. Sie liegen teilweise als längliche, wurmförmige Strukturen im Cytoplasma, wie im Falle der Kreuzung PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1 am besten zu beobachten ist (Abbildung 19, D und F). Der Befund des nicht oder nur geringfügig gestörten Matrixprotein-Imports in PEX10- Δ Zn-Pflanzen wird unabhängig mittels Markerenzym-Assays im Folgenden untersucht.

2.1.3.5. Die Importstörung peroxisomaler Matrixenzyme in PEX10- Δ Zn-Pflanzen läßt sich an Hand ausgewählter Markerenzyme ausschließen

Durch die Katalasefärbung der Peroxisomen für die Licht- und Elektronenmikroskopie-Aufnahmen und die Aufnahmen am CLSM konnte gezeigt werden, dass der Matrixprotein-Import in PEX10- Δ Zn-Peroxisomen, wenn überhaupt, dann nur sehr schwach gestört ist. Dieser Befund soll mittels Messung der Enzymaktivitäten von peroxisomaler Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR) (Tolbert, Yamazaki et al., 1970) im Rohorganellen-Pellet und der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase (SGAT) (Häusler, Bailey et al., 1996) im Protein-Rohextrakt 10 Tage alter Pflanzen überprüft werden. Die Messung der HPR im Rohorganellen-Pellet ist essentiell, da eine cytosolische HPR2 ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Timm, Nunes-Nesi et al., 2008), die allerdings NADPH-abhängig ist und nicht wie die hier vermessene peroxisomale HPR1 NADH-abhängig.

In Abbildung 20 sind die Befunde der Pflanzen PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass sich die Aktivität der SGAT in Wildtyp und PEX10- Δ Zn1 nicht unterscheidet und damit nicht als Erklärung für den erhöhten Glyoxylat-Spiegel in PEX10- Δ Zn1 (Abbildung 20C) herangezogen werden kann. Dieser könnte folglich dadurch erklärt werden, dass das Glyoxylat noch aus der Glyoxysomen-Phase der untersuchten Blatt-Peroxisomen stammt.

Die Aktivität der HPR (Abbildung 20B) ist in den Pflanzen PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 sogar deutlich auf das ca. 2-3-fache erhöht. Auch scheint die glyoxysomale Malatdehydrogenase in ihrer Abundanz in gleichen Frischgewichtsmengen im Protein-Rohextrakt im Vergleich zu Wildtyp und der pBI121-Vektorkontroll-Pflanze (Vk) eher erhöht als erniedrigt, wie der Westernblot in Abbildung 20D zeigt. Anhand der in Abbildung 20 dargestellten Ergebnisse kommt für eine Erklärung des photorespiratorischen, zwerghenwüchsigen Phänotyps der Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 eine Reduktion des Matrixproteinengehalts der Peroxisomen nicht in Frage.

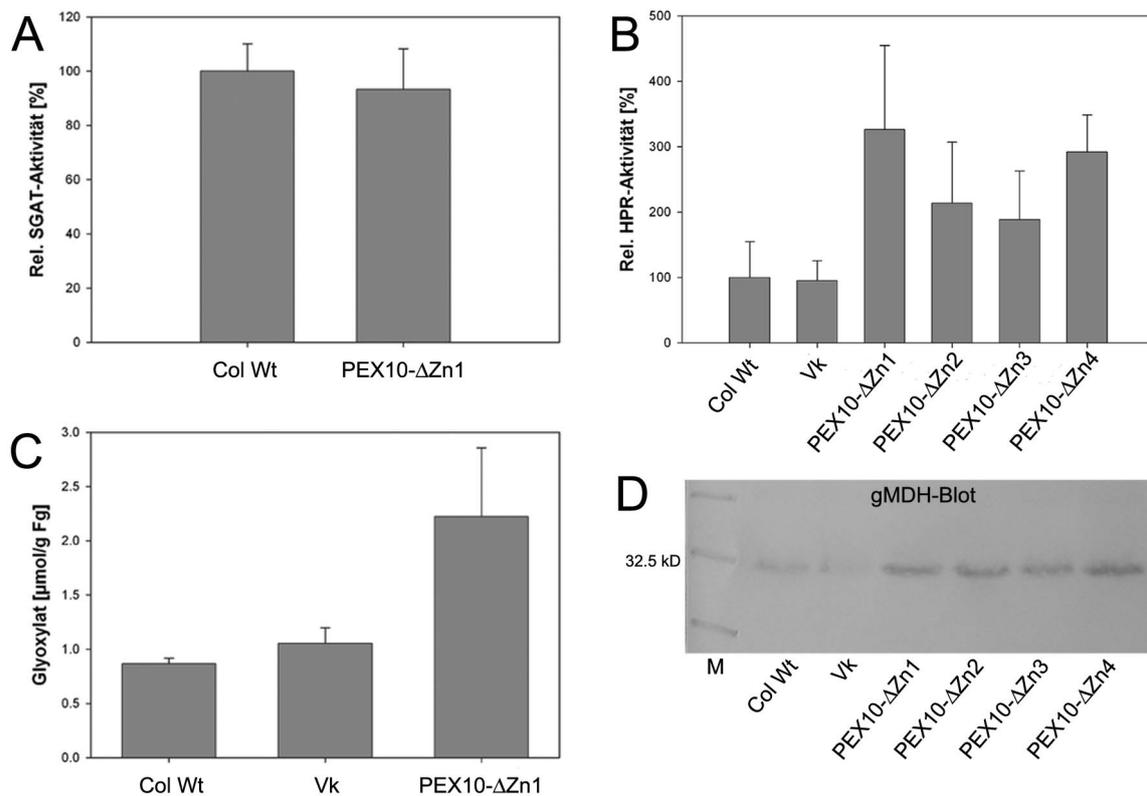


Abbildung 20: Anhand peroxisomaler Markerenzyme ist keine Import-Defizienz der Peroxisomen der Pflanzen PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 festzustellen. Untersuchung peroxisomaler Markerenzyme, um den Matrixprotein-Import in die Peroxisomen der Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 evaluieren zu können. Sowohl die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase (A) als

auch die Hydroxypyruvat-Reduktase (B) zeigen keine Reduktion in ihrer Aktivität, letztere sogar eine Erhöhung in den Mutanten. Auch die Abundanz der glyoxysomalen Malat-Dehydrogenase (ca. 33 kD) auf einem Western-Blot (D) scheint in den Mutanten eher erhöht als erniedrigt. Die auffällige Akkumulation von Glyoxylat in den vier PEX10- Δ Zn-Linien (C) kann somit nicht mit einer reduzierten SGAT-Aktivität erklärt werden. Die Mittelwerte resultieren aus je drei Roh-Extrakten (A und C), die zu je drei technischen Replika vermessen wurden, bzw. aus drei Organellen-Pellets (B), die zu je 10 technischen Replika vermessen wurden. M, Größenstandard (32,5 kD-Bande angegeben). Vk, pBI121-Vektorkontroll-Pflanze.

Die PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Pflanzen wurden ebenfalls einem Hydroxypyruvat-Reduktase Assay am Rohorganellen-Pellet von Rosettenblättern unterzogen. Wie schon die Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 (s. Abbildung 20B) zeigen auch die mit T7-tag versehenen Linien eine leichte, Linie III sogar eine 3-fache Erhöhung der HPR-Aktivität.

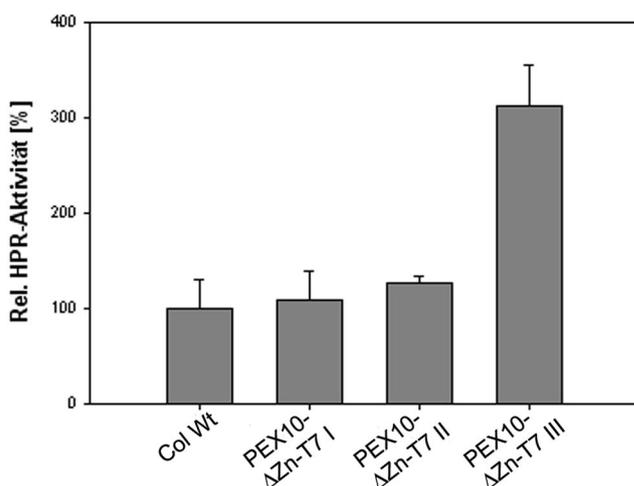


Abbildung 21: Die relative Aktivität der Hydroxypyruvat-Reduktase ist auch in PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Linien eher erhöht als erniedrigt. HPR-Assay an Rosettenblättern 43 Tage alter Pflanzen. Wie schon die Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 zeigen auch die T7-getaggen PEX10- Δ Zn-Pflanzen keine Erniedrigung der HPR-Aktivität. Die Mittelwerte resultieren aus drei Organellen-Pellets, die zu je 10

technischen Replika vermessen wurden.

Eine Beeinträchtigung des peroxisomalen Matrixprotein-Imports kann anhand des HPR-Assays in PEX10- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Linien nicht festgestellt werden. Der Befund schwacher Importstörung des GFP-PTS1 am Confocalen Mikroskop kann demnach als geringfügig bezeichnet werden.

2.1.4. Die Funktion der Glyoxysomen ist in den Pflanzen PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 nicht beeinträchtigt

Es wurde die Beobachtung gemacht, dass die Wachstumsverzögerung der im Licht auf MS-Agar ohne Zuckersatz gekeimten Mutanten PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 erst mit

Beginn der Photoautotrophie am dritten Tag nach der Keimung beginnt. Hieraus wurde geschlossen, dass die Funktion der Glyoxysomen, die für die Fettmobilisierung während der Keimung verantwortlich sind, in PEX10- Δ Zn-Pflanzen nicht beeinträchtigt sei (Uwe Schumann, Dissertation, TU-München, 2003).

Die Funktionalität von Glyoxysomen und der in ihnen stattfindenden β -Oxidation läßt sich mittels Wurzelwachstums-Assay auf IBA-haltigem MS-Agar zeigen. Mittels der Enzyme der β -Oxidation wird IBA (*Indole Butyric Acid*, Indol-Buttersäure) zu Indol-Essigsäure (*Indole Acetic Acid*, kurz IAA), einem Auxin, das das Längenwachstum der Primärwurzel hemmt und die Ausbildung von Seitenwurzeln fördert, metabolisiert. Liegt eine Störung der β -Oxidation vor, findet diese Umwandlung von IBA zu IAA nicht statt, mit der physiologischen Konsequenz, dass IBA keinen Einfluß auf das Wurzelwachstum hat.

Dem MS-Agar wird 10 μ M IBA zugesetzt und die Samen zunächst 5 Tage auf MS-Agar zur Keimung gebracht und anschließend mittels Pinzette auf den IBA-haltigen MS-Agar transferiert. Abbildung 22 zeigt die ermittelten Wurzellängen und eine vergleichbare Hemmung des Primärwurzelwachstums im Wildtyp, der PEX10-wt-Überexpressionslinie (PEX10-wt-over) und den Mutanten PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 (Schumann, Prestele et al., 2007). Die Mutanten pex4 und pex6 (Zolman and Bartel, 2004), die Defekte in der β -Oxidation aufweisen, IBA folglich nicht zu IAA metabolisieren können, dienen als Positivkontrollen in diesem Versuch. Die Beeinträchtigung des Primärwurzelwachstums der vier PEX10- Δ Zn-Linien durch IBA läßt auf eine funktionstüchtige β -Oxidation in den Glyoxysomen schließen und zeigt, daß die Δ Zn-Mutation in PEX10 keine Auswirkung auf ihre Funktionsfähigkeit hat. Der Befund unterstützt somit, daß PEX10 am Protein-Import in die Peroxisomen/Glyoxysomen wahrscheinlich nicht beteiligt ist, und läßt vermuten, dass Organellenkontakt für die Fettmobilisierung weniger kritisch ist als für die Photorespiration.

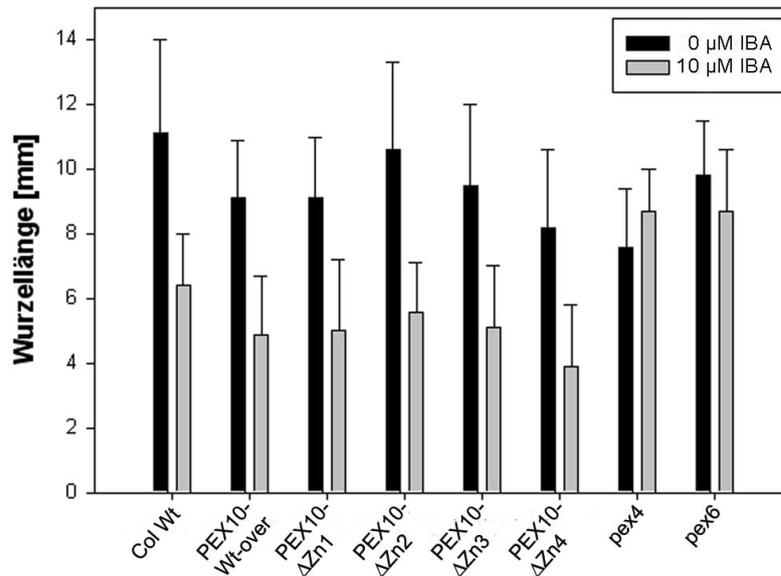


Abbildung 22: Die Funktion der Glyoxysomen ist in den Pflanzen PEX10-ΔZn1 bis PEX10-ΔZn4 nicht beeinträchtigt. Wurzellängen Wachstumsversuch auf Indol-Buttersäure (IBA) -haltigem MS-Agar. Das Primärwurzelwachstum fünf Tage alter Keimlinge läßt sich in den vier Linien PEX10-ΔZn1 bis PEX10-ΔZn4 (Schumann, Prestele et al., 2007) nach Transfer auf IBA-haltiges Medium (10 μM) nach zwei Tagen vergleichbar mit Wildtyp und der PEX10-Wt-Überexpressionslinie (PEX10-Wt-over) signifikant hemmen. Die beiden rechts außen dargestellten Mutanten pex4 und pex6, die als Positivkontrollen in diesem Versuch dienen, lassen sich im Primärwurzelwachstum aufgrund von Defekten in der β-Oxidation nicht hemmen. Die Funktionalität der Glyoxysomen, in denen mittels der Enzyme der β-Oxidation die Umwandlung von Indol-Buttersäure zum Auxin Indol-Essigsäure stattfindet, ist in den vier PEX10-ΔZn-Linien somit nicht beeinträchtigt.

2.1.5. Die Speicherung von Reservestoffen ist in Samen der Linien PEX10-ΔZn1 bis PEX10-ΔZn4 beeinträchtigt

Samen der PEX10-ΔZn-Linien sehen kleiner und „schrumpelig“ aus verglichen mit dem Wildtyp, wenn sie unter Normalatmosphäre heranreifen. Der Grund könnte in Problemen bei der Einlagerung von Reservestoffen, z.B. Fett, liegen (s. Abbildung 23A). Zur Quantifizierung dieses Befundes wurde das Gewicht von je 1000 Samen auf der Feinwaage bestimmt. Unter Normalatmosphäre haben alle vier PEX10-ΔZn-Linien ein um ca. 20% reduziertes Samengewicht, das sich bei Anzucht unter Hoch-CO₂ (1800 ppm CO₂) auf Wildtypwerte normalisiert (Abbildung 23B). Unter 1800 ppm CO₂ findet kaum Photorespiration statt und die Mutanten entwickeln sich wie der Wildtyp. Photorespiratorische Probleme, wie ein gestörter Organellenkontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten, bleiben wirkungslos.

Unter Normalatmosphäre betreibt der Wildtyp Photorespiration, um den Kohlenstoffverlust über die Fixierung von Sauerstoff in Form von 2-Phosphoglycolat auszugleichen. Die Reduktion des Samengewichts in den PEX10-DZn-Mutanten spiegelt die gestörte Photorespiration und die damit verbundene Reduktion der Photosyntheseleistung und Biomasseproduktion wider.

Allerdings scheint auch die pBI121-Vektorkontroll-Pflanze (Vk) unter Normalatmosphäre Schwierigkeiten in der Einlagerung von Reservestoffen in den Samen zu haben, da auch sie unter Normalatmosphäre ein reduziertes Tausendkorngewicht aufweist.

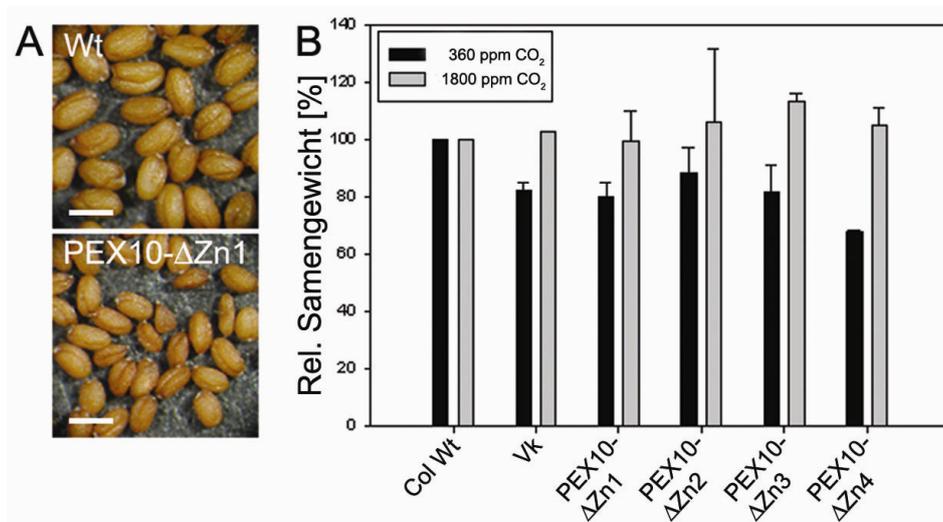


Abbildung 23: Die Einlagerung von Reservestoffen in den Samen ist in den Pflanzen PEX10-ΔZn1 bis PEX10-ΔZn4 reduziert. Lichtmikroskopische Darstellung der Samen von Wildtyp (A) im Vergleich mit PEX10-ΔZn1 (B) von unter Normalatmosphäre (360 ppm CO₂) gezogenen Mutterpflanzen. Die Samen der Mutante sind kleiner und schrumpelig als die des Wildtyps. Maßstab 1 mm. (B) Quantifizierung dieses Befundes durch Bestimmung des Gewichts von je 1000 Samen; die Mittelwerte resultieren aus je drei unabhängigen Auszählungen. Alle vier PEX10-ΔZn-Linien zeigen unter Normalatmosphäre (360 ppm CO₂) ein reduziertes Samengewicht relativ zum Wildtyp, das sich unter Hoch-CO₂-Bedingung normalisiert. (Vk) pBI121-Vektorkontroll-Pflanze, die ebenfalls ein reduziertes Samengewicht unter Normalatmosphäre aufweist.

2.1.6. Die Integrationsstelle der T-DNA in den Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 ist nicht für den photorespiratorischen Phänotyp verantwortlich

2.1.6.1. Die T-DNA Integration in den Pflanzen PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 betrifft kein für die Photorespiration essentielles Gen

Es bestand die Frage, ob die Überexpression des dysfunktionalen PEX10- Δ Zn-Konstrukts oder die Deletion eines für die Photorespiration essentiellen Gens durch das T-DNA-Integrationsereignis den in den vier unabhängigen PEX10- Δ Zn-Linien beobachteten photorespiratorischen Phänotyp auslöst. Zur Beantwortung dieser Frage wurde in Kooperation mit Dr. Henriette O'Geen (University of Pullman, USA) eine *TAIL-PCR* (*Thermal Assymetric Interlaced-PCR*) durchgeführt, die die Integrationsstellen der T-DNA in drei von vier PEX10- Δ Zn-Linien bestimmte. Eine Kombination aus zufällig degenerierten Primern mit einem Satz *nested* Primern, die auf der *right border* des Plasmids pBI121, das für die Transformation der Pflanzen verwendet wurde, binden, amplifiziert die DNA-Bereiche, die die Integrationsstelle der T-DNA flankieren. Die Spezifität der amplifizierten Produkte wird dabei thermisch kontrolliert.

Die Kombination des AD-2 Primers mit dem *right border* Primer RB3 ergab die spezifischen DNA-Banden, die auf Abbildung 24 dargestellt sind. Die Produkte wurden direkt sequenziert und eine anschließende BLAST-Suche identifizierte die an die Vektorsequenz angrenzenden genomischen DNA-Bereiche von *A. thaliana*.

Die T-DNA in der ersten unabhängigen PEX10- Δ Zn-Linie (PEX10- Δ Zn1) ist in das Gen At3g55390, einem Ortholog zu *MtN24* aus *Medicago truncatula*, das eine prokaryotische Bindestelle für Membran-Lipoproteine enthält und während der Entwicklung der Wurzelknöllchen induziert wird, integriert. Eine Funktion dieses Gens in *A. thaliana* konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden (Gamas, Niebel Fde et al., 1996). In PEX10- Δ Zn2 betrifft die Insertion das Gen At5g58050, eine Glycerophosphodiesterase, die im Glycerol-Metabolismus eine Rolle spielt. In PEX10- Δ Zn4 wurde ein Gen mit unbekannter Funktion (At5g24314) durch die T-DNA-Insertion unterbrochen. In Linie PEX10- Δ Zn3 konnten aufgrund einer Tandem-Insertion keine die T-DNA angrenzenden Vektorsequenzen amplifiziert werden.

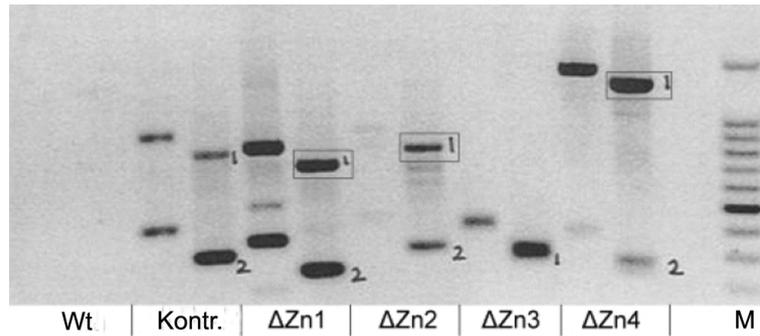


Abbildung 24: TAIL-PCR zur Bestimmung der Integrationsstellen in den vier unabhängigen PEX10- Δ Zn-Linien (Δ Zn1 bis Δ Zn4). Die jeweils rechten Gel-Bahnen stellen die Ergebnisse der *nested* Reaktionen dar, deren obere, erste Banden (mit schwarzem Viereck und „1“ markiert) nach Sequenzierung und BLAST-Suche die im Text erwähnten genomischen Sequenzen von *A. thaliana* darstellen, die die Vektorsequenz flankieren. M, 100 bp DNA-Größenstandard, 500 bp fett dargestellt. Wt (Wildtyp), der aufgrund des Fehlens von pBI121-*border*-Sequenzen keine Banden liefert. Kontr. (pBI121-Vektorkontroll-Pflanze).

2.1.6.2. Bestätigung der T-DNA-Integration mittels PCR

Die durch die TAIL-PCR bestimmten T-DNA-Integrationsstellen galt es unabhängig mittels Standard-PCR zu verifizieren. Primer, die ca. 900 bp *upstream*- bzw. *downstream* der T-DNA-Integrationsstellen binden, werden miteinander (Negativkontrolle) und in jeweiliger Kombination mit dem in der TAIL-PCR verwendeten und auf der pBI121 *right border* bindenden RB3 Primer verwendet. Wie aus Abbildung 25 zu entnehmen, amplifiziert die Primerkombination Δ Zn1-fwd-sense (sp1f) mit RB3 (RB) sowie Δ Zn2-fwd-sense (sp2f) mit RB3 jeweils ein Produkt der Größe 1,1 Kb bzw. 0,8 Kb und die Kombination Δ Zn4-fwd-sense (sp4f) und Δ Zn4-rev-anti (sp4r) mit RB jeweils 0,75 Kb und 1,3 Kb.

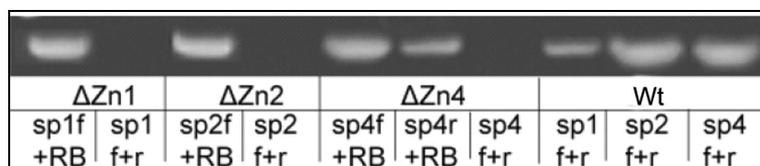


Abbildung 25: Verifikation der T-DNA-Integrationsstellen in 3 von 4 PEX10- Δ Zn-Linien (Δ Zn1, Δ Zn2 und Δ Zn4), anhand der Information bezüglich des Integrationslokus über TAIL-PCR, mittels Standard-PCR. Die spezifischen („sp“) Primer lieferten in Kombination nur im Wildtyp (Wt) ein Amplifikat der erwarteten Länge ohne T-DNA-Integrationsereignis (Positivkontrolle). In Δ Zn1 und Δ Zn2 ergab die Kombination der Primer spf und RB, in Δ Zn4 zusätzlich die Kombination sp4r mit RB ein Amplifikat, was auf ein einziges Integrationsereignis in PEX10- Δ Zn1- und Δ Zn2 und auf ein inverses Tandem in PEX10- Δ Zn4 schließen lässt.

Die Anwesenheit je einer T-DNA in PEX10- Δ Zn1- und 2 und eines inversen Tandems in PEX10- Δ Zn4 an den durch die TAIL-PCR bestimmten Integrationsstellen konnte hiermit bestätigt werden. Die Position der Integration in PEX10- Δ Zn1 ist 336 bp *upstream* des Startcodons des Gens At3g55390 (*MtN24*-Ortholog aus *Medicago truncatula*), die in PEX10- Δ Zn2 140 bp *downstream* des Stopcodons des Gens At5g58050 (Glycerophosphodiesterase) und die in PEX10- Δ Zn4 mitten im dritten Intron des Gens At5g24314 (unbekannte Funktion) 520 bp *downstream* des Startcodons.

Da keines der von der T-DNA-Integration betroffenen Gene eine bekannte Funktion im peroxisomalen Stoffwechsel besitzt, wird der photorespiratorische Phänotyp der vier Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 sehr wahrscheinlich durch die Überexpression des mutierten Peroxins ausgelöst. Die T-DNA-Insertionen liegen zudem ausnahmslos nicht in Exons der betroffenen Gene.

2.1.6.3. Die T-DNA-Integration in den Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 stört die Transkription der betroffenen Gene nicht vollständig

Eine RT-PCR sollte die Frage klären, ob die T-DNA-Integrationen in den Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 zu Deletionen der unterbrochenen Gene führen und diese, entweder alleine oder synergistisch zur Überexpression, zum photorespiratorischen Phänotyp beitragen.

Mittels der Intron-überspannenden Primerpaare dZn1-cDNA-fwd und dZn1-cDNA-rev, dZn2-cDNA-fwd und dZn2-cDNA-rev und dZn4-cDNA-fwd und dZn4-cDNA-rev wurden die in Abbildung 26 dargestellten cDNA-Banden erhalten. In PEX10- Δ Zn1 zeigt das Erscheinen der Bande links außen (167 bp), repräsentativ für das Gen At3g55390 (*MtN24*-Ortholog aus *Medicago truncatula*), dass die Transkription dieses Gens vom T-DNA-Integrationsereignis nicht gemindert wird. Die 108 bp lange cDNA-Bande des Gens At5g58050 (Glycerophosphodiesterase), das von der T-DNA-Integration in PEX10- Δ Zn2 betroffen ist, erscheint nicht (mittlere Gelbahn), ist allerdings in den anderen 3 Proben generell schwach transkribiert. In PEX10- Δ Zn4 führt die T-DNA-Integration analog zu PEX10- Δ Zn1 ebenfalls zu keiner Störung der Transkription des von der Integration betroffenen Gens At5g24314 (150 bp, unbekannt Funktion).

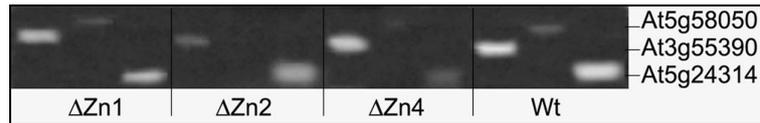


Abbildung 26: Transkriptanalyse der von der T-DNA-Integration betroffenen Gene At3g55390 (Δ Zn1), At5g58050 (Δ Zn2) und At5g24314 (Δ Zn4) in den Linien PEX10- Δ Zn1, - Δ Zn2 und - Δ Zn4. In jedem Ansatz erscheint eine cDNA-Bande in der Größe, die man bei korrekter Transkription oben genannter Gene erwartet, bis auf Probe Δ Zn2. Folglich beeinträchtigt die T-DNA in Δ Zn1 die Transkription des Gens At3g55390 nicht und wird im Zuge der mRNA-Prozessierung in Δ Zn4 aus dem Transkript des Gens At5g24314 vermutlich herausgespliced, da die Integration hier Intron lokalisiert ist. Eine Beeinträchtigung der Transkription der durch die T-DNA-Integration betroffenen Gene ist folglich nicht für den photorespiratorischen Phänotyp in PEX10- Δ Zn1 und - Δ Zn4 verantwortlich. Im Wildtyp (Wt) sind die für die 3 untersuchten Gene zu erwartenden Banden als Kontrolle dargestellt.

Die Lokalisation des T-DNA-Integrationsereignis in PEX10- Δ Zn1 in der 5'-*utr* des Gens MtN24 (336 bp *upstream* des Startcodons), ist die Erklärung für die unbeeinträchtigte Transkription des betroffenen Gens. Das Integrationsereignis in Δ Zn2 läßt die bereits schwache Transkription des Gens Glycerophosphodiesterase (s. Bande auf Höhe At5g58050 in Abbildung 26) völlig zum Erliegen kommen, obwohl die Integration 140 bp *downstream* des Stopcodons liegt. Die T-DNA in Δ Zn4 liegt im dritten Intron des Gens At5g24314 (unbekannte Funktion), wird vermutlich im Zuge des mRNA-Prozessierens heraus *gespliced* und behindert somit dessen Transkription nicht.

Die Störung der Transkription der von der T-DNA-Integration betroffenen Gene ist zumindest in PEX10- Δ Zn1 und PEX10- Δ Zn4 nicht der Auslöser des beobachteten photorespiratorischen Phänotyps. Eine Beeinträchtigung der Photorespiration in PEX10- Δ Zn2 durch die T-DNA-Integration ist trotz der fehlenden Transkription des Gens At5g58050 (Glycerophosphodiesterase) ebenfalls sehr unwahrscheinlich, da die Glycerophosphodiesterase keine bekannte Funktion in der Photorespiration besitzt.

2.1.6.4. Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Deletion der Gene, die T-DNA-Integrationen in den Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 tragen und einem photorespiratorischen Phänotyp

Die T-DNA-Integrationen in den Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 lagen *upstream*, *downstream* oder im Intron der unterbrochenen Gene, betrafen jedoch kein Exon. Ob T-

DNA-Integrationen in Exons dieser Gene einen photorespiratorischen Phänotyp auslösen, sollte über Salk- und Sail-Linien geklärt werden, die T-DNAs in Exons dieser Gene tragen. Die Salk- und Saillinien, die zu Deletionen der Gene führten, die in den Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 von der Integration betroffen sind, wurden auf Phänotyp und Zygotie-Verhältnisse geprüft (Abbildung 27). In den folgenden drei Linien konnten Homozygote ermittelt werden. Die Salk-Linie 534800 und die Sail-Linie 809777 tragen die T-DNA im dritten Exon des Gens At3g55390 (*MtN24*), das in der PEX10- Δ Zn1-Linie von der Insertion betroffen ist. Die Salk-Linie 537722 trägt die T-DNA im fünften Exon des Gens At5g58050 (Glycerophosphodiesterase), was von der Insertion in PEX10- Δ Zn2 betroffen ist. Das Vorhandensein einer zusätzlichen Bande in Sail 809777 (Abbildung 27B, Mitte rechts) spricht für das Vorhandensein eines inversen Tandems. Der Phänotyp dieser homozygoten Salk/Sail-Linien ist unauffällig verglichen mit Columbia Wildtyp (A), woraus geschlossen werden kann, dass T-DNA-Integrationsereignisse in die Gene, die von der T-DNA-Integration in den Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 betroffen sind, keinen photorespiratorischen Phänotyp auslösen und damit keine Rolle innerhalb der Photorespiration spielen.

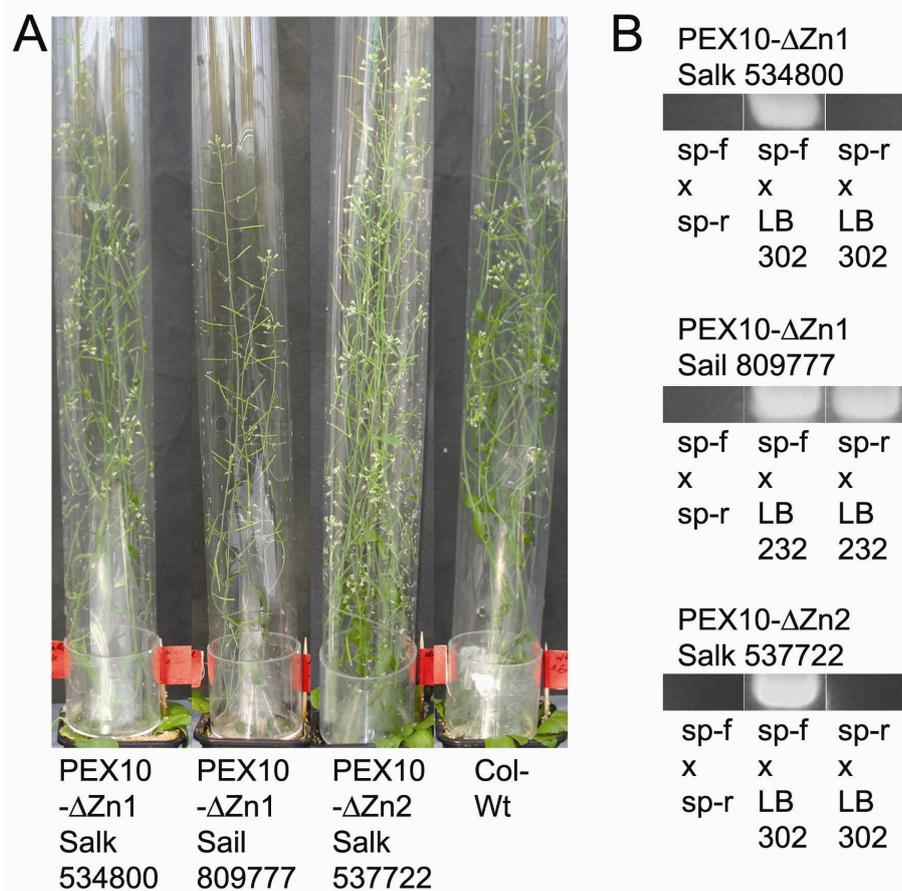


Abbildung 27: Die Integration von T-DNAs in Exonen der Gene, die von der T-DNA-Integration in den Linien PEX10- Δ Zn1 und - Δ Zn2 betroffen sind, lösen in Salk- und Sail-Linien keinen photorespiratorischen Phänotyp aus. Vom Wildtyp sich nicht unterscheidende Phänotypen dreier homozygoter Salk- und Sail-Linien mit T-DNA-Insertionen in Exonen der Gene, die von der T-DNA-Integration in zwei von vier PEX10- Δ Zn-Linien betroffen sind (A) und Genotypisierung auf Homozygotie (B). Sp-f bzw. sp-r sind spezifische Primer, die die T-DNA-Integrationsstelle umspannen und bei Homozygotie keine DNA-Bande ergeben. LB302 bzw. LB232 binden an die *left border* der für die Erzeugung der Salk- bzw. Sail-Linien verwendeten Plasmide pROK2- bzw. pCSA. T-DNA-Integrationen in Exonen der in 2 von 4 PEX10- Δ Zn-Linien betroffenen Gene haben keinen photorespiratorisch auffälligen Phänotyp zur Folge.

2.1.6.5. *Der Phänotyp von Kreuzungen der Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 untereinander weicht von der Parentalgeneration ab*

Um abschließend zu klären, ob der photorespiratorische Phänotyp durch positionelle Effekte in den durch die T-DNA-Insertion betroffenen Genen hervorgerufen wird, sind ausgewählte PEX10- Δ Zn-Linien untereinander gekreuzt worden. Da die T-DNA-Integrationen in den 4 PEX10- Δ Zn-Linien in unterschiedlichen Genen lokalisiert sind, wird die erste Filialgeneration heterozygot bezüglich des Locus der Integration, bleibt aber „homozygot“ für das überexprimierte Konstrukt. Spielt der Locus der T-DNA-Integration für die phänotypische Ausprägung der PEX10- Δ Zn-Linien eine Rolle, sollte die F1-Generation einen von der Parentalgeneration abweichenden Phänotyp zeigen. Abbildung 28 zeigt den Phänotyp der Parentalgenerationen (Δ Zn1 bis 4, C-F), deren F1-Population nach Kreuzung untereinander (G-K), sowie Columbia Wildtyp (A) und die Vektorkontrolle pBI121 (B). Die F1-Generationen weisen von der Parentalgeneration abweichende Phänotypen auf (G-K). Nach Kreuzung der PEX10- Δ Zn1 mit -2 (G), PEX10- Δ Zn2 mit -3 (I) und PEX10- Δ Zn2 mit -4 (J) geht die Chlorose, die beide Elternpflanzen zeigen, verloren, der Zwergenwuchs bleibt. Die Kreuzungen PEX10- Δ Zn1 mit -3 (H) sowie PEX10- Δ Zn3 mit -4 (K) sind zur Keimung nicht mehr fähig.

Die T-DNA-Integrationsstelle spielt demnach nur eine untergeordnete Rolle für die phänotypische Ausprägung der PEX10- Δ Zn-Linien, da zumindest in drei von fünf Kreuzungen der zwergenhafte Wuchs erhalten geblieben ist. Die unterschiedliche Transkriptmenge des endogenen, intakten zum überexprimierten, dysfunktionalen PEX10, die sich aus der Integrationsstelle der T-DNA ergibt, resultiert in den beobachteten phänotypischen Unterschieden zwischen P- und F1-Generation. Dieser Befund spricht dafür, daß *gene dosage* für den Phänotyp der PEX10- Δ Zn-Linien verantwortlich ist.

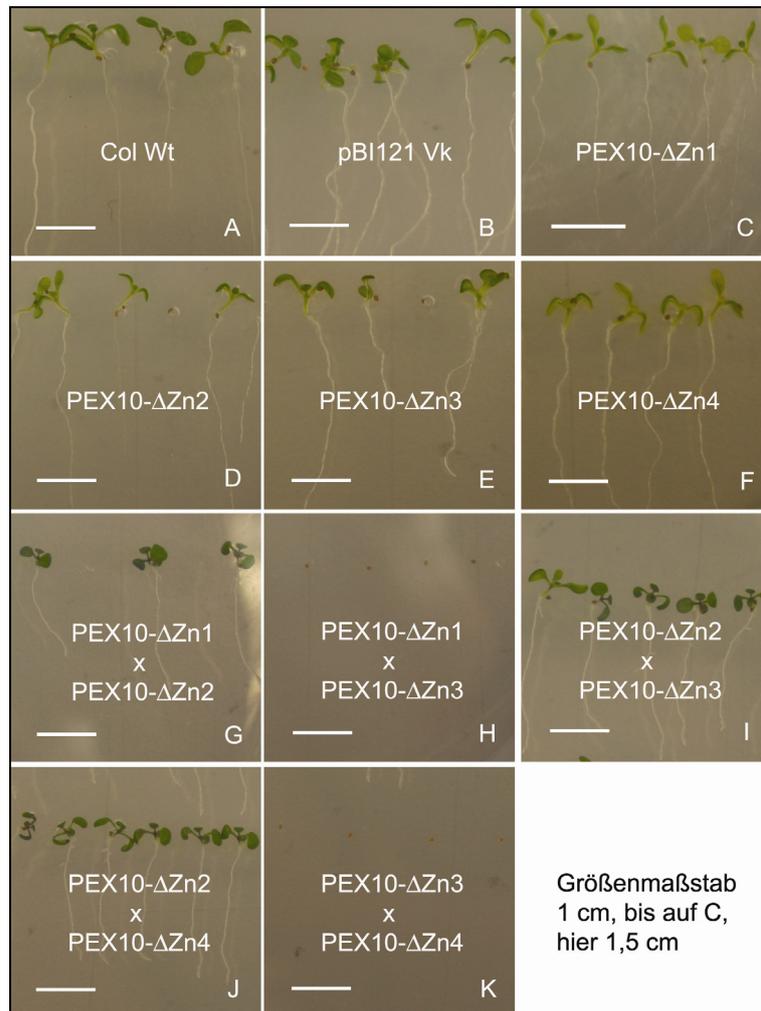


Abbildung 28: Kreuzungen der PEX10- Δ Zn-Linien untereinander (G-K) zeigen einen von der Parentalgeneration (Chlorose und Retardierung, C-F) abweichenden Phänotyp. Vor allem die Chlorose der PEX10- Δ Zn1- und PEX10- Δ Zn4-Pflanzen (C und F) verschwindet nach Kreuzung mit PEX10- Δ Zn2 (G bzw. J). Bei Kreuzung von PEX10- Δ Zn3 mit PEX10- Δ Zn1 bzw. PEX10- Δ Zn4 findet überhaupt keine Keimung mehr statt. Es zeigt sich, dass *gene dosage*, resultierend aus den unterschiedlichen Transkriptionseffizienzen in den DNA-Abschnitten der T-DNA-Integration, maßgeblich für die phänotypische Ausprägung ist.

2.1.7. Oxidativer Streß ist nicht der Auslöser des gestörten Organellenkontaktes zwischen Peroxisom und Chloroplast in PEX10- Δ Zn1

Die PEX10- Δ Zn-Linien zeigen unter Normalatmosphäre einen zwergenwüchsigen, teils chlorotischen Phänotyp, der sehr wahrscheinlich durch den gestörten Organellenkontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten ausgelöst wird. Unter erhöhtem CO₂-Partialdruck der Umgebungsluft entwickeln sich die Pflanzen wie der Wildtyp. Es soll geklärt werden, in wie weit oxidativer Streß und nicht die Überexpression des dysfunktionalen Zink RING-Fingers in PEX10 zum Kontaktverlust der Organellen führen würde. Hierfür sind zwei Vorgehensweisen herangezogen worden.

- Eine Metabolom-Analyse von PEX10- Δ Zn1-Pflanzen, die unter Hoch-CO₂ aufgezogen wurden und keine Stresssymptome wie Wachstumsstörung und Chlorose zeigen. Ein gestörter Organellenkontakt würde sich in der Abundanz der Metaboliten des Glycolat-Zyklus manifestieren.
- Eine mikroskopische Untersuchung des Organellenkontaktes in der Photorespirationsmutante *sat*, mit einer Punktmutation im Gen der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase; Homozygote *sat*-Mutanten sind konditional letal d.h. nur unter Hoch-CO₂ zur Entwicklung fähig, da die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase nicht redundant ist und liefern einen photorespiratorischen Phänotyp, der nicht durch ein dysfunktionales PEX10 ausgelöst wird.

2.1.7.1. Eine Metabolom-Analyse unter Hoch-CO₂ zeigt die gleichen Metaboliten-Unterschiede zwischen PEX10- Δ Zn1- und Wildtyp-Pflanzen wie unter Normalatmosphäre

Ist die Verteilung der Glycolat-Zyklus-Intermediate in einer PEX10- Δ Zn1-Mutante, die unter Hoch-CO₂ angezogen wurde, mit dem Wildtyp vergleichbar, dann besteht Organellenkontakt zwischen Peroxisom und Chloroplast. Unterscheiden sich die Metabolit-Profile von PEX10- Δ Zn1 und Wildtyp unter Hoch-CO₂-Bedingungen, dann ist auch unter Bedingungen, in denen die PEX10- Δ Zn1-Mutante keinen oxidativen Streß erleidet, der Organellenkontakt gestört. Oxidativer Streß könnte somit als Grund für den gestörten Organellenkontakt unter Normalatmosphäre ausgeschlossen werden.

Pflanzen des Columbia Wildtyps und der PEX10- Δ Zn1-Mutante wurden 14 Tage unter 1800 ppm CO₂-Partialdruck in Phytokammern (Convicon, Kanada) angezogen. Die Probennahme erfolgte noch innerhalb der Phytokammer. Nach Aufarbeitung und

Derivatisierung wurden die Proben in Kooperation mit der AG Weckwerth (MPI, Golm) über GC-MS-TOF vermessen. In der Hauptkomponenten-Analyse (PCA) der Metabolitprofile ist ersichtlich, dass sich Wildtyp und PEX10- Δ Zn1-Mutante auch unter 1800 ppm CO₂ auf Metabolomebene unterscheiden (s. Abbildung 29). Es findet eine klare Separierung der Wildtypproben von den PEX10- Δ Zn1-Proben entlang der ersten Hauptkomponente, die 45,8% der Gesamtvarianz erklärt, statt.

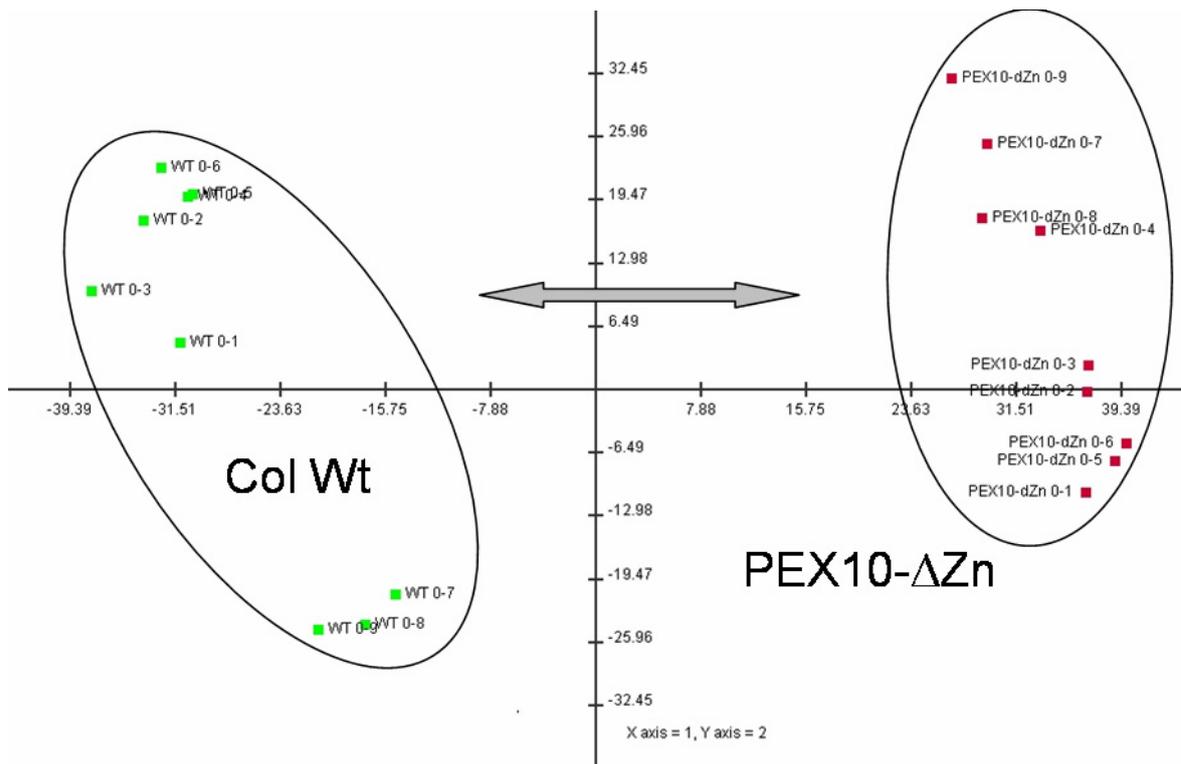


Abbildung 29: PEX10- Δ Zn1-Mutante und Wildtyp unterscheiden sich auch unter Hoch-CO₂ auf Metabolomebene. Hauptkomponenten-Analyse (PCA) unter Hoch-CO₂ angezogener 14 Tage alter Pflanzen des Wildtyps und der PEX10- Δ Zn1-Mutante. Auch unter diesen Bedingungen separieren sich die Punktwolken deutlich voneinander. Dargestellt sind die normalisierten Metabolitdaten ($x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$), wobei die erste Komponente 45,8% der Gesamtvarianz wiedergibt. Jeder Punkt repräsentiert 55 quantitativ bestimmte Metaboliten. Jeweils drei biologische Replika zu je drei technischen Replika wurden vermessen.

Obwohl die PEX10- Δ Zn1-Mutante keinen photorespiratorischen, chlorotischen Phänotyp zeigt, ergibt sich ein ähnliches Bild in der PCA wie bei Anzucht der Pflanzen unter Normalatmosphäre (vergl. Abbildung 11). Folglich unterscheiden sich Wildtyp und PEX10- Δ Zn1 auch unter Hoch-CO₂ auf Metabolom-Ebene deutlich voneinander. Nach T-Test mit integriertem *Clustering* zeigt sich, daß neben organischen Säuren und einigen Zuckern

auch die Intermediate des Glycolat-Zyklus (Serin, Glycin, Glycerat, 2-Ketoglutarat) in PEX10- Δ Zn1 signifikant gegenüber dem Wildtyp reduziert sind (s. Abbildung 30).

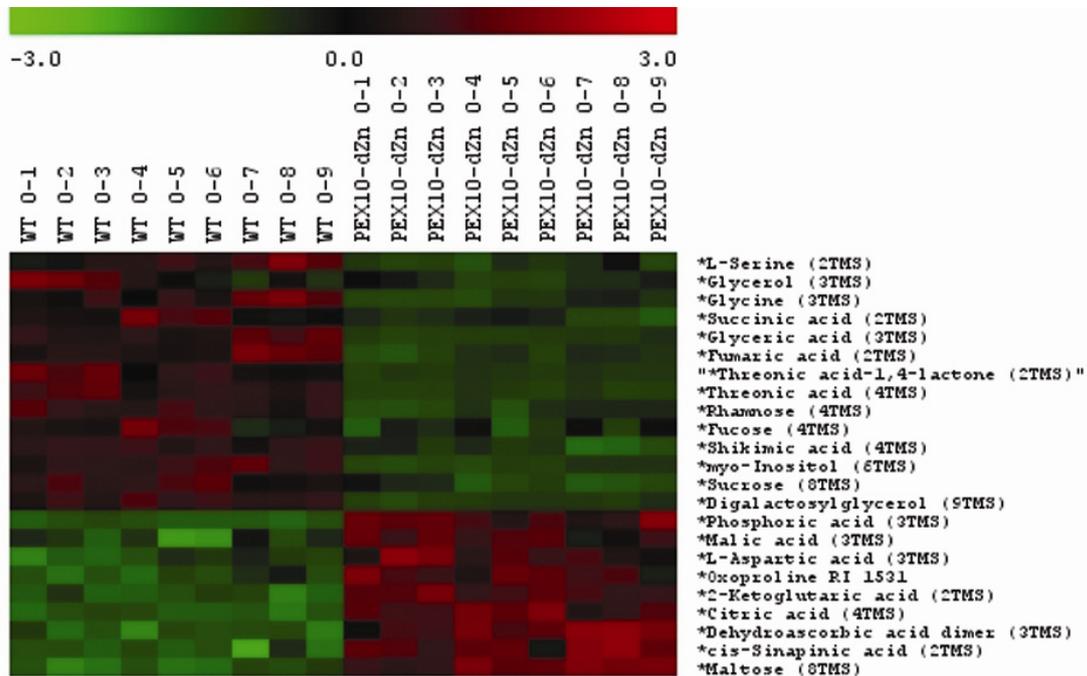


Abbildung 30: Unter Hoch-CO₂ angezogene Pflanzen der PEX10- Δ Zn1-Mutante haben nach wie vor reduzierte Glycolat-Zyklus Intermediat-Spiegel. T-Test-Clustering des Wildtyps und der PEX10- Δ Zn1-Mutante. Farbcodierte Darstellung signifikanter Unterschiede der Metabolit-Konzentrationen unter Hoch-CO₂-Bedingungen. Die rote Farbcodierung repräsentiert erhöhte Konzentrationen und grüne Farbcodierung verminderte Konzentrationen der jeweiligen Metaboliten. Glycin, Serin und Glycerat tragen signifikant zum Unterschied zwischen Wildtyp und PEX10- Δ Zn-Mutante bei. Als Signifikanztest wurde der *Welch T-Test* zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($p=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$ Jeweils drei biologische Replika zu je drei technischen Replika wurden vermessen.

Abbildung 31 vergleicht die relativen Abundanzen der Glycolat-Zyklus-Intermediate Glycin, Serin sowie Glycerat von Wildtyp und PEX10- Δ Zn1-Mutante.

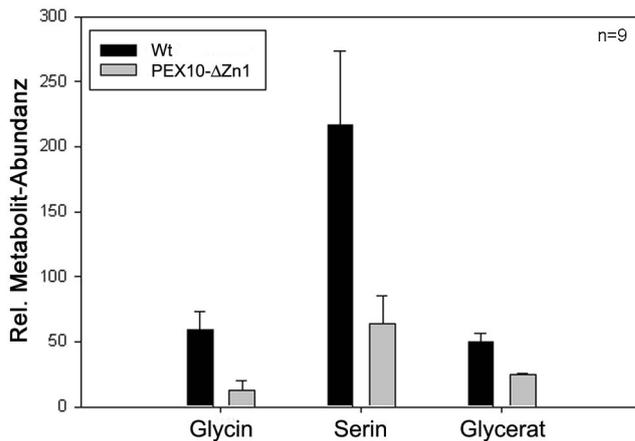


Abbildung 31: Die Intermediate des Glycolat-Zyklus Glycin, Serin und Glycerat sind in PEX10-ΔZn1 auch unter 1800 ppm CO₂ hochsignifikant gegenüber dem Wildtyp erniedrigt (*, P<0,001). Die Mittelwerte resultieren aus jeweils 3 biologischen Replika zu je 3 technischen Replika.**

Die Metaboliten des Glycolat-Zyklus Glycin, Serin und Glycerat bleiben auch unter Bedingungen, in denen die PEX10-ΔZn1-Mutante keinen oxidativen Streß erleidet, gegenüber dem Wildtyp in ihren Abundanzen signifikant erniedrigt (***, P<0,001). Zur Veranschaulichung des Metabolitenflusses innerhalb des Glycolat-Zyklus ist auch hier das Serin/Glycerat-Verhältnis in Abbildung 32 dargestellt.

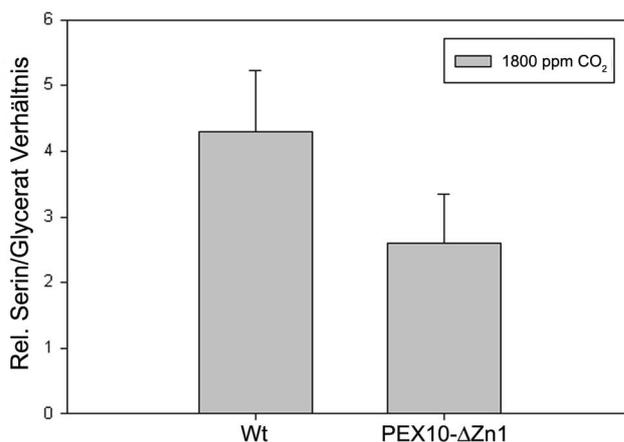


Abbildung 32: Der Metabolitenfluß innerhalb des Glycolat-Zyklus ist auch unter Hoch-CO₂ in PEX10-ΔZn1 signifikant gestört. Relatives Metaboliten-Verhältnis zwischen Serin und Glycerat in Wildtyp und PEX10-ΔZn1-Mutante zur Demonstration des Metabolitenflusses innerhalb des Glycolat-Zyklus unter 1800 ppm CO₂. Auch unter diesen Bedingungen ist in

PEX10-ΔZn1 der „Nachschub“ von Serin über den Glycolat-Zyklus gestört, wenn auch nicht mehr hochsignifikant (**, P< 0,01).

Auf die Reduktion des Serin/Glycerat-Verhältnisses in PEX10-ΔZn1 hat der im Vergleich zum Wildtyp niedrigere Serin-Spiegel mehr Einfluß als ein relativ erhöhter Glycerat-Spiegel. Glycerat scheint auch unter Hoch-CO₂ in PEX10-ΔZn1 weniger effizient aus Serin gebildet werden zu können als im Wildtyp, was mit verringertem Organellenkontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten und evtl. auch mit Mitochondrien erklärt werden kann, denn Serin wird in den Mitochondrien gebildet und von dort weiter in die Peroxisomen transportiert.

Auch ohne oxidativen Streß scheint der Organellenkontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten (evtl. auch Mitochondrien) in PEX10- Δ Zn1-Pflanzen reduziert zu sein, so daß oxidativer Streß nur unwahrscheinlich als Erklärung des Organellen-Kontaktverlusts in Frage kommt.

2.1.7.2. *Metabolitenstau innerhalb des Glycolat-Zyklus kann Form und Kontakt von Peroxisomen mit Chloroplasten verändern*

Die Aminotransferase-Mutante *sat* (Somerville and Ogren, 1980) dient ebenfalls der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen oxidativem Streß und Organellenkontakt. Die *sat*-Mutante trägt eine Punktmutation im Gen der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase (SGAT), die den Austausch von Prolin 251 in Leucin bewirkt und zum Funktionsverlust des Enzyms führt (Liepman and Olsen, 2001). Die SGAT katalysiert die Transaminierung von Glyoxylat und Serin innerhalb der Peroxisomen unter Produktion von Glycin und Hydroxypyruvat, das weiter im Glycolat-Zyklus zu Glycerat reduziert wird. Die Folge des Funktionsverlusts der SGAT ist, daß homozygote *sat*-Pflanzen unter Normalatmosphäre ihre Entwicklung nach Erreichen des Zwei-Kotyledonen-Stadiums einstellen und absterben, da die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase nicht redundant ist wie die beiden Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferasen. Unter Hoch-CO₂ entwickelt sich die *sat*-Mutante vergleichbar dem Wildtyp, ist also eine klassische Photorespirationsmutante und bietet unter Normalatmosphäre einen photorespiratorischen Phänotyp, der nicht durch einen dysfunktionalen Zink RING-Finger in PEX10 ausgelöst wird. Somit kann unabhängig von PEX10 der Einfluß von oxidativem Streß auf den Kontakt der Organellen der Photorespiration untersucht werden.

In Abbildung 33 ist der Phänotyp einer homozygoten *sat*-Mutante im Vergleich zu einer als Wildtyp dienenden *At-GFP-PTS1*-Pflanze (Mano, Nakamori et al., 2002) unter Normalatmosphäre (360 ppm CO₂) bzw. Hoch-CO₂ (1800 ppm CO₂) dargestellt.

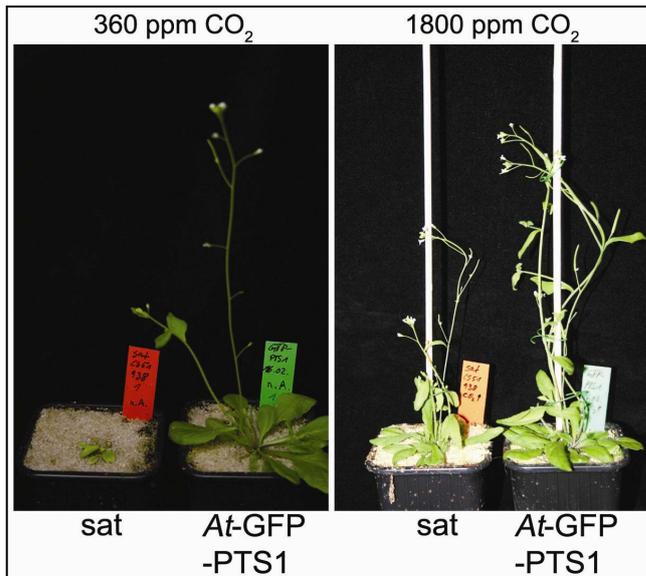


Abbildung 33: Darstellung des Phänotyps der sat-Aminotransferase-Mutante im Vergleich zum Wildtyp (hier At-GFP-PTS1) unter Normalatmosphäre (360 ppm CO₂) und Hoch-CO₂ (1800 ppm CO₂). Die homozygote sat-Mutante ist konditional letal, d.h. nur unter 1800 ppm CO₂ lebensfähig. Die unter 360 ppm CO₂ abgebildete sat-Pflanze wurde unter Hoch-CO₂ angezogen und 72 h in Normalatmosphäre transferiert, um die Ausbildung des photorespiratorischen Phänotyps zu demonstrieren. Diese

Pflanze war weitere drei Tage nach abgebildeter Aufnahme tot.

Die in Abbildung 33 dargestellte sat-Mutante wurde 11 Tage unter Hoch-CO₂ angezogen und dann 72 h in Normalatmosphäre transferiert, um die Ausbildung des photorespiratorischen Phänotyps und das Einstellen der Entwicklung darstellen zu können. Die Zygotieverhältnisse konnten somit ebenfalls geklärt und die sat-Mutante als Homozygote identifiziert werden. Die Auswirkungen der Mutation in der sat-Mutante unter Normalatmosphäre konnten somit an Blattmaterial der in Abbildung 33 dargestellten Pflanzen mikroskopisch untersucht werden.

Am Lichtmikroskop sollte geklärt werden, ob durch die Mutation in der SGAT eine Formveränderung der Peroxisomen zu beobachten ist. Auf den lichtmikroskopischen Bildern in Abbildung 34 sind Semidünnschnitte der 14 Tage alten Rosettenblätter der Pflanzen des Wildtyps und der sat-Mutante aus Abbildung 33 abgebildet.

Auf den Bildern unter Normalatmosphäre (360 ppm CO₂) scheinen die Peroxisomen der sat-Mutante leicht in ihrer Form verändert; einige sind teils bis zu 5 µm elongiert (unterer, rechter Bildbereich in C). Dies ist unter Hoch-CO₂ nicht mehr der Fall ist; hier sehen die Peroxisomen lediglich etwas „aufgebläht“ aus (D).

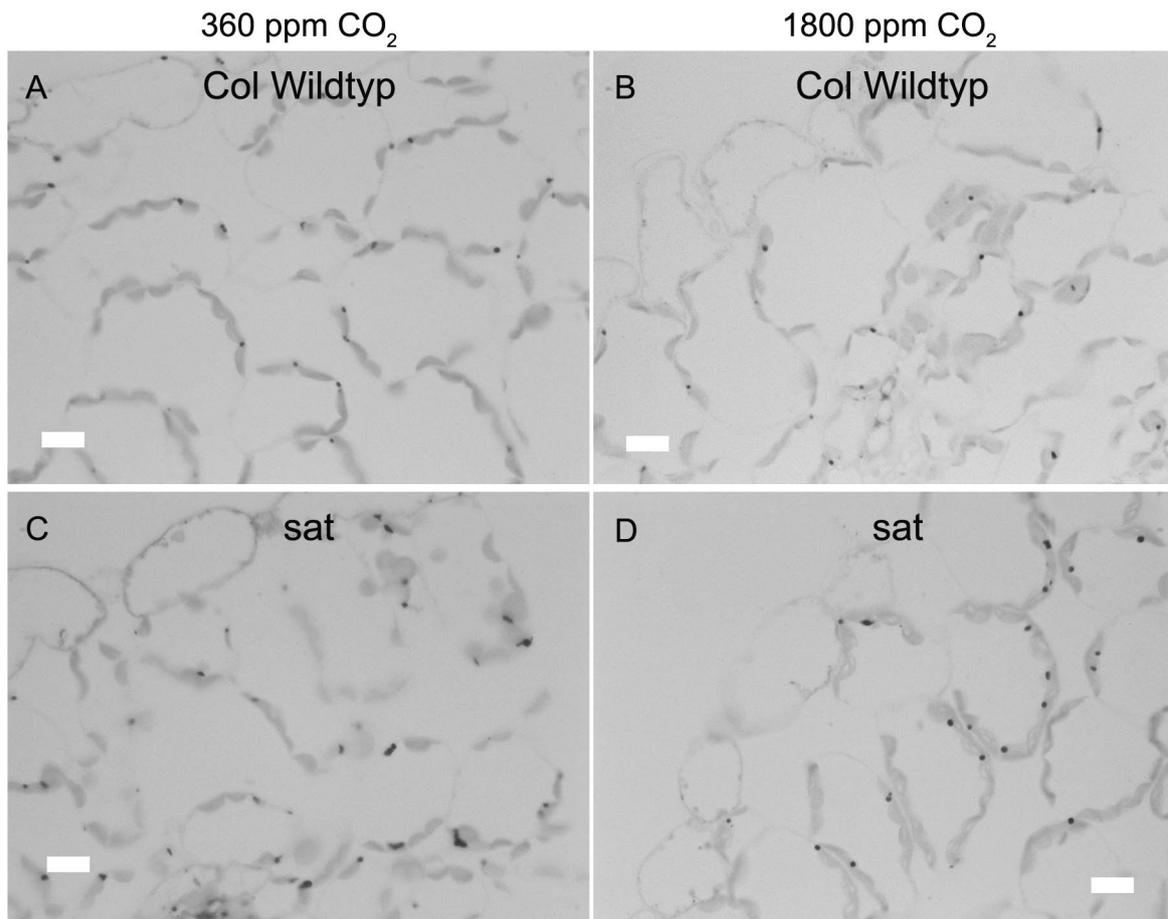


Abbildung 34: Die Aminotransferase-Mutante sat zeigt nach 72 h unter Normalatmosphäre leicht formgestörte Peroxisomen. Semidünnschnitte 14 Tage alter Rosettenblätter von Pflanzen des Wildtyps und der sat-Mutante nach 72 h unter Normalatmosphäre (A, C) so wie unter Dauer-Hoch-CO₂ (B, D). Auffällig ist in C die leicht veränderte Form der Peroxisomen der sat-Mutante, sie erscheinen unter Normalatmosphäre teils bis 5 µm elongiert, was unter Hoch-CO₂ nicht mehr der Fall ist. Hier sehen die Peroxisomen der Mutante leicht „aufgebläht“ aus. Statistik s. Text. Maßstab, 10 µm.

Dieser Befund ist in Abbildung 35 vergleichend dargestellt. Die aufgetragene relative Peroxisomenfläche wurde mit dem Programm ImageJ auf je acht lichtmikroskopischen Bildern ermittelt. Nach Anlegen eines „threshold“ (zwischen 55 und 138 rel. Einheiten), der ausschließlich Peroxisomen-Farbsignal zur Detektion freigibt, wird die Fläche des Farbsignals gegen die Anzahl der Farbpunkte (Peroxisomen) berechnet.

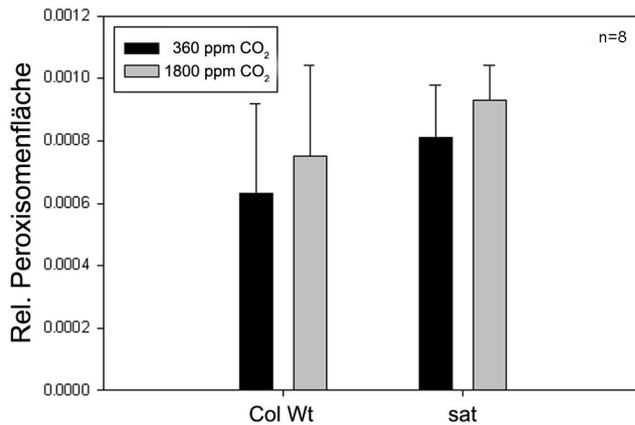


Abbildung 35: Die Größe der Peroxisomen ist in der sat-Mutante nicht signifikant vom Wildtyp verschieden. Ermittlung der relativen Peroxisomenfläche mittels ImageJ auf je 8 lichtmikroskopischen Bildern des Wildtyps und der sat-Mutante nach 72 h unter Normalatmosphäre bzw. Dauer-Hoch-CO₂. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und sat-

Mutante festzustellen, lediglich eine generelle, leichte Erhöhung der Peroxisomengröße unter Hoch-CO₂ (Statistik s. Text).

Aus Abbildung 35 geht hervor, dass die relative Peroxisomenfläche in der sat-Mutante nach 72 h unter Normalatmosphäre zwar um 28% erhöht ist, mit $6,2 \cdot 10^{-4} \pm 1,3 \cdot 10^{-4}$ rel. Einheiten im Wildtyp zu $8,1 \cdot 10^{-4} \pm 1,7 \cdot 10^{-4}$ rel. Einheiten in der sat-Mutante, jedoch nicht signifikant ($P > 0,05$). Auch beim Vergleich der rel. Peroxisomenfläche von Wildtyp und sat-Mutante unter Hoch-CO₂ ist keine Signifikanz festzustellen ($P > 0,05$), auch wenn die sat um ca. 24% größere Peroxisomen besitzt als der Wildtyp.

CO₂ scheint sowohl im Wildtyp als auch in der sat-Mutante generell die Peroxisomengröße leicht zu erhöhen (19% im Wildtyp, 16% in sat), jedoch nicht signifikant ($P > 0,05$).

Die Ermittlung der durchschnittlichen Peroxisomenlänge der sat-Mutante nach 72 h unter Normalatmosphäre zu $2,4 \pm 1,3 \mu\text{m}$ und des Wildtyps zu $1,16 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ergab einen hochsignifikanten Unterschied ($P < 0,001$, $n=25$). Unter Hoch-CO₂ (1800 ppm CO₂) sind beide Peroxisomen-Populationen einheitlich rund bis oval, die sat-Mutante hat allerdings mit $1,7 \pm 0,35 \mu\text{m}$ einen schwach signifikant größeren Durchmesser als der Wildtyp mit $1,44 \pm 0,31 \mu\text{m}$ ($P < 0,05$, $n=25$). Die Verlängerung der Peroxisomen nach 72 h unter Normalatmosphäre und die leichte Vergrößerung des Peroxisomendurchmessers unter Dauer-Hoch-CO₂ sind der Grund für die in Abbildung 35 dargestellte Beobachtung, daß die relative Peroxisomenfläche der sat-Mutante verglichen mit dem Wildtyp leicht erhöht ist.

Eine anschließende Analyse von Ultradünnschnitten am TEM ermöglichte eine genaue Bestimmung der Peroxisomenform und des Kontakts von Peroxisomen zu Chloroplasten. Auf je 10 ausgewerteten TEM-Aufnahmen waren im Wildtyp nach 72 h unter Normalatmosphäre $90 \pm 32\%$ und unter Dauer-Hoch-CO₂ $92 \pm 29\%$ der Peroxisomen in Kontakt mit einem Chloroplasten. In der sat-Mutante waren es nach 72 h unter

Normalatmosphäre nur noch $46 \pm 52\%$ (*, $P < 0,05$, $n=10$) und damit schwach signifikant weniger als im Wildtyp (Abbildung 36C). Unter Dauer-Hoch- CO_2 waren es $64 \pm 50\%$ und damit nicht signifikant vom Wildtyp verschieden.

Die TEM-Aufnahmen in Abbildung 36 repräsentieren die geschilderte Statistik bezüglich Organellen-Kontakt und Peroxisomenform.

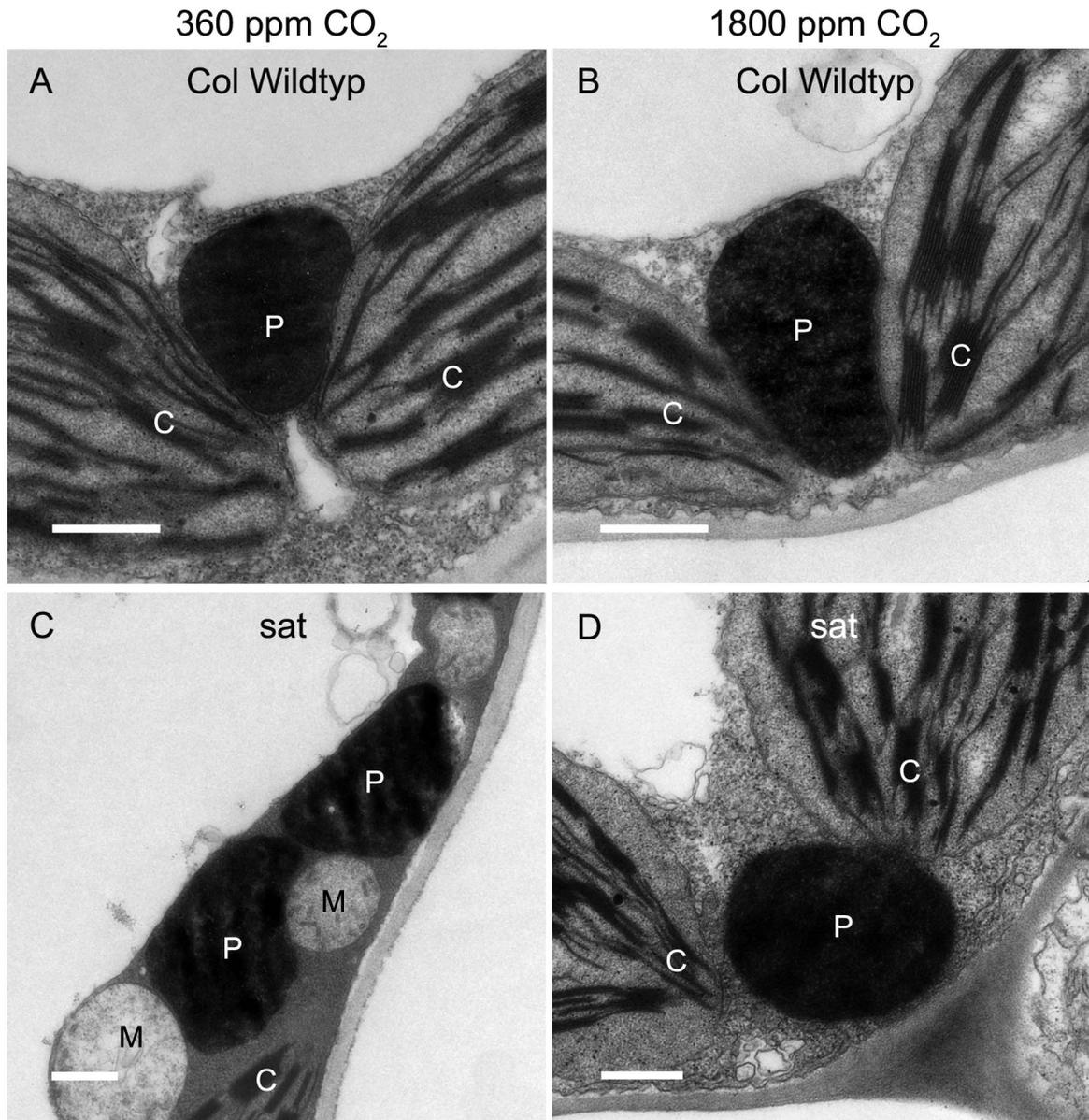


Abbildung 36: Die sat-Mutante zeigt unter Normalatmosphäre einen schwach signifikant gestörten Organellenkontakt der Peroxisomen zu den Chloroplasten. Vergleichende Darstellung 14 Tage alter Ultradünnschnitte (50-70 nm) von Rosettenblättern des Wildtyps (A, B) und der Aminotransferase-Mutante sat (C, D) am TEM unter Normalatmosphäre (A, C) bzw. Hoch- CO_2 (B, D). Die erhöhte CO_2 -Konzentration der Umgebungsluft hat einen schwach steigenden Einfluß auf die Peroxisomengröße in beiden Genotypen. In der sat-Mutante sind unter

Normalatmosphäre (C) mit $46 \pm 52\%$ schwach signifikant weniger Peroxisomen mit einem Chloroplasten assoziiert, als im Wildtyp; Statistik s. Text. Maßstab 500 nm.

Weder die Länge noch die Breite der Peroxisomen der sat-Mutante weichen signifikant vom Wildtyp ab. Mit durchschnittlich $1,22 \pm 0,38 \mu\text{m}$ im Wildtyp und $1,4 \pm 0,34 \mu\text{m}$ in der Mutante nach 72 h unter Normalatmosphäre bzw. $1,52 \pm 0,36 \mu\text{m}$ und $1,25 \pm 0,35 \mu\text{m}$ unter Dauer-Hoch-CO₂ ist kein Unterschied festzustellen (n=10).

Die Kombination der lichtmikroskopischen und der elektronenmikroskopischen Befunde zeigt, dass die sat-Mutante nach 72 h unter Normalatmosphäre längliche Peroxisomen entwickelt, diese jedoch am TEM als zwei oder mehrere dicht nebeneinander liegende Peroxisomen zu sehen sind. Dies führte dazu, daß die Vermessung der peroxisomalen Länge am TEM, im Unterschied zum Lichtmikroskop, keinen Unterschied zwischen Wildtyp und sat-Mutante ergab.

Aufgrund des Ausfalls der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase, eines Schlüsselenzyms des Glycolat-Zyklus, in der sat-Mutante wird Serin nicht zu Hydroxypyruvat transaminiert und Serin sowie Glyoxylat akkumulieren (Liepman and Olsen, 2001). Dieser Metabolitenstau könnte in der sat-Mutante Auslöser sowohl der Formveränderung der Peroxisomen als auch der Reduktion des Kontaktes zwischen Peroxisomen und Chloroplasten sein.

Die Frage, ob oxidativer Streß für den Kontaktverlust von Peroxisomen und Chloroplasten verantwortlich ist, kann mit Hilfe der sat-Mutante jedoch nicht vollständig geklärt werden, da die Signifikanz des Kontaktverlusts zum einen schwach ist, zum anderen starb die Mutante drei Tage nach Entnahme des Blattmaterials für die Mikroskopie-Aufnahmen, so daß unbekannt, den Zelltod bereits einleitende Mechanismen die Analyse verfälschen könnten.

2.2. PEX10-TILLING-Linien weisen auf zwei weitere für die Peroxisomen Biogenese essentielle Motive

Über das Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) sind PEX10-TILLING-Linien des TILLING-Projekts (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes-Project*) mit Punktmutationen (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms) teils im Intron, teils im Exon verfügbar. Es wurden sieben Linien ausgewählt, deren SNPs in Exonen von PEX10 liegen und die Analyse weiterer, für die Funktion von PEX10 und die Biogenese von Peroxisomen essentieller Motive ermöglichen sollten. Aus dem in Abbildung 37

dargestellten PEX10-Alignment verschiedener Organsimen ist die Lage dieser SNPs ersichtlich.

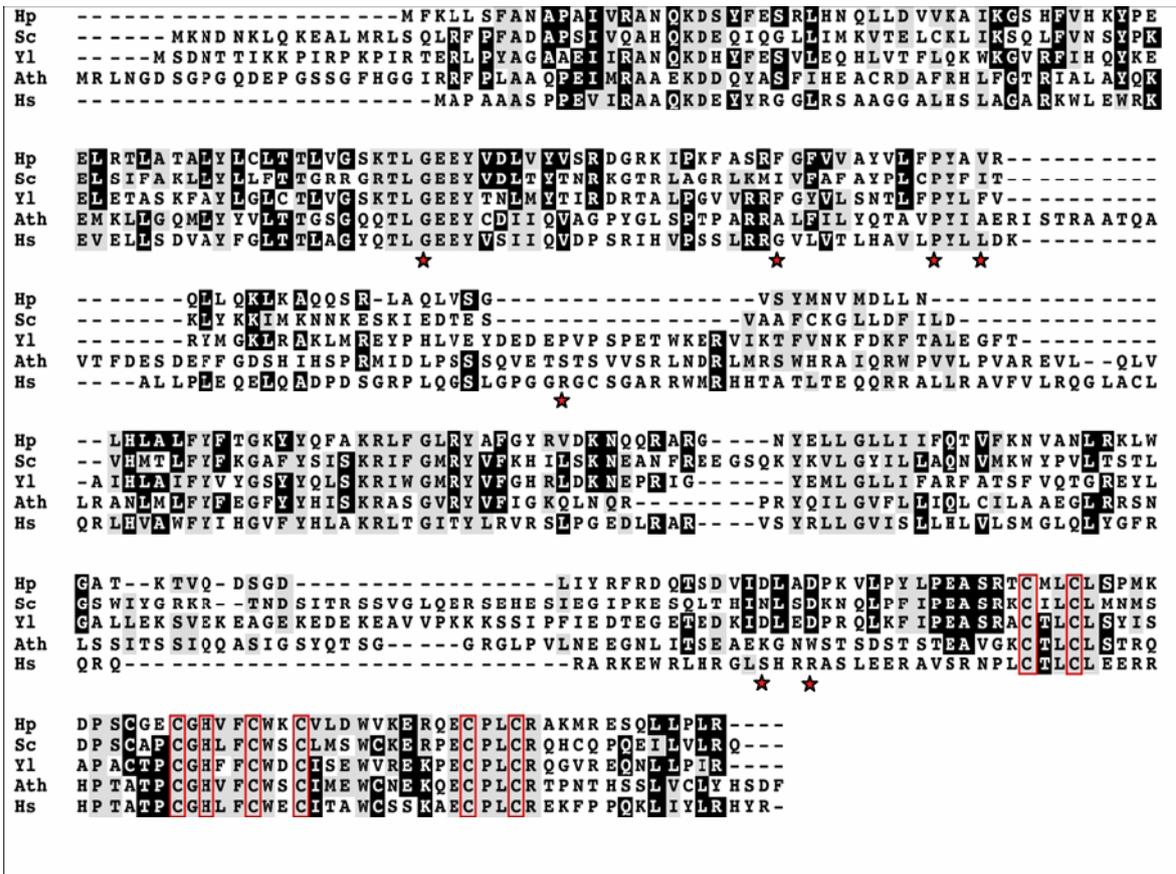


Abbildung 37: Aminosäure-Alignment verschiedener PEX10-Proteine. Hp: *Hansenula polymorpha*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Yl: *Yarrowia lipolytica*; Ath: *Arabidopsis thaliana*; Hs: *Homo sapiens*. Die Punktmutationen der sieben PEX10-TILLING-Linien sind mit rotem Stern markiert. Die erste Mutation betrifft das konservierte Motiv TLGEEY, die dritte Mutation ein konserviertes Prolin und die letzte Mutation führt zu einem Stopcodon vor dem Zink RING-Finger. Die Zink-koordinierenden Cysteine und das Histidin des Zink RING-Finger-Motivs sind rot eingerahmt. Abbildung abgeändert nach Schumann et al., 2003.

Abbildung 38 stellt die bei ABRC verfügbaren sieben PEX10-TILLING-Linien mit ihren Punktmutationen und den resultierenden Aminosäureaustauschen in teils konservierten Bereichen dar. Das zur dCaps-Analyse herangezogene Primerpaar mit Restriktionsenzym sowie die Information, ob die dCaps-Marker den Gewinn oder Verlust einer Restriktionsschnittstelle in Bezug auf den Wildtyp bewirken, ist ebenfalls angegeben. Das Design der Primer erfolgte mit dem Programm *dCaps Finder 2.0*.

ABRC-Stock CS...	Nukl.-Austausch	As-Austausch	Motif	Primer	Restr.-enzym	Gewinn (G), Verlust (V)
89852	G371A	G93E	TLGEEY	PEX10TILLf-s + PEX10TILLr-a	<i>Eam1104I</i>	G
92077	C551T	P126S	Kons. P	PEX10TILL92077 + PEX10TILLr-a	<i>BspI</i> (= <i>NlaIV</i>)	V
93082	C522T	A116V	-	s. 89852	<i>HpyF10VI</i>	V
93945	C775T	S174F	-	s. 89852	<i>Bfml</i>	V
94121	G560A	A129T	-	PEX10TILLf-s + PEX10TILL94121	<i>SatI</i> (= <i>Fnu4HI</i>)	V
94019	G930A	K310=	-	PEX10TILL94019 + PEX10TILLr-a	<i>EcoNI</i> (= <i>XagI</i>)	G
90121	G938A	W313*	-	s. 89852	<i>BseNI</i>	V

Abbildung 38: Übersicht der sieben PEX10-TILLING-Linien. Zugangsnummer der PEX10-TILLING-Linien bei ABRC, Nukleotid- sowie resultierende Aminosäureaustausche in teils konservierten Bereichen, das zur dCaps-Analyse herangezogene Primerpaar mit zugehörigem Restriktionsenzym und Information darüber, ob die dCaps-Marker den Gewinn (G) oder Verlust (V) einer Restriktionsschnittstelle in Bezug auf den Wildtyp bewirken, sind dargestellt. =, Nukleotidaustausch führt zu keinem Aminosäureaustausch. *, Nukleotidaustausch führt zu neuem Stopcodon.

Abbildung 39 veranschaulicht die relative Lage der Aminosäuresubstitutionen entlang des PEX10. Die zugrunde liegenden dCaps-Marker ermöglichen eine Bestimmung der Zygotie nach PCR-Amplifikation mittels in Abbildung 38 beschriebener Primer und anschließendem Verdau.

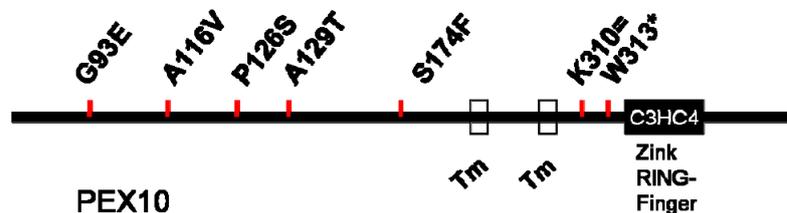


Abbildung 39: Relative Lage der Aminosäuren-Substitutionen entlang des PEX10. Darstellung im Einbuchstaben-Code als z.B. „G93E“ (Glycin an der Position 93 getauscht gegen Glutamat). =, Nukleotidaustausch führt zu keinem Aminosäureaustausch. *, Nukleotidaustausch führt zu neuem Stopcodon. Tm, die beiden Transmembrandomänen des PEX10.

2.2.1. Mutationen in konservierten Aminosäuren der N-terminalen Hälfte des PEX10 resultieren in kleinwüchsigem Phänotyp

Die Samen der PEX10-TILLING-Linien wurden auf MS-Agar ausgebracht und unter Normalatmosphäre sowie unter Hoch-CO₂-Bedingungen angezogen. Wann immer sich ein Phänotyp entwickelte, der auffällig in Bezug auf Wuchs war, gleich ob unter Normalatmosphäre oder Hoch-CO₂ gewachsen, wurde diese Pflanze in Erde pikiert und unter Hoch-CO₂ großgezogen; war kein Phänotyp ersichtlich wurden zufällig Pflanzen zur Anzucht ausgewählt.

Eine dCaps-Analyse der Pflanzen erlaubte die Identifizierung homozygoter bzw. die Trennung heterozygoter Pflanzen von segregierenden Wildtypen. Von den Linien PEX10-A116V, PEX10-S174F, PEX10-A129T sowie PEX10-K310= konnten Homozygote erhalten werden, diese blieben aber phänotypisch unauffällig, sind deshalb nicht in Abbildung 41 dargestellt und wurden nicht weiter untersucht.

Von PEX10-G93E konnten ausschließlich Heterozygote erhalten werden, die allerdings bereits eine kleinwüchsige Erscheinung hatten (s. Abbildung 41). Von PEX10-P126S wurden sowohl Heterozygote als auch Homozygote erhalten, die beide gleichermaßen zwergenwüchsig waren und deren Erscheinung auch unter Hoch-CO₂ nicht zu beeinflussen war. PEX10-W313* mit einem Stopcodon vor dem Zink RING-Finger zeigte ebenfalls bereits im heterozygoten Zustand einen kleinwüchsigen Phänotyp und konnte ebenso nicht in die Homozygotie gebracht werden.

In Abbildung 40 ist die dCaps-Analyse der drei interessanten und auch phänotypisch auffälligen Linien dargestellt.

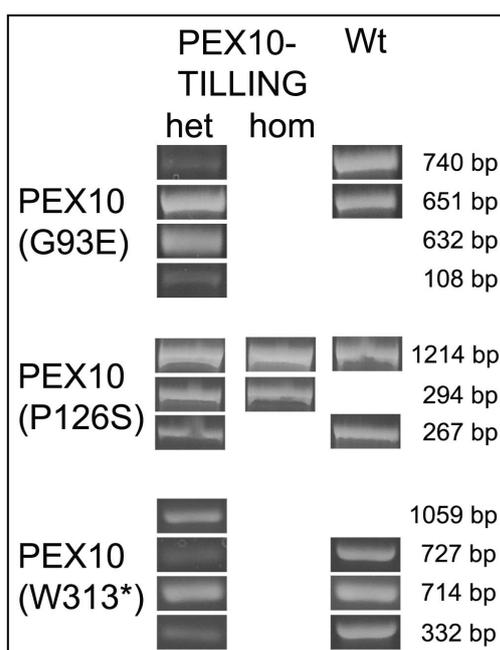


Abbildung 40: dCaps-Analyse der drei phänotypisch auffälligen TILLING-Mutanten PEX10-G93E, PEX10-P126S und PEX10-W313*. Das jeweilige Verdauemuster des Wildtyps (Wt) ist rechts dargestellt. Nur in PEX10-P126S (Mitte) konnten homozygote (hom) Pflanzen erhalten werden. Die Präsenz der 740 bp langen Bande in Linie PEX10-G93E zusätzlich zu den durch den SNP neu entstehenden 632 bp und 108 bp langen Banden zeigt Heterozygotie; die unveränderlichen Banden der Größe 206 bp sowie 176 bp sind der Übersicht wegen weggelassen worden. In PEX10-P126S führt der SNP zum Verlust einer Schnittstelle wodurch das 267 bp lange Fragment und ein nicht abgebildetes 27 bp

langes Fragment in der Homozygoten verschwinden, in der Heterozygoten ist zusätzlich zur 294 bp noch die 267 bp lange Bande sichtbar. Linie PEX10-W313* verliert durch den SNP ebenfalls eine Schnittstelle wodurch aus der 727 bp langen Bande und der 332 bp langen Bande, die im Wildtyp vorhanden sind, in der Heterozygoten zusätzlich die sich aus diesen Banden zusammensetzende 1059 bp lange Bande ergibt.

In PEX10-G93E führt die Mutation innerhalb des hochkonservierten Motivs TLGEEY (s. Abbildung 37) zu einem Austausch von Glycin gegen ein Glutamat. Das ebenfalls konservierte Prolin 126 ist gegen ein Serin in PEX10-P126S getauscht und in PEX10-W313* ist das Tryptophan kodierende Triplet tgg zum Stopcodon tag vor dem Zink RING-Finger mutiert.

In Abbildung 41 sind die Phänotypen der drei PEX10-TILLING-Linien im Vergleich zu Wildtyp und PEX10- Δ Zn1 dargestellt. Aus Abbildung 41B und C geht hervor, dass sich die Entwicklung lediglich der beiden heterozygoten Linien PEX10-G93E und PEX10-W313* durch Hoch-CO₂ etwas ausgleichen lässt, die homozygote PEX10-P126S hingegen zeigt sowohl unter Normalatmosphäre als auch unter Hoch-CO₂ den gleichen, zwergeuwüchsigen Phänotyp. Letztere lässt sich folglich gar nicht durch erhöhte CO₂-Werte in ihrem Wuchs beeinflussen.

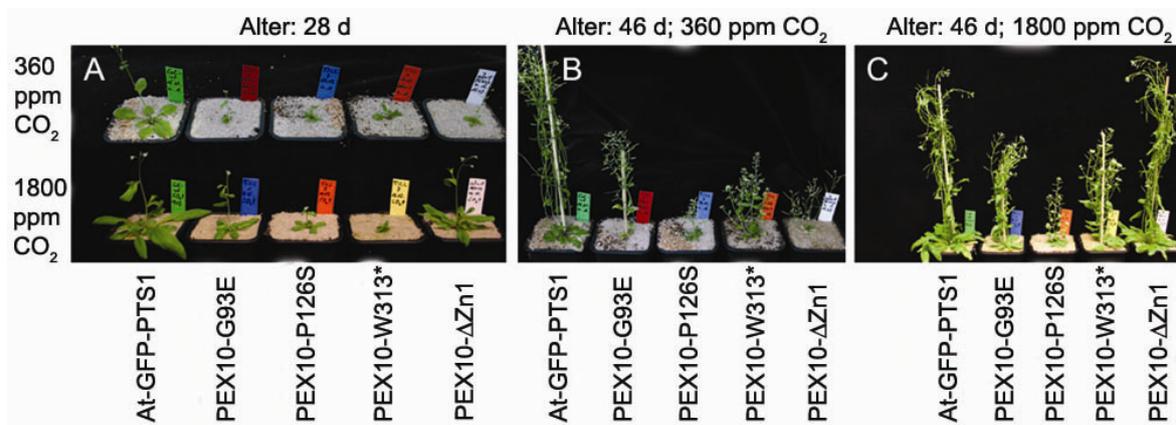


Abbildung 41: Drei PEX10-TILLING-Linien zeigen einen zwergeuwüchsigen Phänotyp, der sich in zwei Linien durch Hoch-CO₂ etwas beeinflussen lässt. Phänotypen der PEX10-TILLING-Linien PEX10-G93E, PEX10-P126S und PEX10-W313* unter Normalatmosphäre (360 ppm CO₂) bzw. Hoch-CO₂ (1800 ppm CO₂). Auf jedem Bild sind links außen die als Wildtyp dienende At-GFP-PTS1-Linie (Mano, Nakamori et al., 2002) und rechts außen die PEX10- Δ Zn1-Linie, deren zwergeuwüchsiger, chlorotischer Phänotyp als Referenz für Photorespirationsstörung dient, abgebildet. Alle 3 TILLING-Linien zeigen einen im Wuchs retardierten Phänotyp, der sich in den heterozygoten Linien PEX10-G93 und PEX10-W313* durch 1800 ppm CO₂ etwas ausgleichen lässt. Die homozygote PEX10-P126S scheint durch erhöhten CO₂-Partialdruck unbeeindruckt.

In einer Segregationsanalyse von 110 auf MS-Agar ausgebrachten Samen von PEX10-G93E entwickelten sich lediglich 83 (75,5%) zu normalen Keimlingen, 24,5% blieben zwerghaft, gelb und stellten ihre Entwicklung ein (s. Pfeile in Abbildung 42). Eine Anzucht dieser gelben Zwerge war weder auf MS-Agar noch auf Einheitserde, auch nicht unter Hoch-CO₂ möglich.

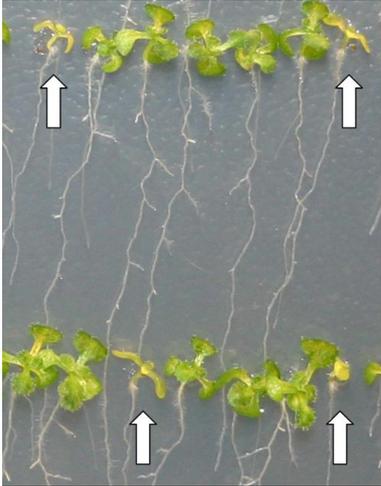


Abbildung 42: Die Aminosäuresubstitution G93E in PEX10 führt zu Keimlingsletalität. Segregation von 25% homozygot, keimlingsletalen Pflanzen. Die mit Pfeilen markierten Keimlinge waren weder auf MS-Agar noch auf Erde noch unter Hoch-CO₂ zu kultivieren, sie starben wenige Tage später.

Dieses Viertel stellt sehr wahrscheinlich die homozygoten Vertreter dieser Linie dar, wonach sie als keimlingsletal bezeichnet werden muß.

2.2.2. Das Fehlen des Zink RING-Fingers in PEX10 resultiert in Embryoletalität

Die Embryonen der PEX10-TILLING-Linien in reifenden Samen wurden am Lichtmikroskop auf ihren Entwicklungszustand hin untersucht, um eine Erklärung zu finden, warum von PEX10-W313* keine homozygoten Pflanzen erhalten wurden. Die Embryonalentwicklung der TILLING-Linien innerhalb einer Schote zeigt welchen Einfluß die Punktmutationen in PEX10 auf die Embryogenese haben. Dazu wurden die Samen aus den Schoten präpariert, mit Hoyers` Medium für 10-15 min zur Klärung inkubiert und die Entwicklungsspanne innerhalb einer Schote unter dem Lichtmikroskop festgehalten. Abbildung 43 zeigt die einzelnen Entwicklungsstadien der *Arabidopsis*-Embryonen von der Zygote bis zum *upturned U*, das das Ende dieses Prozesses ca. 10 Tage nach der Befruchtung markiert.

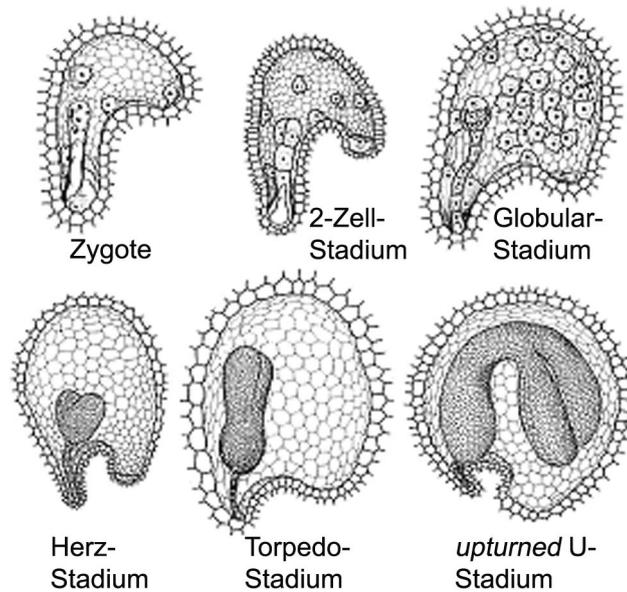


Abbildung 43: Schematische Embryonalentwicklung in *A. thaliana* (verändert nach Bowman, 1994). Die abgebildeten Entwicklungsstadien sind die Grundlage der Bestimmung der Embryoletalität in Abbildung 44. Die Entwicklung von der Zygote bis zum reifen Embryo dauert ca. 10 Tage. Gegen Ende dieses Zeitraums wird die embryonale Entwicklungsspanne (s. Abbildung 44) der PEX10-TILLING-Linien unter dem Mikroskop bestimmt, nachdem die Samen aus den Schoten präpariert und deren Samenschale mit Hoyers` Klärungsmedium durchsichtig gemacht wurde. Innerhalb einer Schote des Wildtyps beträgt die Entwicklungsspanne weniger als eines der oben abgebildeten Stadien.

Schumann und Mitarbeiter (2003) konnten an PEX10-KO-Mutanten zeigen, daß sich homozygote KO-Embryonen nicht über das Herzstadium hinaus entwickelten. Diese 25% Samen, die solche Embryonen beherbergen, sind auffällig weiß im Vergleich zu den restlichen 75% Heterozygoter oder Wildtypen und stellen ihre Entwicklung ein. Die normale Entwicklungsspanne innerhalb einer Wildtyp-Schote beträgt weniger als ein Stadium wie es in Abbildung 43 dargestellt ist.

Aus dieser Erkenntnis resultiert die Vorgehensweise bei der Bestimmung der Embryoletalität in Schoten der PEX10-TILLING-Linien. Zeigt sich innerhalb einer Schote ein Entwicklungsunterschied von deutlich mehr als einem Stadium, werden die am weitesten zurückliegenden Embryonen als letal definiert, wenn sie zusätzlich weiß erscheinen.

Abbildung 44 zeigt den Zusammenhang zwischen embryonaler Entwicklungsspanne und der daraus resultierenden Definition eines PEX10-TILLING-Embryos als letal.

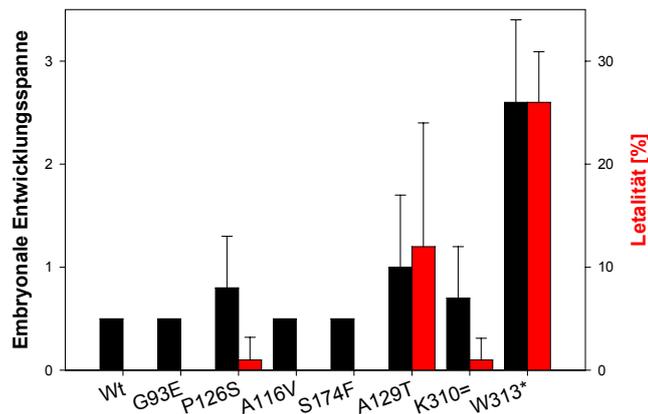


Abbildung 44: Das Fehlen des Zink RING-Fingers resultiert in Embryoletalität in PEX10-W313*. Zusammenhang zwischen embryonaler Entwicklungsspanne in Stadien nach Bowman (1994) (linke Y-Achse) und resultierender Definition eines PEX10-TILLING-Embryos als letal (rechte Y-Achse). Maßgeblich ist ein Entwicklungsunterschied innerhalb einer Schote von deutlich mehr als einem Stadium wie in Abbildung 43 dargestellt und für homozygote PEX10-KO-Embryonen beobachtet (Schumann, Wanner et al., 2003). Dargestellt sind nur die Aminosäuresubstitutionen von PEX10 als z.B. „G93E“. Linie PEX10-W313* mit einem Stopcodon vor dem Zink RING-Finger zeigt mehr als 2 Stadien Entwicklungsunterschied innerhalb einer Schote, weswegen die am weitesten zurückliegenden und zusätzlich weiß erscheinenden Embryonen (ca. 25%) als letal definiert wurden. Embryoletalität in homozygotem Zustand ist demnach in dieser Linie wahrscheinlich und unterstreicht unabhängig von den PEX10-KO-Mutanten die Wichtigkeit des Zink RING-Fingers in PEX10 für die Embryogenese. Linie PEX10-A129T war aufgrund starker Schwankungen in der Embryonalentwicklung und nicht einheitlich weiß gefärbter Embryonen schwer zu charakterisieren.

25% der Samen von PEX10-W313* mit einem Stopcodon vor dem Zink RING-Finger haben sich nicht über das Herzstadium hinaus entwickelt, während die restlichen 75% bereits das *upturned* U-Stadium erreicht hatten. Die embryonale Entwicklungsspanne innerhalb einer Schote lag demnach bei über zwei Stadien nach Bowman (1994), folglich ist diese TILLING-Linie in homozygotem Zustand als ebenso embryoletal einzustufen gewesen wie homozygote PEX10-KO-Mutanten, die sich ebenfalls nicht über das Herzstadium hinaus entwickelten (Schumann, Wanner et al., 2003). Bis auf PEX10-A129T, bei der die Embryonalentwicklung aufgrund zu großer Schwankungen und nicht einheitlich weiß gefärbter zurückliegender Embryonen, nur schwer klassifiziert werden konnte, zeigten alle anderen Linien eine normale, d.h. vom Wildtyp nicht signifikant abweichende Entwicklungsspanne.

Die Wichtigkeit des Zink RING-Fingers des Peroxins PEX10 konnte somit unabhängig von den Erkenntnissen der PEX10-KO-Mutante als für die Embryonalentwicklung essentiell bewiesen werden.

2.2.3. Die Photosyntheseleistung ist in keiner PEX10-TILLING-Linie auf Werte der PEX10- Δ Zn1-Pflanze erniedrigt

Die drei phänotypisch interessanten und auffälligen TILLING-Linien PEX10-G93E (heterozygot), PEX10-P126S (homozygot) und PEX10-W313* (heterozygot) wurden einer Analyse am PAM2000 unterzogen, um die Photosyntheseleistung zu bestimmen. Aus Abbildung 45 geht hervor, dass in keiner TILLING-Linie die Quantenausbeute des Photosystems II unter Normalatmosphäre auf Werte sinkt, die der PEX10- Δ Zn-Mutante gleichen. Die Photosyntheseleistung in PEX10-G93E und PEX10-P126S ist jedoch unter Normalatmosphäre leicht reduziert wenn auch nicht signifikant ($P=0,04$ bzw. $0,14$). Die heterozygote PEX10-W313* zeigt keinerlei Auffälligkeiten in Bezug auf ihre Photosyntheseleistung.

Unter Hoch- CO_2 -Bedingungen weisen PEX10-P126S und PEX10-W313* Quantenausbeutungswerte auf, die mit 0,6 relativen Einheiten dem Wildtyp gleichen. Lediglich PEX10-G93E scheint unter erhöhtem CO_2 -Partialdruck noch niedrigere Photosyntheseleistungswerte zu haben als unter Normalatmosphäre, die hochsignifikant von den Werten des Wildtyps unter Hoch- CO_2 abweichen (***, $P < 0,001$).

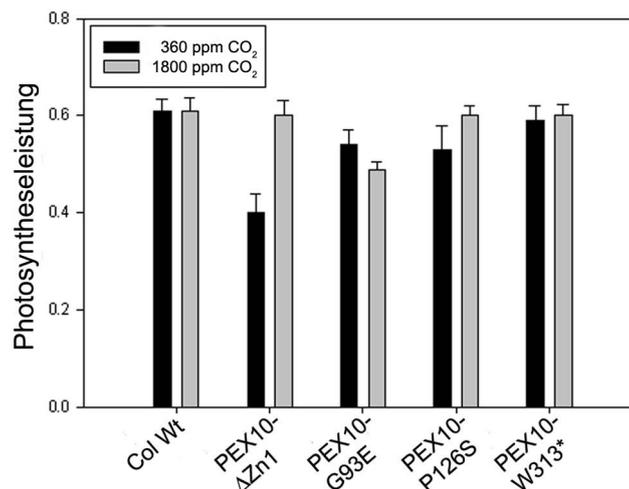


Abbildung 45: Die Photosyntheseleistung ist in keiner PEX10-TILLING-Linie auf Werte der PEX10- Δ Zn1-Pflanze reduziert. Photosyntheseleistung dreier PEX10-TILLING-Linien gemessen mit portablem Fluorometer PAM2000 (Waltz-Effeltrich, Deutschland). Erhöhter CO_2 -Partialdruck hat in der TILLING-Linie PEX10-G93E keinen, womöglich sogar einen negativen Effekt auf die

Photosyntheseleistung der Pflanze. Die Linie PEX10-P126S, die als einzige in die Homozygotie gebracht werden konnte, zeigt eine leichte Reduktion der Photosyntheseleistung unter Normalatmosphäre (360 ppm CO₂), die unter 1800 ppm CO₂ auf Wildtyp-Niveau angehoben werden kann, obwohl die Pflanze einen zwergenhaften Wuchs zeigt. Linie PEX10-W313*, bei der ein Stopcodon vor dem Zink RING-Finger zu liegen kommt, verhält sich im heterozygoten Zustand wie Columbia Wildtyp.

2.2.4. Das Fehlen des Zink RING-Fingers stört den Organellenkontakt mit Chloroplasten, und das N-terminale Motiv TLGEEY spielt eine Rolle in der Formgebung von Peroxisomen

Die PEX10-TILLING-Linien eröffnen die Möglichkeit die Auswirkungen einzelner Aminosäureaustausche in unterschiedlichen Domänen des PEX10 auf die Peroxisomenform und auf kontaktgebende Eigenschaften zwischen Peroxisom und Chloroplast zu untersuchen. Das Lichtmikroskop gibt einen Überblick über die Formverhältnisse der Peroxisomen, die auf je 8 LM-Aufnahmen untersucht wurden. Auffällig sind die teils 5 µm langen elongierten Peroxisomen in PEX10-G93E (Abbildung 46B), die den Peroxisomen der PEX10-ΔZn-Pflanzen ähnlich sind. In PEX10-P126S fallen v.a. die großen Chloroplasten mit riesigen Stärkekörnern auf, wobei die Peroxisomen zwar rund bis oval geformt sind, jedoch den Eindruck vermitteln, als wären sie lokal zu kleinen Gruppen zusammengesetzt (Abbildung 46C). PEX10-W313* ist am LM unauffällig, die Peroxisomenform gleicht dem Wildtyp (Abbildung 46D).

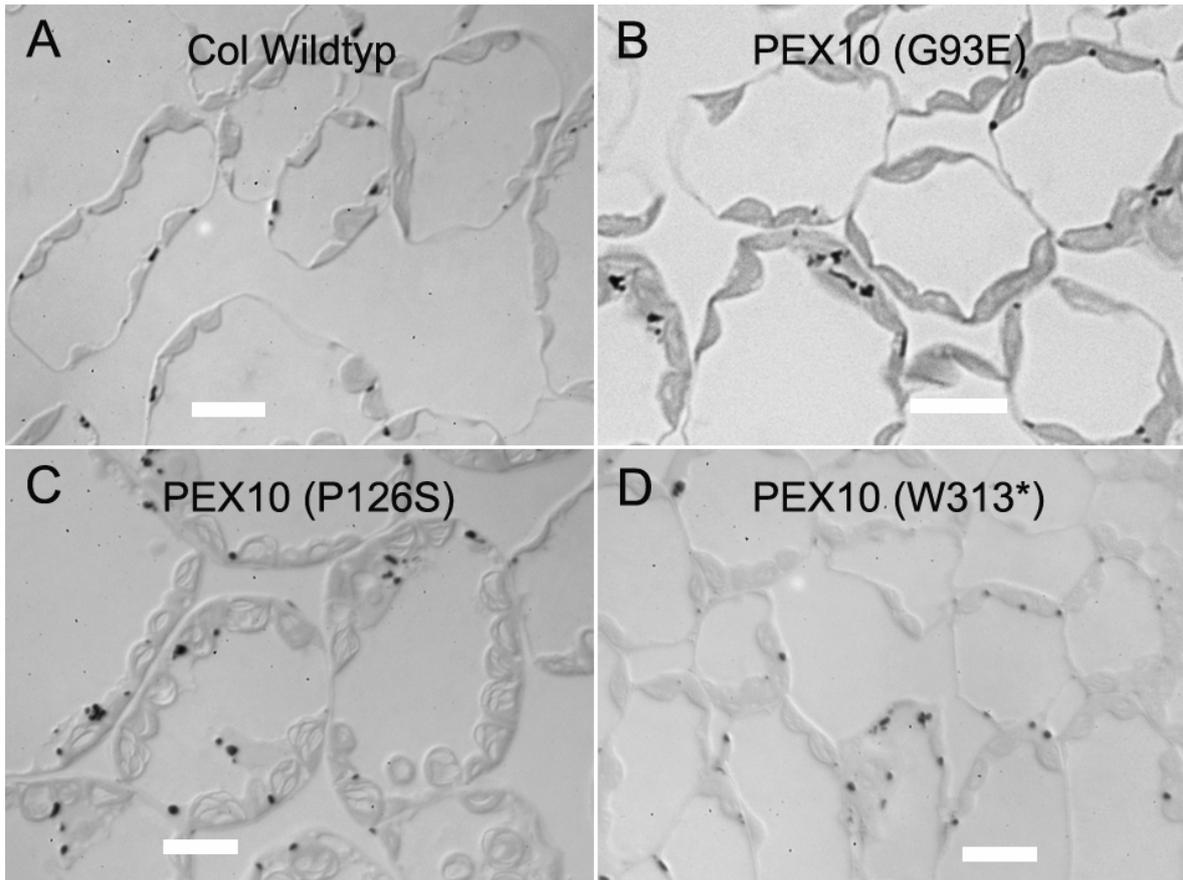


Abbildung 46: Die Mutation im N-terminalen Motiv TLGEEY nach TLEEEY in PEX10 resultiert in elongierten Peroxisomen und die Mutation P126S führt zu lokalen Zusammenlagerungen von Peroxisomen. Lichtmikroskopische Aufnahmen des Mesophylls 14 Tage alter, Katalasegefärbter Primärblätter des Columbia Wildtyps und der drei TILLING-Linien PEX10-G93E, PEX10-P126S und PEX10-W313*. Im Wildtyp sind die Peroxisomen rund bis oval. PEX10-G93E weist teils bis zu 5 μm elongierte Peroxisomen auf, PEX10-P126S scheint assimilatorische Stärke in den Chloroplasten anzusammeln, wodurch diese rundlich „aufgebläht“ erscheinen, und die Peroxisomen lagern sich lokal zu kleinen Gruppen zusammen. PEX10-W313* ist im Lichtmikroskop bezüglich peroxisomaler Form unauffällig. Maßstab 10 μm .

Eine Analyse 13 Tage alter Primärblätter der drei phänotypisch interessanten TILLING-Linien am Transmissionselektronenmikroskop sollte die genaue Bestimmung der Peroxisomenform und Kontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten klären.

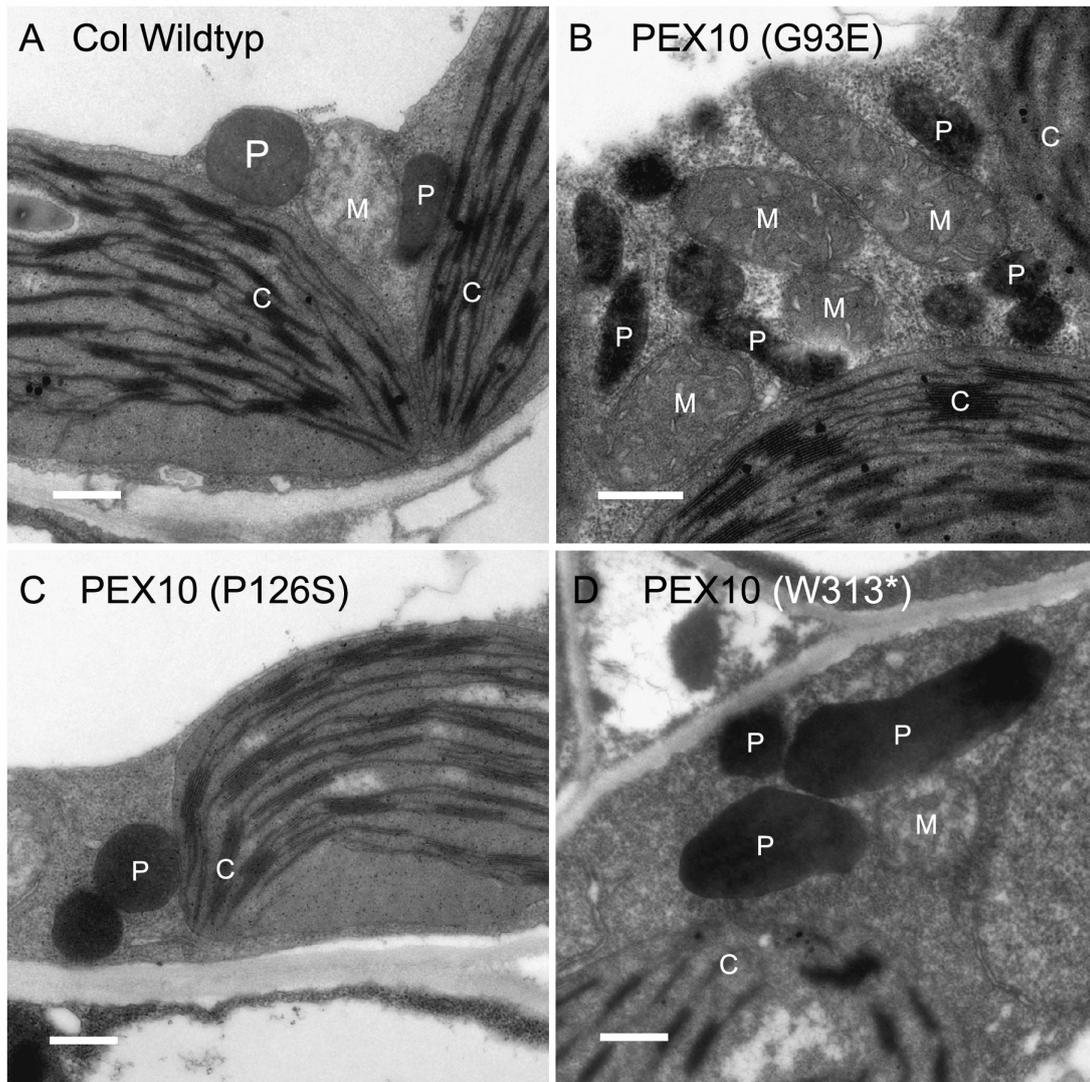


Abbildung 47: Punktmutationen im N-Terminus von PEX10 führen zu Formveränderungen in Peroxisomen; das Fehlen des Zink RING-Fingers führt zusätzlich zu Organellenkontakt-Verlust. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen 13 Tage alter Primärblätter von PEX10-G93E, -P126S und -W313* im Vergleich mit dem Columbia Wildtyp. A, Columbia Wildtyp mit rundlich bis ovalen Peroxisomen in Kontakt mit Chloroplasten und Mitochondrien. B, PEX10-G93E zeigt viele, nicht signifikant kleinere Peroxisomen als der Wildtyp, die längliche, verzweigte Peroxisomen darstellen, die mehrfach geschnitten sind und den Peroxisomen der PEX10- Δ Zn1-Pflanze ähnlich sind. Der Organellenkontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten ist jedoch nicht signifikant gestört (Statistik s. Text). C, PEX10-P126S zeigt normal große Peroxisomen ohne signifikante Organellen-Kontaktstörung. Die beiden nebeneinander liegenden Peroxisomen könnten zwei sich aneinanderlagernde sein, oder ein wurmförmiges Peroxisom, das zweimal quer geschnitten wurde. D, PEX10-W313* zeigt Kontaktstörung der Peroxisomen mit Chloroplasten (nur noch $24 \pm 34\%$ der Peroxisomen sind mit Chloroplasten assoziiert) und weist zwei in der Länge verschiedene Peroxisomen-Populationen auf, eine davon signifikant vom Wildtyp verschieden (Statistik s. Text) mit bis zu 3 μ m langen Peroxisomen, ähnlich der PEX10- Δ Zn1-Pflanze. Maßstab 500 nm.

PEX10-G93E zeigte am LM bis zu 5 μm lange Peroxisomen. Die Bestimmung der Peroxisomenlänge am TEM ergab durchschnittlich $0,56 \pm 0,31 \mu\text{m}$, die nicht signifikant vom Wildtyp abwich ($P=0,11$, $n=20$). Aufgrund der geringen Schnittdicke der Präparate am TEM ist es allerdings nicht möglich ein längliches, womöglich verzweigtes Peroxisom so darzustellen, wie am LM. Erst die Kombination beider Mikroskopie-Techniken ermöglicht somit die Aussage, daß die Peroxisomen in PEX10-G93E elongiert sind, am TEM jedoch als mehrere nebeneinander liegende Peroxisomen dargestellt werden (s. Abbildung 46B und Abbildung 47B). Der Organellenkontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten beträgt in PEX10-G93E $66 \pm 35\%$ und weicht damit nicht signifikant vom Wildtyp ab, in dem $88 \pm 16\%$ der Peroxisomen mit einem Chloroplasten assoziiert sind ($n=20$). Die N-terminale Mutation TLGEEY scheint folglich eine ähnliche Auswirkung auf die Peroxisomenform zu haben wie die Überexpression eines dysfunktionalen Zink RING-Fingers in PEX10- ΔZn1 -Pflanzen, jedoch ohne den Organellenkontakt signifikant zu beeinflussen. Dies unterstreicht erneut die Aufgabe des C-terminalen Zink RING-Fingers im Vermitteln des Organellenkontaktes.

In den LM-Aufnahmen von PEX10-P126S scheinen die Peroxisomen lokal zu kleinen Gruppen zusammengelagert zu sein (s. Abbildung 46C). Mit einer Peroxisomenlänge von $0,51 \pm 0,2 \mu\text{m}$, am TEM bestimmt, weicht PEX10-P126S nur schwach signifikant vom Wildtyp mit $0,86 \pm 0,15 \mu\text{m}$ ab ($P=0,016$, $n=10$). Die Mutation des konservierten Prolins 126 in Serin in PEX10 verringert folglich geringfügig die Peroxisomengröße und bewirkt ein Zusammenlagern der Peroxisomen zu kleinen Gruppen. Der Organellenkontakt in PEX10-P126S ist mit $69 \pm 42\%$ ebenfalls nicht signifikant vom Wildtyp verschieden.

In PEX10-W313* mit Stopcodon vor dem Zink RING-Finger konnten am TEM, ähnlich wie in der PEX10- ΔZn1 -Mutante, zwei unterschiedliche Populationen von Peroxisomen ausgemacht werden. Die erste weicht mit einer Länge von $0,76 \pm 0,2 \mu\text{m}$ nicht vom Wildtyp ab. Die zweite ist mit einer durchschnittlichen Länge von $1,71 \pm 0,35 \mu\text{m}$, die vereinzelt 3 μm Länge erreicht, signifikant vom Wildtyp verschieden (**, $P<0,01$, $n=20$). In PEX10- ΔZn1 entfielen ca. 40% der Peroxisomen in diese zweite, längere Kategorie, in PEX10-W313* mit 33% vergleichbar viele. Die Bestimmung des Organellenkontaktes in PEX10-W242* ergab, daß $24 \pm 34\%$ der Peroxisomen mit einem Chloroplasten assoziiert sind. Im Wildtyp sind es $88 \pm 16\%$. Damit weicht PEX10-W313* signifikant vom Wildtyp ab (**, $P<0,01$, $n=10$) und ist vergleichbar mit PEX10- ΔZn1 bei der $31 \pm 21\%$ der Peroxisomen mit einem Chloroplasten in physikalischem Kontakt stehen.

2.2.5. Mutationen im N-Terminus von PEX10 wirken sich ebenfalls auf Metabolomebene aus

Die Wichtigkeit des Zink RING-Fingers des Peroxins PEX10 für die Embryogenese und den Kontakt der Organellen im Zuge der Photorespiration wurde bereits dokumentiert. Die folgende Metabolomic-Studie an PEX10-G93E und PEX10-P126S zeigt die Auswirkung von Veränderungen konservierter Bereiche des PEX10 außerhalb des Zink RING-Fingers auf metabolischer Ebene. Die am LM und TEM festgestellten Formveränderungen der Peroxisomen in PEX10-G93E und PEX10-P126S führen nicht zum Kontaktverlust zwischen Peroxisomen und Chloroplasten, was anhand des Metabolitprofils unabhängig überprüft werden soll. Es wurden die im Lichtmikroskop auffällige, heterozygote PEX10-G93E, die teils 5 µm lange, elongierte Peroxisomen, sowie die phänotypisch auffälligste der drei PEX10-TILLING-Linien, die homozygote PEX2-P126S, die sich am wenigsten durch Hoch-CO₂ in ihrer Entwicklung beeinflussen ließ, für die Metabolom-Analyse herangezogen. In Abbildung 48 ist die Hauptkomponenten-Analyse 14 Tage alter Pflanzen des Wildtyps, der eben beschriebenen PEX10-TILLING-Linien und einer PEX2-ΔZn-Mutante abgebildet, da sie gemeinsam aufgearbeitet wurden. Wie sich in Kapitel 2.3 herausstellen wird, dient die PEX2-ΔZn-Mutante in dieser Hauptkomponentenanalyse als Kontrolle, die zeigt, welche Auswirkung ein deutlich gestörter Matrixprotein-Import auf Metabolom-Ebene haben kann. Ob der Matrixprotein-Import in den beiden PEX10-TILLING-Linien gestört ist, muß jedoch noch gezeigt werden.

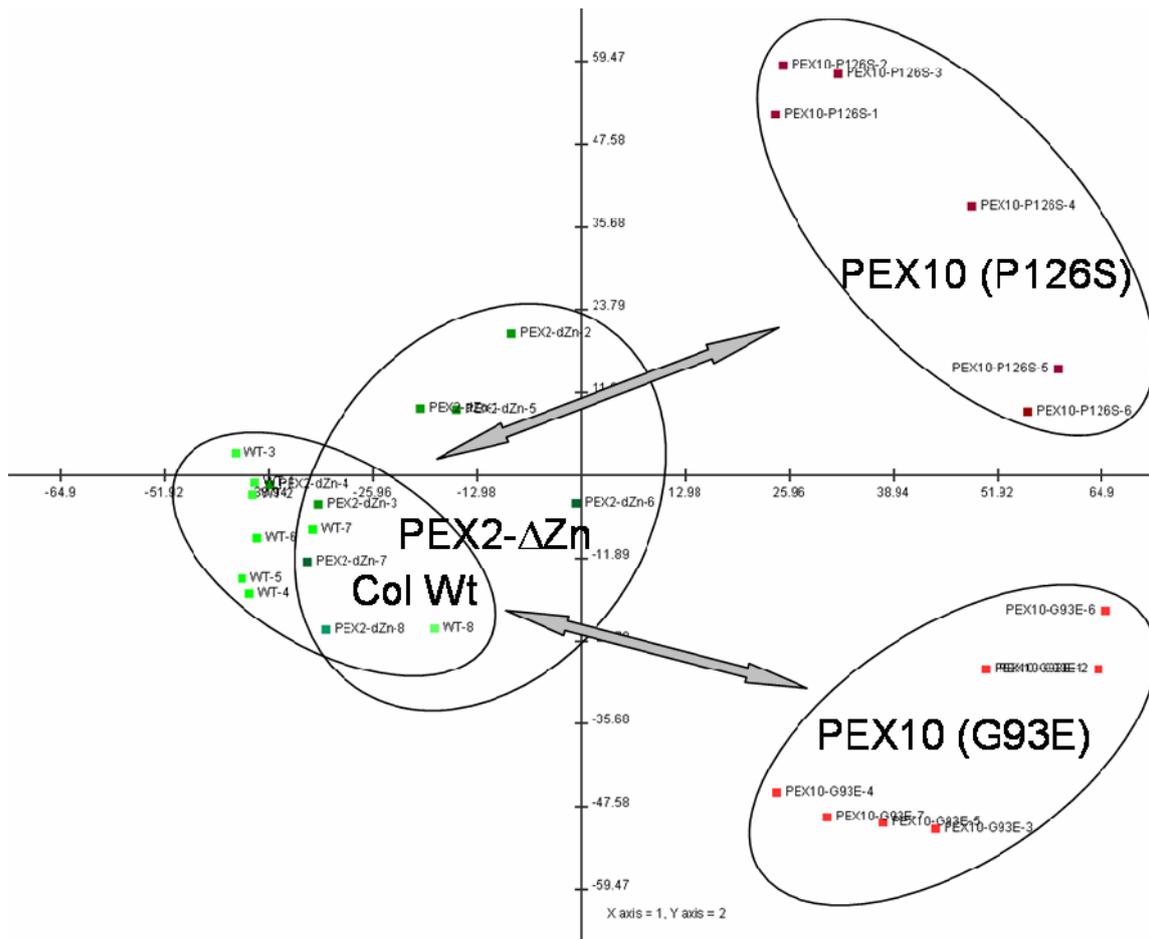


Abbildung 48: Die Aminosäuresubstitutionen G93E und P126S in PEX10 bewirken ein vom Wildtyp abweichendes Metabolit-Profil. Hauptkomponenten-Analyse (PCA) 14 Tage alter Pflanzenproben der beiden TILLING-Linien PEX10-G93E und PEX10-P126S im Vergleich zum Wildtyp und einer PEX2-ΔZn-Mutante (s. Text). Die Anzucht erfolgte unter Normalatmosphäre. Der Wildtyp und eine PEX2-ΔZn-Mutante separieren sich so gut wie nicht voneinander (s. Text und 2.3.3). Die PEX2-ΔZn-Mutante ist in diese Darstellung mit aufgenommen, da sie gemeinsam aufgearbeitet wurde und hier als Kontrolle dient. Sie zeigt ein Metabolitprofil einer Pflanze, die einen deutlich gestörten Matrixprotein-Import aufweist und wird in 2.3 näher beschrieben. Ob der Matrixprotein-Import in den beiden PEX10-TILLING-Linien gestört ist, muß noch gezeigt werden. Die PEX10-TILLING-Linien separieren sich deutlich aufgrund unterschiedlicher Metabolit-Abundanzen voneinander und von Wildtyp und PEX2-ΔZn-Mutante. Dargestellt sind die normalisierten Metabolitdaten ($x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$), wobei die ersten beiden Komponenten 43% der Gesamtvarianz wiedergeben, 27,5% entfallen dabei auf die erste, 15,5% auf die zweite Hauptkomponente. Jeder Punkt repräsentiert 57 quantitativ bestimmte Metaboliten. Aufgearbeitet wurden je acht biologische Replika, von denen einige während Aufarbeitung und Derivatisierung verloren gingen.

Nach einer Varianz-Analyse (ANOVA) und integriertem *Clustering* sind die für die Trennung der Proben Gruppen in der PCA verantwortlichen Metaboliten in Abbildung 49 dargestellt. Von den Glycolat-Zyklus-Intermediaten sind in PEX10-G93E die Metabolitspiegel von Glycin, Serin sowie Glycerat signifikant gegenüber dem Wildtyp erhöht, was an der Rotfärbung in Abbildung 49 ersichtlich ist. In PEX10-P126S sind Serin, Glutamat und Alanin signifikant gegenüber dem Wildtyp erhöht.

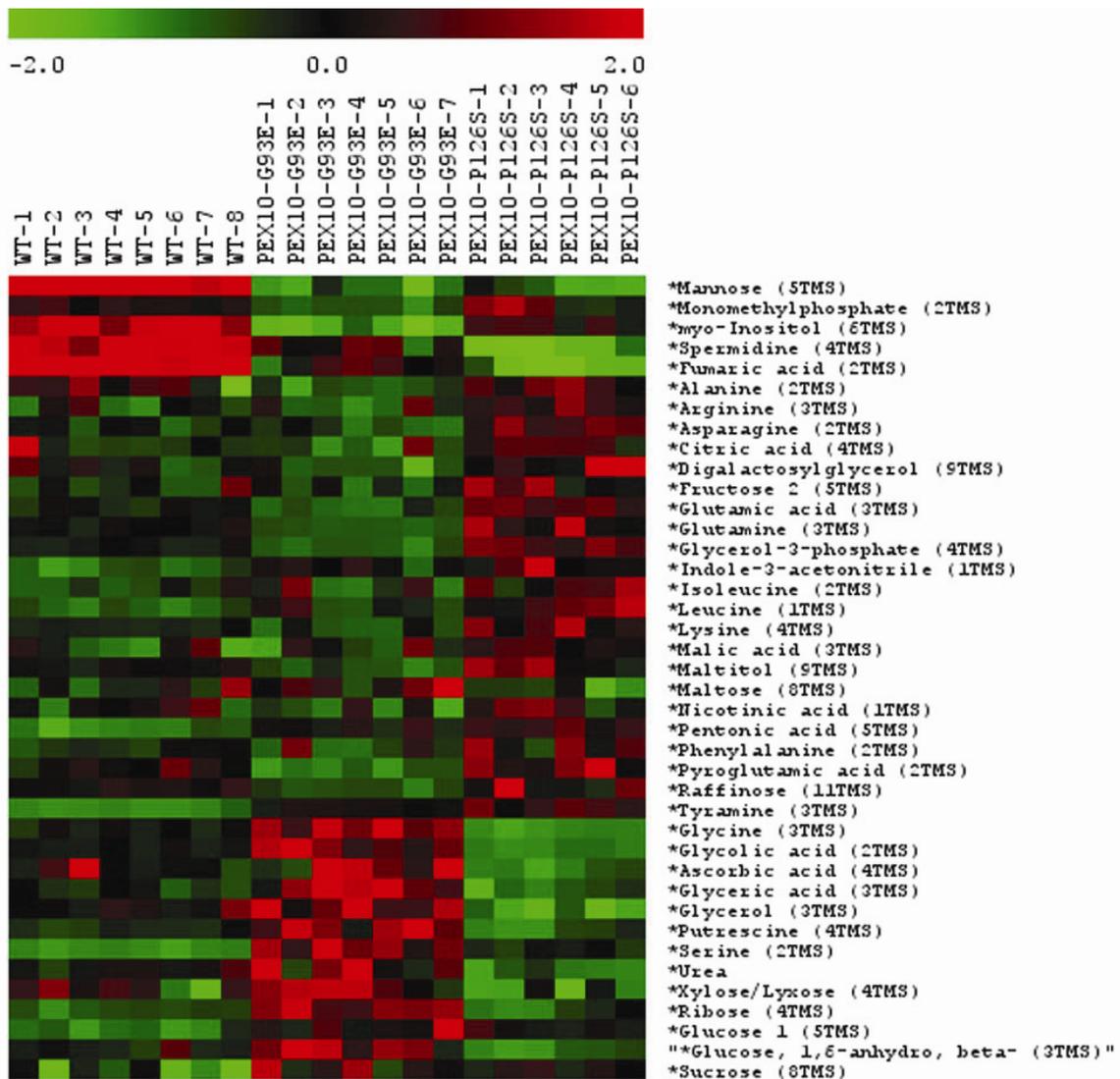


Abbildung 49: Beide N-terminalen Punktmutationen in PEX10 (G93E sowie P126S) führen zu erhöhten Abundanzen der Metaboliten des Glycolat-Zyklus. ANOVA mit integriertem *Clustering* zwischen Wildtyp (wt) und den beiden TILLING-Linien PEX10-G93E und PEX10-P126S. Farbcodierte Darstellung signifikanter Änderungen der Metabolit-Konzentrationen. Die rote Farbcodierung repräsentiert erhöhte Konzentrationen und grüne Farbcodierung verminderte Konzentrationen der jeweiligen Metaboliten. Die relativen Abundanzen der Glycolat-Zyklus Intermediate Glycin, Serin und Glycerat sind in PEX10-G93E gegenüber dem Wildtyp hochsignifikant erhöht, in PEX10-P126S nur Serin. Durch die Metabolitspiegel-Differenzen

bezüglich Glycin, Serin, Glycerat, Glutamat und Alanin zwischen den TILLING-Linien unterscheiden sie sich signifikant, diametral voneinander. Als Signifikanztest wurde der *Fisher-Test* zwischen Gruppen mit ungleichen Varianzen ($p=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw.}$

Die Abundanzen der Glycolat-Zyklus Metaboliten Glycin, Serin, Glycerat, Glutamat und Alanin in Wildtyp und beiden PEX10-TILLING-Linien sind zur Veranschaulichung in Abbildung 50 isoliert dargestellt.

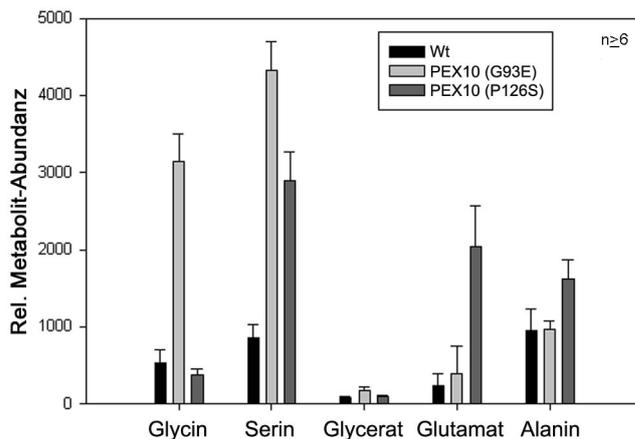


Abbildung 50: Die Intermediate des Glycolat-Zyklus sind durch beide PEX10-Punktmutationen (G93E sowie P126S) erhöht. Die Glycolat-Zyklus-Intermediate relativ zueinander in Wildtyp und den TILLING-Linien PEX10-G93E und PEX10-P126S. Glycin ist hochsignifikant in PEX10-G93E erhöht, Serin ist in beiden Linien hochsignifikant erhöht, Glycerat ist in PEX10-G93E hochsignifikant erhöht

und Glutamat sowie Alanin sind hochsignifikant erhöht in PEX10-P126S, (***, $P < 0,001$). Die Mittelwerte ergeben sich aus je mindestens sechs biologischen Replika.

Mit Ausnahme des Metabolit-Spiegels für Serin, der in beiden TILLING-Linien gegenüber dem Wildtyp erhöht ist, verhalten sich die beiden PEX10-TILLING-Linien die anderen Metaboliten der Photorespiration betreffend diametral voneinander hochsignifikant verschieden (***, $P < 0,001$). So ist z.B. der Metabolit Spiegel von Glycin in PEX10-G93E signifikant erhöht, in PEX10-P126S erniedrigt.

Zur Veranschaulichung des Metabolitenflusses in der Photorespiration ist das Verhältnis aus Serin und Glycerat in Abbildung 51 dargestellt. Das Serin/Glycerat-Verhältnis ist sowohl in PEX10-G93E als auch in PEX10-P126S hochsignifikant gegenüber dem Wildtyp erhöht (***, $P < 0,001$). Es wird scheinbar vermehrt Serin innerhalb des Glycolat-Zyklus gebildet.

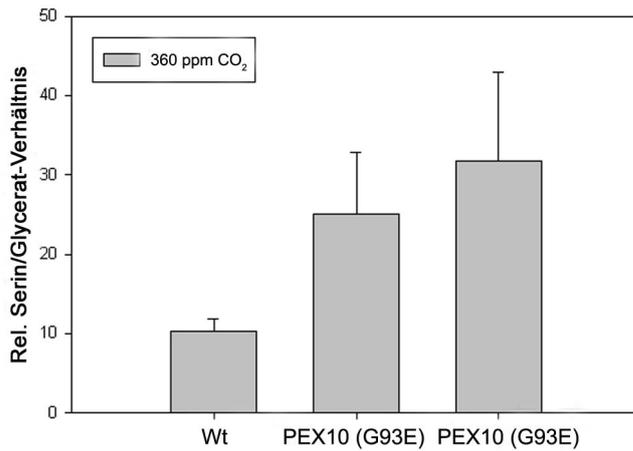


Abbildung 51: Der Metabolitenfluß innerhalb des Glycolat-Zyklus ist durch beide Punktmutationen in PEX10 (G93E und P126S) nicht reduziert. Relative Metabolitpaarung zwischen Serin und Glycerat in Wildtyp, PEX10-G93E und PEX10-P126S, um den Flux der Intermediate innerhalb des Glycolat-Zyklus zu veranschaulichen. Erhöhte Verhältnisse zwischen den beiden Metaboliten sind in den TILLING-Linien

sichtbar, die sich beide hochsignifikant vom Wildtyp unterscheiden (***, $P < 0,001$).

Aus dem hochsignifikant vom Wildtyp verschiedenen Verhältnis Serin zu Glycerat in beiden TILLING-Linien lässt sich schließen, dass der Metabolitenfluß des Glycolat-Zyklus auf jeden Fall nicht gestört ist wie in PEX10- Δ Zn1-Pflanzen, die eine hochsignifikant erniedrigte Relation dieser Intermediate, unter Normalatmosphäre wie unter Hoch-CO₂, aufwies. Da sowohl PEX10-G93E als auch PEX10-P126S stark erhöhte Werte für Serin zeigt, erstere zusätzlich einen sehr hohen Glycerat-Spiegel, ist das errechnete hohe Verhältnis aus Serin zu Glycerat einem sehr hohen Serin-Spiegel zuzurechnen.

Neben den Glycolat-Zyklus-Intermediaten können noch in diversen Zuckern wie Maltose und Raffinose, Glucose und Saccharose, in den Aminosäuren Arginin und Asparagin sowie im Harnstoff signifikante Unterschiede festgestellt werden. Des Weiteren ist der Spiegel des für die Chloroplasten-Hüllmembran und die Thylakoide spezifischen Membranlipids Digalactosyl-Diacylglycerol in PEX10-P126S erhöht, der in PEX10- Δ Zn1 gegenüber dem Wildtyp reduziert war. Offensichtlich ist die Synthese dieses Membranlipids in PEX10- Δ Zn1 gesenkt, in PEX10-P126S dagegen gesteigert. Es bleibt zu klären, ob dieser Befund mit der im Lichtmikroskop gemachten Beobachtung vergrößerter Chloroplasten mit sehr auffällig großen Stärkekörnern in Zusammenhang steht. Von den möglichen Stärkefragmenten Maltose oder Glucose ist Letztere in beiden TILLING-Linien hochsignifikant erhöht (***, $P < 0,001$).

Aus der Metabolom-Analyse kann geschlossen werden, daß weder die peroxisomale Formstörung der PEX10-G93E-Linie noch die etwas kleineren, sich zu Gruppen zusammenlagernden Peroxisomen der PEX10-P126S-Mutante zu einer Erniedrigung der Intermediate der Photorespiration führen, wie es in PEX10- Δ Zn1 beobachtet werden konnte. Somit haben beide N-terminalen Punktmutationen in PEX10 keinen Einfluß auf

den Organellenkontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten, was die Befunde des TEM bestätigt.

Erhöhte Abundanzen für die Metaboliten des Glycolat-Zyklus zeigt auch eine in 2.3.3 näher beschriebene PEX2- Δ Zn-Mutante, die nachweislich einen gestörten Matrixprotein-Import zeigt. Ob die Punktmutationen der beiden TILLING-Linien ebenfalls einen gestörten Import zur Folge haben, muß noch geklärt werden und kann nicht direkt aus dem Befund der Metabolitprofile abgeleitet werden.

2.3. Die Überexpression des PEX2 mit punktmutiertem Zink RING-Finger führt zu Matrixprotein-Importstörung bei normal geformten Peroxisomen

Die Mutation des Peroxins PEX2 im Zink RING-Finger analog zu PEX10- Δ Zn soll die Aufgabe des Ring-Finger Motivs von PEX2 und damit die Funktion dieses Peroxins in *Arabidopsis* klären.

Hierzu wurde die PEX2-cDNA als Wildtyp-Konstrukt (PEX2-Wt-over) sowie als punktmutiertes Δ Zn-Konstrukt (PEX2- Δ Zn) per PCR mit einem T7-Tag am N-Terminus versehen, um eine potentielle Lokalisation des Peroxins mittels Immunelektronenmikroskopie und eine Säulenchromatographie zu ermöglichen. Die Transformation der Konstrukte erfolgte in die At-GFP-PTS-Pflanzen (Mano, Nakamori et al., 2002) analog zu den T7-tag tragenden PEX10- Δ Zn-Linien. Die Beteiligung des PEX2 am Import peroxisomaler Proteine und an formgebenden Prozessen auf Peroxisomen kann somit über das Confocale Laserscanning-Mikroskop beurteilt werden.

Das *Screening* nach Primärtransformanden erfolgte durch Ausbringen von ca. 60.000 T₀-Samen auf mit Basta getränkter Erde [30 μ l/l] unter Hoch-CO₂, um auch „starke Allele“ zur Samenreife zu bringen.

Aus dem *Screen* gingen fünf unabhängige, Basta-resistente PEX2- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-, drei PEX2- Δ Zn-T7 in PTS2-GFP-, zwei PEX2-Wt-over-T7 in GFP-PTS1- sowie drei PEX2-Wt-over-T7 in PTS2-GFP-Pflanzen hervor. Die geringe Ausbeute an Basta-resistenten Pflanzen ist auf die nur einmal durchgeführte Pflanzentransformation mittels *floral-dip* (Clough and Bent, 1998) zurückzuführen.

In Abbildung 52 ist der Nachweis der Transkription des überexprimierten PEX2-Konstruktes in Basta-resistenten Primärtransformanden beispielhaft dargestellt. Die Primerkombination At-PEX2-T7-se2 und At-PEX2-T7-as amplifiziert ein 1069 bp cDNA-

Fragment, das spezifisch für die überexprimierten Konstrukte PEX2-Wt- bzw. PEX2- Δ Zn-T7 ist, da At-PEX2-T7-se2 auf dem in der Klonierung verwendeten T7-tag bindet. Dadurch kann keine Amplifikation des endogenen Wildtyp-PEX10 stattfinden und das überexprimierte T7-tag tragende PEX10-Konstrukt wird spezifisch amplifiziert. Der Verdau dieses Amplifikates mit *Bpu10I* ergibt ausschließlich in At-PEX2- Δ Zn-T7 die beiden 943 bp- bzw. 126 bp langen Produkte und beweist die Δ Zn-Mutation im Zink RING-Finger.

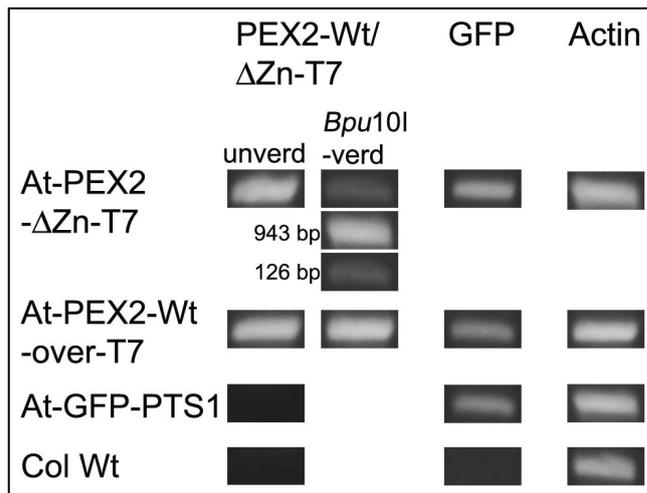


Abbildung 52: Transkriptionsnachweis des PEX2-T7-Konstruktes in Basta-resistenten Primärtransformanden.

Transkriptanalyse der Basta-resistenten Primärtransformanden des Screens nach PEX2- Δ Zn-T7-bzw. PEX2-Wt-over-T7-Pflanzen im At-GFP-PTS-Hintergrund. PEX2- Δ Zn-T7 sowie PEX2-Wt-over-T7 werden durch Primerspezifität (s. Text) ausschließlich in den Primärtransformanden amplifiziert, weder

in At-GFP-PTS1 noch in Columbia Wildtyp. Der *Bpu10I*-Verdau des mit im Text erwähnten Primern amplifizierten 1069 bp Fragments liefert eine 943 bp- und eine 126 bp-Bande, falls die Δ Zn-Mutation im Zink RING-Finger vorhanden ist. Der Nachweis des 700 bp GFP-Fragments erfolgt mit im Text erwähnten Primern. Ein 400 bp Actin-Fragment dient als Kontrolle der Reversen Transkription.

2.3.1. PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen zeigen keinen photorespiratorisch auffälligen Phänotyp

Die T₁-Samen der Basta-resistenten Primärtransformanden wurden auf MS-Agar, dem Basta in einer Konzentration von 30 μ l/l zugegeben wird, zur Segregationsanalyse ausgebracht. Es folgt eine systematische Analyse von Rosettenblättern der 75% überlebenden homozygoten und heterozygoten Pflanzen am Confocalen Laserscanning-Mikroskop. Wie im Fall von PEX10- Δ Zn-T7-Pflanzen wurde festgestellt, dass nur ca. ein Drittel einen subzellulären Phänotyp mit in diesem Fall peroxisomaler Matrixprotein-Importstörung zeigte. Diese Pflanzen wurden durch Segregationsanalyse der T₂-Samen als die Homozygoten identifiziert. Anders als in den PEX10- Δ Zn-T7 Pflanzen ist in homozygoten PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen jedoch kein zwergenwüchsiger Phänotyp festzustellen. Aus Abbildung 53 geht hervor, dass weder die Überexpression eines

mutierten (PEX2- Δ Zn-T7 in At-GFP-PTS1) noch die Überexpression eines intakten (PEX2-Wt-over-T7) Zink RING-Finger-Konstrukts von PEX2 einen Phänotyp auslöst. Unter Normalatmosphäre sieht die repräsentativ für alle 5 aus dem *Screen* hervorgegangenen unabhängigen PEX2- Δ Zn-T7 in At-GFP-PTS1-Mutanten fotografierte Pflanze unauffällig aus, zeigt also weder Entwicklungsstörungen noch Chlorose.

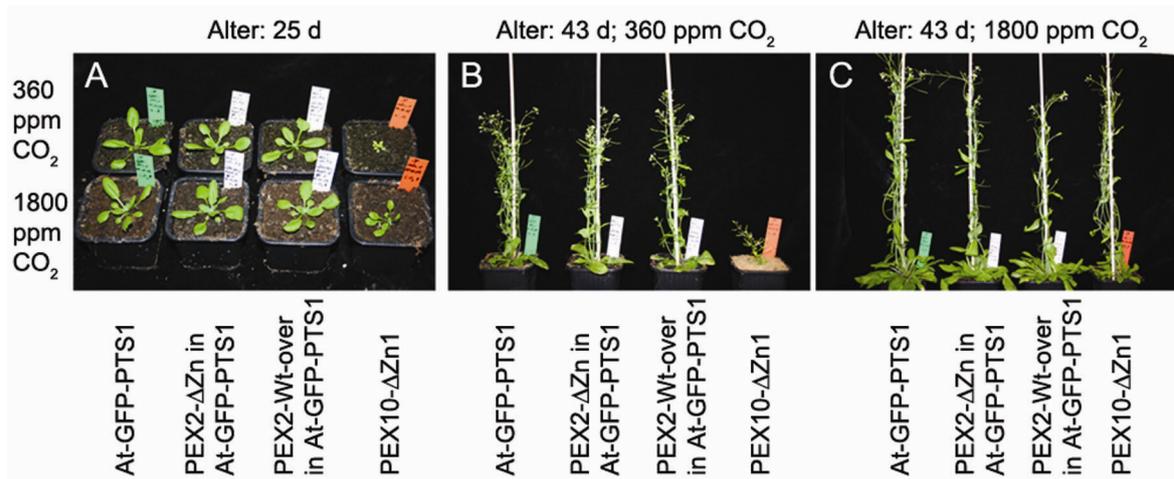


Abbildung 53: Die Überexpression des PEX2 mit mutiertem Zink RING-Finger hat keinen makroskopischen Phänotyp zur Folge. Unter Normalatmosphäre entwickelt sich die PEX2- Δ Zn-T7-Mutante unauffällig, zeigt also weder Entwicklungsstörungen noch Chlorose. A, 25 Tage alte Pflanzen in oberer Reihe unter Normalatmosphäre (360 ppm CO₂), in unterer Reihe unter Hoch-CO₂ (1800 ppm CO₂) gezogen. B, 43 Tage alte Pflanzen unter Normalatmosphäre und C, 43 Tage alte Pflanzen unter Hoch-CO₂ gezogen. Kontrollpflanzen sind auf jedem Bild links außen die At-GFP-PTS1- und rechts außen die PEX10- Δ Zn1-Linie mit bekanntem photorespiratorischen Phänotyp. Direkt neben der PEX2- Δ Zn-T7-Mutante befindet sich jeweils die PEX2-Wt-over-Kontrolle, die das Wildtyp-PEX2-T7-Konstrukt überexprimiert.

Die At-PTS2-GFP-Linie wies ein kaum detektierbares GFP-Signal auf, so daß auch die in diese Linie transformierten PEX2-Konstrukte bezüglich einer Importstörung am Confocalen Laserscanning-Mikroskop nicht auswertbar waren. Im weiteren Verlauf werden deshalb ausschließlich die in den At-GFP-PTS1-Hintergrund transformierten PEX2-Konstrukte näher charakterisiert.

2.3.2. Der Matrixprotein-Import ist in PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen deutlich gestört, die Peroxisomenform ist normal

Drei unabhängige PEX2- Δ Zn-T7-Linien im At-GFP-PTS1-Hintergrund wurden am Confocalen Laserscanning-Mikroskop auf gestörten Import peroxisomaler Matrixproteine am Beispiel des GFP mit peroxisomalem Targeting-Signal PTS1 untersucht. Eine generelle peroxisomale Importstörung sollte an einer Fehl-Lokalisation des GFP-PTS1 ins Cytoplasma erkennbar sein.

Die At-GFP-PTS1-Linie zeigt runde bis leicht ovale Peroxisomen (Abbildung 54, A-C). Auch die PEX2-Wildtyp-Überexpressionslinie (PEX2-Wt-over) weist normal geformte Peroxisomen auf, die dem Wildtyp At-GFP-PTS1 gleichen (Abbildung 54, M-O).

Die drei PEX2- Δ Zn-T7-Linien zeigen in Mesophyll und teils auch in der Epidermis ein deutlich grünes Signal netzartiger Struktur, das dem Cytoplasma zugeordnet werden kann (Abbildung 54, D-L).

In Abbildung 54 (D-L) sind unterschiedliche Blattyten dargestellt (s. Legende) um zu zeigen, dass die beobachtete Importstörung nicht auf einzelne Blatt- oder Gewebetypen beschränkt ist.

Der Anteil des GFP, der korrekt in die Peroxisomen importiert wird und diese als rundlich detektierbar macht, erlaubt die Annahme, dass die Form der Peroxisomen durch die Zink RING-Finger Mutation des überexprimierten PEX2 nicht beeinträchtigt ist (vergl. v.a. Abbildung 54D); auch scheint der physikalische Kontakt dieser Peroxisomen mit den Chloroplasten nicht gestört zu sein. Zur genauen Evaluierung dieses Befundes bedarf es allerdings der Analyse von Dünnschnitten im Licht- und Transmissionselektronenmikroskop.

Die Überexpression eines PEX2 mit dysfunktionalem Zink RING-Finger führt zu einer generellen Störung des Matrixprotein-Imports, wie an der Fehllokalisierung des GFP-PTS1 ins Cytoplasma gezeigt werden konnte.

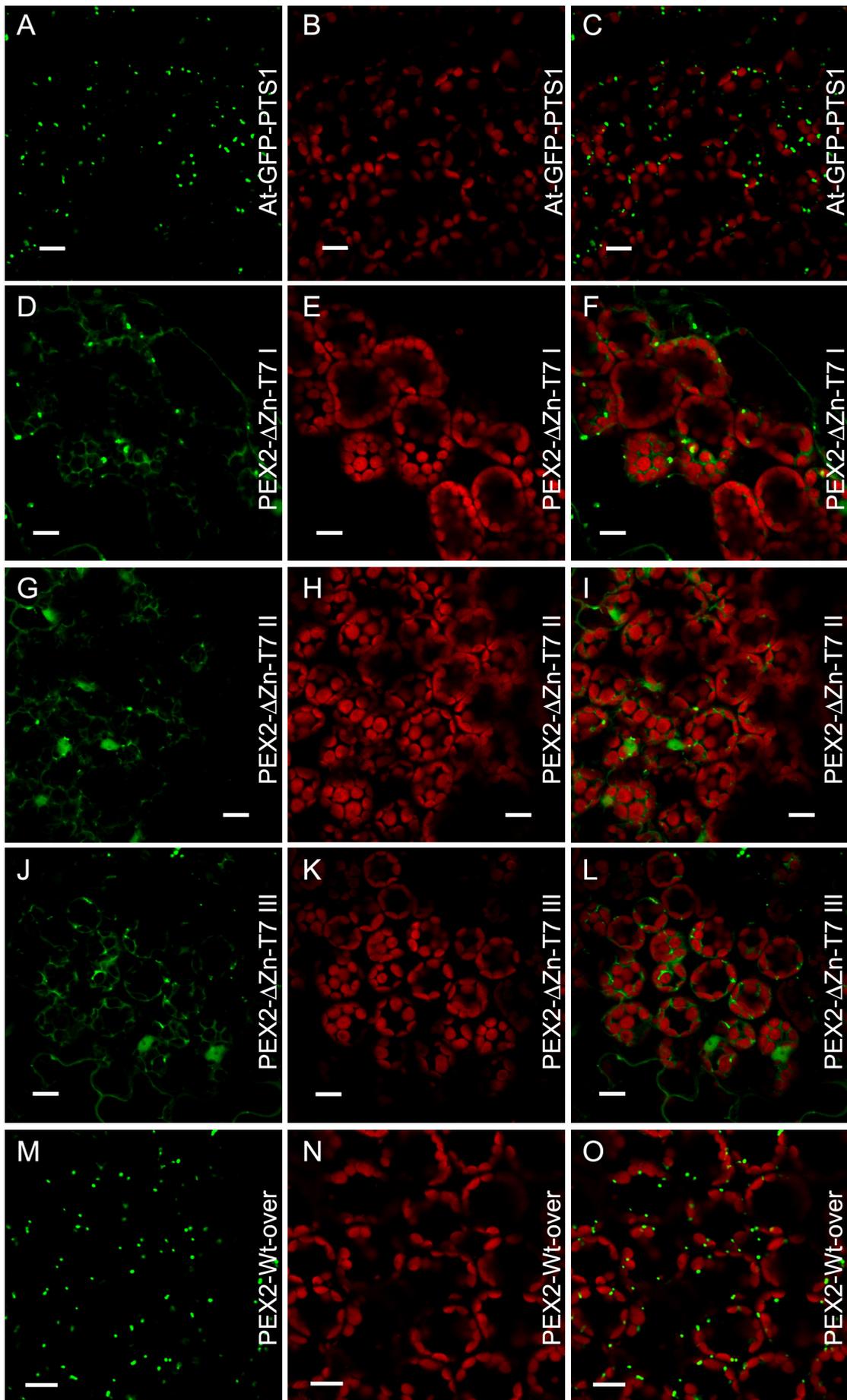


Abbildung 54: PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen zeigen deutlich gestörten Matrixprotein-Import bei normal geformten Peroxisomen. Verteilung des GFP-PTS1 in Peroxisomen und Cytoplasma von At-GFP-PTS1 (A-C), drei PEX2- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-Linien (D-F, G-I, J-L) sowie der PEX2-Wt-over-T7-Linie (M-O). Die rundliche bis leicht ovale Form der Peroxisomen wie sie in At-GFP-PTS1 und der Überexpressionslinie PEX2-Wt-over-T7 vorliegt ist in den PEX2- Δ Zn-T7-Mutanten ebenfalls nicht beeinträchtigt, ersichtlich an dem noch in die Peroxisomen importierten GFP-PTS1. In allen drei PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen ist ein netzförmiges GFP-Signal, das dem Cytoplasma zuzuordnen ist, sichtbar. In D und J sind zusätzlich Teile des Epidermis-Cytoplasmas grün gefärbt. Die flächig grünen Bereiche in G und J stellen Cytoplasmabereiche dar, die in dargestellter Schärfeebene flächig „geschnitten“ wurden. Die Aufnahmen entstammen 15 Tage alten grünen Sekundärblättern (A-C, G-I, M-O), bzw. Kotyledonen (D-F) und Primärblättern (J-L). Größenmaßstab 10 μ m.

2.3.2.1. Die Peroxisomenform ist in PEX2- Δ Zn-Pflanzen normal

Die Form der Peroxisomen der ausgewählten PEX2- Δ Zn-T7-Linie I wird am Lichtmikroskop untersucht, da in den am CLSM entstandenen Aufnahmen, aufgrund des stark gestörten GFP-PTS1-Imports, mögliche Formveränderungen der Peroxisomen vom cytoplasmatischen GFP-Signal überlagert werden könnten. Der Nachweis der runden bis ovalen Peroxisomen wird durch die Katalasefärbung und lichtmikroskopische Analyse erleichtert. Auf

Abbildung 55 sind Semidünnschnitte 12 Tage alter Rosettenblätter des Columbia Wildtyps (A) und der PEX2- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-I-Mutante (B) dargestellt. Auf beiden Bildern sind Chloroplasten (C) und Peroxisomen (P) in engem Kontakt miteinander. Die Form der Peroxisomen scheint in der PEX2- Δ Zn-T7-Mutante nicht vom Wildtyp abzuweichen, sie sind rundlich-oval und bestätigen somit den Befund der Aufnahmen am Confocalen Laserscanning-Mikroskop, dass hinter der bilddominierenden GFP-PTS1-Importstörung ein Anteil normal rund geformter Peroxisomen vorliegt. Das pflanzliche Peroxin PEX2 scheint folglich keine direkt oder indirekt formgebende Funktion in der Peroxisomenmembran zu besitzen und sein Zink RING-Finger ausschließlich für den Import von Matrixproteinen nötig zu sein.

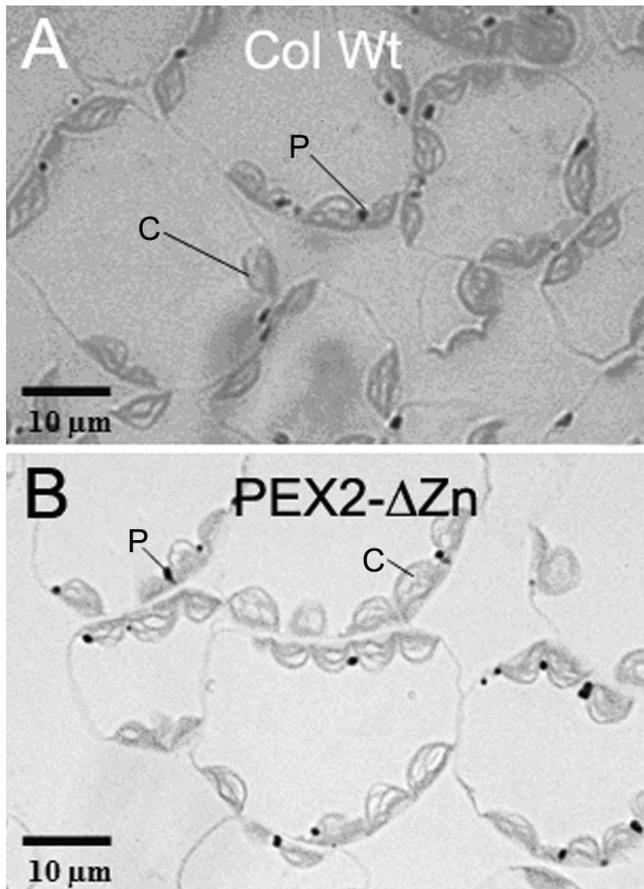


Abbildung 55: Die Peroxisomenform in PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen ist normal. A, Columbia Wildtyp; B, PEX2- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-I. Auf beiden Bildern sind die Peroxisomen (P) rundlich bis oval und in engem Kontakt mit den Chloroplasten (C). Lichtmikroskopie 500 nm dünner Blatt-Sektionen 12 Tage alter Rosettenblätter in Epoxydharz eingebettet und Katalase gefärbt (Wanner and Theimer, 1982). Vergrößerung 80x.

2.3.2.2. *In PEX2- Δ Zn-T7 ist der Organellenkontakt zwischen Peroxisom und Chloroplast nicht gestört*

Von der bereits im LM untersuchten PEX2- Δ Zn-T7-Mutante wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht, um eine präzise Vorstellung vom Organellenkontakt in PEX2- Δ Zn-Pflanzen zu bekommen.

Hierfür wurden 50-70 nm dünne Ultradünnschnitte 12 Tage alter Rosettenblätter des Columbia Wildtyps und der PEX2- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1-I-Mutante angefertigt. Abbildung 56 zeigt, dass sich die Peroxisomen der PEX2- Δ Zn-Mutante normal Katalase färben lassen und in engem physikalischen Kontakt mit benachbarten Chloroplasten stehen. In PEX2- Δ Zn sind $88 \pm 33\%$ der Peroxisomen mit einem Chloroplasten assoziiert was exakt der Situation im Wildtyp entspricht ($n=22$).

Mit einer Länge von $1,22 \pm 0,44 \mu\text{m}$ und einer Breite von $0,79 \pm 0,27 \mu\text{m}$ gleicht auch die Peroxisomenform dem Wildtyp.

Die Δ Zn-Mutation im 35S-überexprimierten PEX2-Konstrukt scheint weder die Form der Peroxisomen noch deren Kontakt mit Chloroplasten zu beeinträchtigen und weicht hierin deutlich von den Beobachtungen in den PEX10- Δ Zn-Mutanten ab.

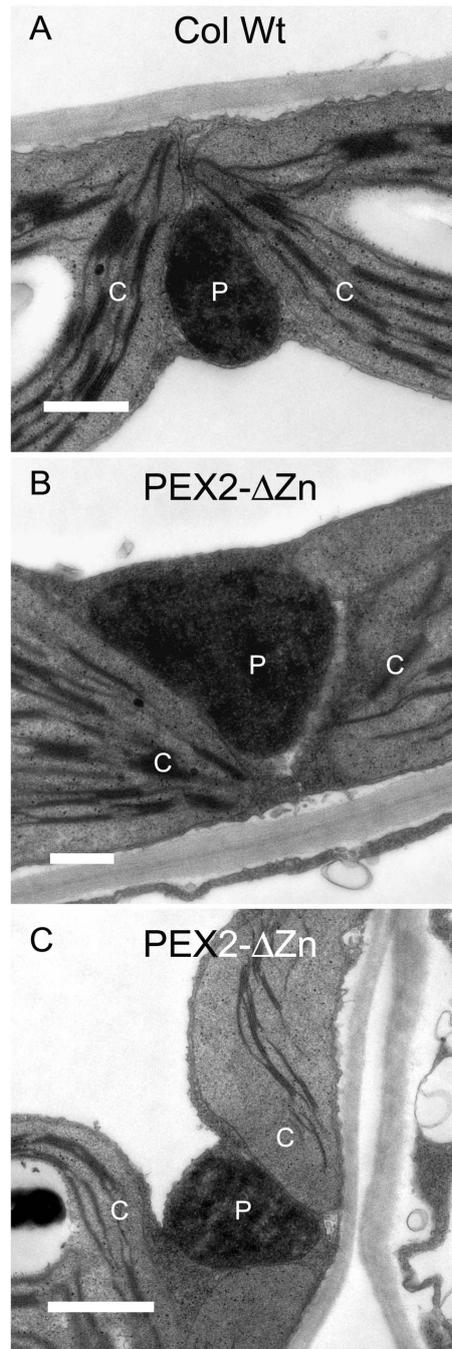


Abbildung 56: In PEX2-ΔZn-T7-Pflanzen ist der Organellenkontakt zwischen Peroxisom und Chloroplast nicht gestört. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von 12 Tage alten Rosettenblättern des Wildtyps (Col Wt) und der PEX2-ΔZn-T7 in GFP-PTS1-I-Mutante. Die Peroxisomen (P) lassen sich normal Katalase färben und stehen in engem physikalischen Kontakt mit benachbarten Chloroplasten (C). Maßstab 500 nm.

2.3.2.3. Bestätigung der generellen Matrixprotein-Importstörung von PTS1-Proteinen in PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen mittels ausgewählter Markerenzyme

Die Aktivität der Hydroxypyruvat-Reduktase (HPR) und der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase (SGAT) wird analog zu PEX10- Δ Zn-Mutanten im Rohorganellen-Pellet 43 Tage alter Rosettenblätter bestimmt, um das Ergebnis des gestörten peroxisomalen Imports PTS1-tragender Matrixenzyme unabhängig verifizieren zu können.

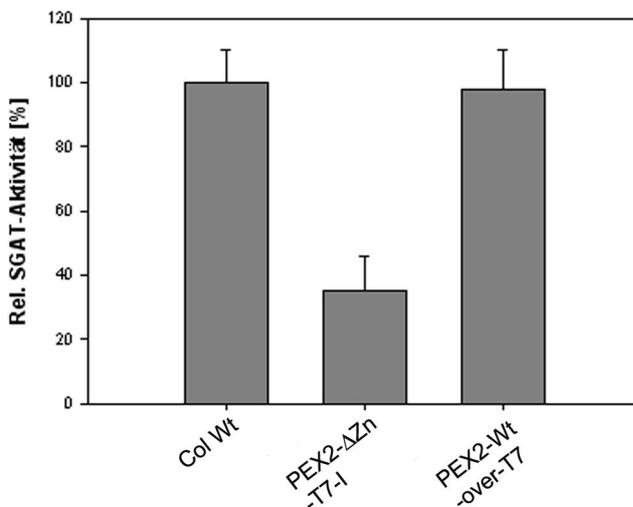


Abbildung 57: Die relative Aktivität der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase ist in PEX2- Δ Zn-T7-I signifikant erniedrigt.

Der Assay wurde am Rohorganellen-Pellet 43 Tage alter Rosettenblätter durchgeführt. Die Aktivität und damit die Importleistung für die Aminotransferase scheint in PEX2- Δ Zn-T7-I auf unter 40% des Wildtyp-Wertes erniedrigt. Die Überexpressionslinie PEX2-Wt-over-T7 verhält sich wie der Wildtyp. Die

Mittelwerte resultieren aus drei Organellen-Pellets, die zu je drei technischen Replika vermessen wurden.

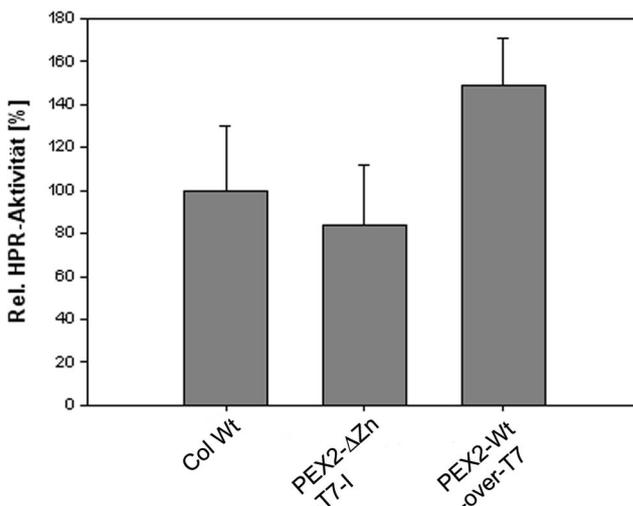


Abbildung 58: Die relative Aktivität der Hydroxypyruvat-Reduktase ist in PEX2- Δ Zn-T7-I nur geringfügig erniedrigt.

Der Assay wurde am Rohorganellen-Pellet 43 Tage alter Rosettenblätter durchgeführt. Die Aktivität der HPR und damit die Importkapazität für dieses Enzym ist in PEX2- Δ Zn-T7-I geringfügig erniedrigt, in der Überexpressionslinie PEX2-Wt-over-T7 deutlich erhöht. Die Mittelwerte resultieren aus drei Organellen-Pellets, die

zu je 10 technischen Replika vermessen wurden.

Die beiden Markerenzym-Assays geben bezüglich der Importleistung der Peroxisomen in PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen nicht ganz übereinstimmende Ergebnisse. Das Enzym Serin-

Glyoxylat-Aminotransferase hat eine Restaktivität von ca. 40%, d.h. sein Import in die Peroxisomen ist auf diesen Wert gesunken. Die Hydroxypyruvat-Reduktase wird zu immerhin noch 80% importiert. Verglichen mit den Ergebnissen der Linien PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 (Schumann, Prestele et al., 2007) und der PEX10- Δ Zn-T7-Linien scheint der punktmutierte, überexprimierte Zink RING-Finger in PEX2 zu einer deutlichen Importstörung zumindest der SGAT in die Peroxisomenmatrix zu führen. Der Befund des generell gestörten Protein-Imports mittels GFP-PTS1-Fehllokalisierung ins Cytoplasma kann folglich über zumindest einen Matrixenzym-Assay bestätigt werden.

2.3.3. Eine Metabolom-Analyse zeigt, dass der Glycolat-Zyklus in PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen trotz gestörten Matrixprotein-Imports nicht beeinträchtigt ist

Es wurde eine Metabolom-Analyse an PEX2- Δ Zn-T7-I durchgeführt, um den Einfluß des gestörten Matrixprotein-Imports auf Metabolom-Ebene zu untersuchen und die Frage einer möglichen Organellen-Kontaktstörung abschließend klären zu können.

Die Analyse wird analog zu PEX10- Δ Zn1 an 14 Tage alten, unter Normalatmosphäre angezogenen Pflanzen durchgeführt. Nach Extraktion und Derivatisierung wurden die Proben über GC-MS-TOF vermessen. Die resultierende Hauptkomponenten-Analyse der Metabolitprofile ist in Abbildung 59 abgebildet.

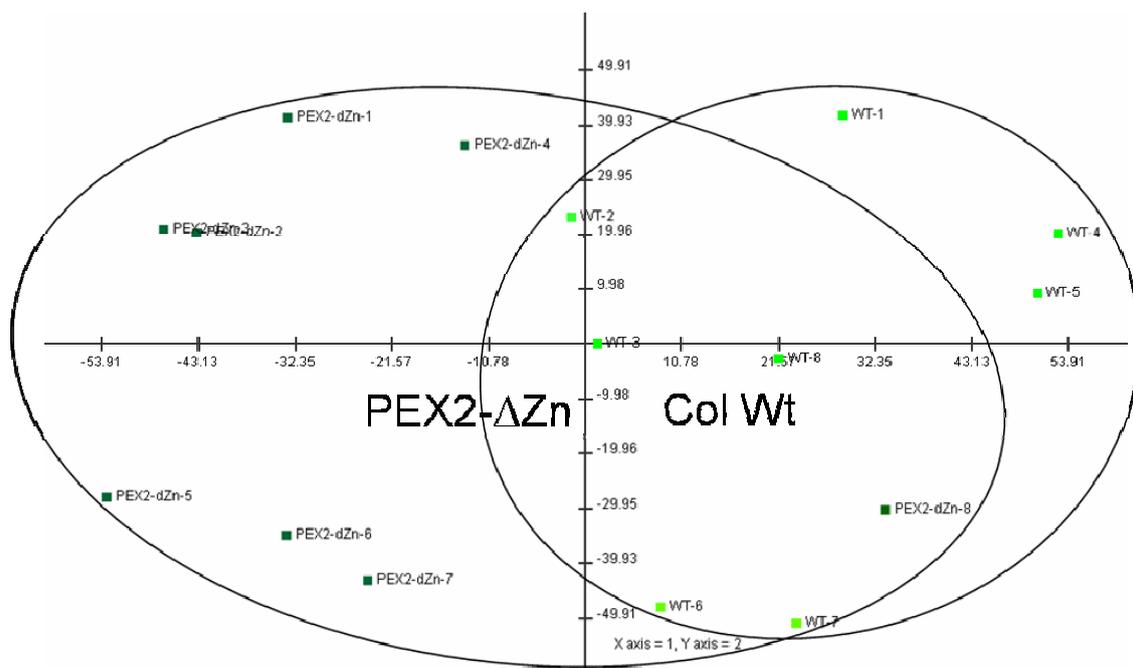


Abbildung 59: Reduzierter Matrixprotein-Import führt nicht zu einer Störung des Glycolat-Zyklus. Hauptkomponenten-Analyse (PCA) sich nicht deutlich voneinander unterscheidender Proben 14 Tage alter, unter Normalatmosphäre angezogener Pflanzen des Wildtyps und der PEX2- Δ Zn-T7-I-Mutante hinsichtlich ihrer Metabolit-Abundanzen. Dargestellt sind die normalisierten Metabolitdaten ($x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$), wobei die erste Komponente 21,8% und die zweite 19,3% der Gesamtvarianz wiedergibt. Jeder Punkt repräsentiert 57 quantitativ bestimmte Metaboliten. Es wurden acht biologische Replika aufgearbeitet und vermessen. Die dargestellten Proben sind aus Abbildung 48 herausgegriffen und ohne die PEX10-TILLING-Linien einer unabhängigen Hauptkomponenten-Analyse unterzogen worden.

Die Punktwolken von Wildtyp und PEX2- Δ Zn-T7 durchdringen sich gegenseitig, es kann keine Trennung der Probengruppen aufgrund unterschiedlicher Metabolit-Profile beobachtet werden. Die Varianz der Metaboliten zwischen den Wildtyp- und den PEX2- Δ Zn-T7-Proben ist für eine Trennung der Probengruppen in der PCA zu gering und wird mit 41,1% auf den ersten beiden Hauptkomponenten repräsentiert.

Die relativ hohe Varianz innerhalb der einzelnen Probengruppen, die große Streuung der einzelnen Proben, rührt von der ausschließlichen Verwendung biologischer Replika in diesem Experiment und dem Verzicht auf technische Replika.

In Abbildung 60 ist eine Varianz-Analyse (T-Test) abgebildet, welche die Metaboliten darstellt, die schwach signifikant zum Unterschied zwischen Wildtyp und PEX2- Δ Zn-Mutante beitragen.

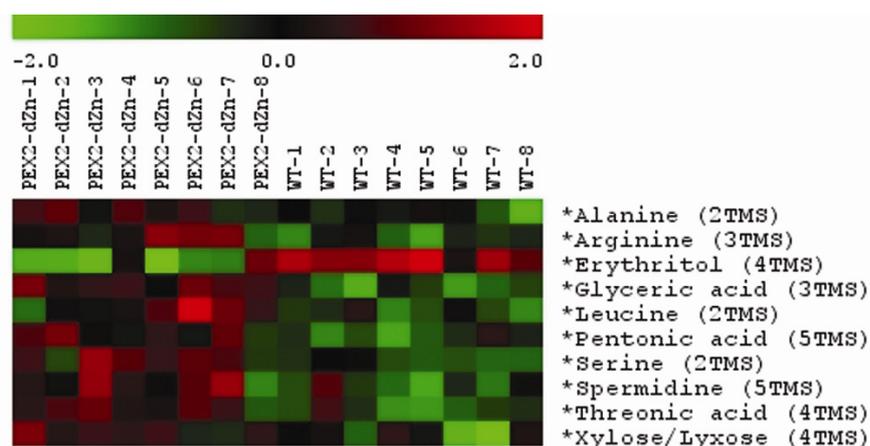


Abbildung 60: Die Metaboliten des Glycolat-Zyklus Alanin, Glycerat und Serin sind in PEX2- Δ Zn-Pflanzen erhöht. T-Test-Clustering des Wildtyps und der PEX2- Δ Zn-T7-Mutante. Farbcodierte Darstellung signifikanter Unterschiede der Metabolit-Konzentrationen unter Normalatmosphäre. Die Mutante weist für die Glycolat-Zyklus-Intermediate Serin, Alanin und Glycerat erhöhte Werte auf und unterscheidet sich hierin diametral von der PEX10- Δ Zn1-Mutante. Die rote Farbcodierung repräsentiert erhöhte Konzentrationen und grüne Farbcodierung

verminderte Konzentrationen der jeweiligen Metaboliten. Als Signifikanztest wurde der *Welch T-Test* zwischen zwei Gruppen mit ungleichen Varianzen ($p=0,01$) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit der Formel: $x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$. Es wurden acht biologische Replika aufgearbeitet und vermessen.

Die große, in der PCA beobachtete Varianz der jeweiligen Probengruppen des Wildtyps und der PEX2- Δ Zn-Mutante, so wie die gegenseitige Durchdringung der Punktwolken resultiert in nur wenigen signifikanten Unterschieden im T-Test. Trotz stark schwankender Metabolit-Abundanzen lassen sich Unterschiede zwischen Wildtyp und PEX2- Δ Zn-T7-I-Mutante finden, die in Abbildung 61 isoliert dargestellt sind. Die PEX2- Δ Zn-T7-I-Mutante weist für die Glycolat-Zyklus-Intermediate Alanin, Serin und Glycerat signifikant erhöhte Werte auf ($P<0,01$). Sie unterscheidet sich damit diametral von PEX10- Δ Zn1, die erniedrigte Abundanzen für die Glycolat-Zyklus-Intermediate aufwies.

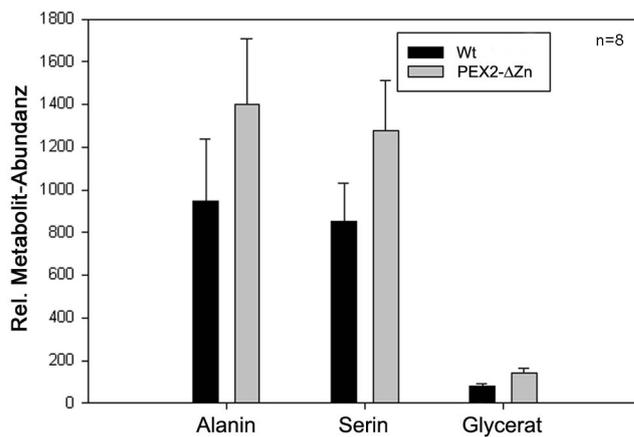


Abbildung 61: In PEX2- Δ Zn-T7 ist die rel. Abundanz der Glycolat-Zyklus-Intermediate Alanin, Serin und Glycerat signifikant erhöht ($P<0,01$). Die Mittelwerte resultieren aus je 8 biologischen Replika.

Der gestörte generelle Matrixprotein-Import von PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen, wie er sich durch die Fehllokalisierung des GFP-PTS1 ins Cytoplasma und Markerenzym-Messungen erwies, resultiert in einer erniedrigten Umsetzung der Glycolat-Zyklus-Intermediate Alanin, Serin und Glycerat, die dadurch erhöhte Abundanzen in der Metabolom-Analyse aufweisen.

In

Abbildung 62 ist der Metabolitenfluß des Glycolat-Zyklus anhand des relativen Verhältnisses aus Serin und Glycerat dargestellt.

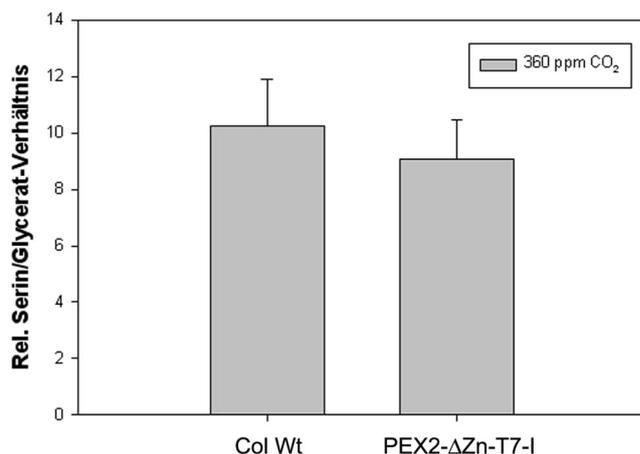


Abbildung 62: In PEX2-ΔZn-T7-Pflanzen ist der Metabolitenfluß des Glycolat-Zyklus nicht gestört. Rel. Serin/Glycerat-Verhältnis zur Demonstration des ungestörten Metabolitenflusses im Glycolat-Zyklus in Wildtyp (Col Wt) und PEX2-ΔZn-T7-I-Mutante.

Die Verhältnisse der beiden Metaboliten sind vergleichbar hoch, folglich können die Intermediate innerhalb des Glycolat-Zyklus in PEX2-ΔZn-T7-I unbehindert, d.h. vom Wildtyp nicht verschieden, zwischen den Organellen der Photorespiration „fließen“. Der Organellenkontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten (evtl. auch der Mitochondrien) ist somit nicht gestört, sonst wäre das Verhältnis aus Serin und Glycerat wie in PEX10-ΔZn1 erniedrigt.

In PEX2-ΔZn-T7-I sind Serin und Glycerat zwar erhöht, das Verhältnis zwischen beiden ist jedoch unverändert, so daß Glycerat in gleichem Maße wie im Wildtyp aus Serin metabolisiert werden kann, lediglich der Gesamtumsatz ist aufgrund des Matrixprotein-Importdefekts verringert, wodurch Alanin, Serin und Glycerat erhöhte Abundanzen aufweisen.

Die Überexpression von PEX2 und PEX10 mit jeweils dysfunktionalem Zink RING-Finger im Wildtyp-Hintergrund führt auf Metabolom-Ebene zu unterschiedlichen Ergebnissen. Der gestörte Matrixprotein-Import in PEX2-ΔZn-T7-Pflanzen resultiert in einer Reduktion des Gesamtumsatzes der Glycolat-Zyklus-Intermediate, wodurch diese erhöhte Werte aufweisen. Der gestörte Organellenkontakt in PEX10-ΔZn1 manifestiert sich in einer Reduktion der Glycolat-Zyklus-Intermediate, da ihr Austausch zwischen den Organellen der Photorespiration behindert ist.

2.3.4. Die Photosyntheseleistung ist in PEX2-ΔZn-T7-Pflanzen nicht reduziert

Die Leistungsfähigkeit des Photosystems II, Anregungsenergie in Photochemie umzuwandeln, wird in drei ausgewählten PEX2-ΔZn-T7-Pflanzen analog zu PEX10-ΔZn-Pflanzen mittels portablen Fluorometer PAM 2000 (Waltz-Effeltrich, Deutschland)

bestimmt. Aus Abbildung 63 ist zu entnehmen, dass weder die Überexpression eines intakten (PEX2-Wt-over) noch die eines punktmutierten (PEX2- Δ Zn-T7 I-III) Zink RING-Finger-Konstrukts von PEX2 zu einer Reduktion der Photosyntheseleistung unter Normalatmosphäre führt. Der unauffällige Phänotyp bezüglich Wuchs unter Normalatmosphäre (s. Abbildung 53) spiegelt sich wider in einer vom Wildtyp nicht abweichenden Photosyntheseleistung unter Normalatmosphäre. Die verbleibende Matrixenzym-Importkapazität und damit die Aktivität der entsprechenden Enzyme scheint für eine normale Entwicklung der PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen auszureichen.

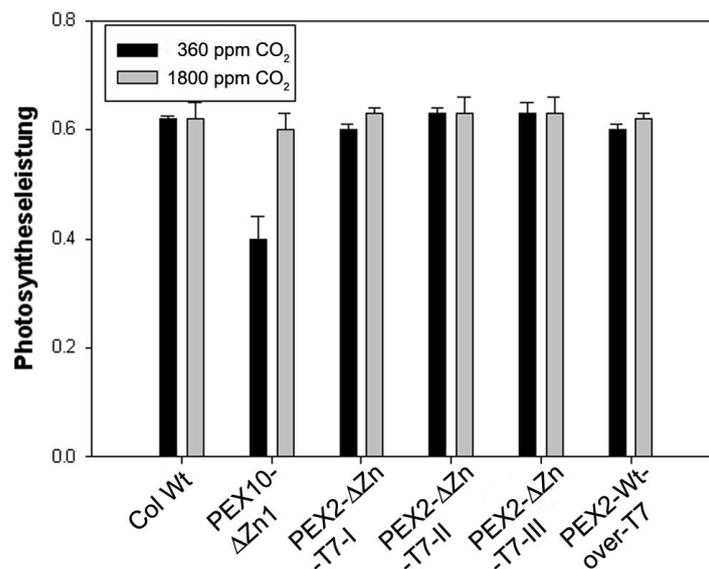


Abbildung 63: In PEX2- Δ Zn-T7-Pflanzen ist die Photosyntheseleistung nicht reduziert. Photosyntheseleistung gemessen mit portablem Fluorometer PAM 2000 (Waltz-Effeltrich, Deutschland) in drei PEX2- Δ Zn-T7-Linien (PEX2- Δ Zn-T7 I-III), der PEX2-Wt-Überexpressions-Linie (PEX2-Wt-over-T7), der PEX10- Δ Zn1-Linie mit bekannter Reduktion der Photosyntheseleistung unter Normalatmosphäre (360 ppm CO₂) verglichen mit Hoch-CO₂-Bedingung (1800 ppm CO₂) und Wildtyp (Col Wt). Alle drei PEX2- Δ Zn-T7-Linien zeigen keine Reduktion der Photosyntheseleistung unter Normalatmosphäre.

2.4. Die Klonierung des PEX12- Δ Zn-Konstruktes

Die Mutation des Peroxins PEX12 im Zink RING-Finger analog zu PEX10- Δ Zn und PEX2- Δ Zn soll die Aufgabe des Ring-Finger Motivs von PEX12 und damit die Funktion dieses Peroxins klären.

Hierzu wurde die PEX12-cDNA als Wildtyp-Konstrukt (PEX12-Wt) sowie als punktmutiertes Δ Zn-Konstrukt (PEX12- Δ Zn) über Klonierung in den Vektor pET28 a(+) (Promega, USA) mit einem T7-Tag am N-Terminus versehen, um eine Lokalisation des Peroxins mittels Immunelektronenmikroskopie und eine Säulenchromatographie potentiell zu ermöglichen.

Im ersten Schritt wurde der Zink RING-Finger mittels *Splicing-by-Overlap-Extension-PCR* punktmutiert und somit die Δ Zn-Version des Peroxins hergestellt. Es folgte die Klonierung dieser PEX2- Δ Zn-Version und einer PEX2-Wt-Version in pGEM7Zf(+) (Promega, USA). Das Subklonieren in pET28a(+) (Promega, USA) diente dem Anhängen des T7-Tags. Die Klonierung in pCAMBIA1301 (Cambia, Australien) ermöglichte die Transformation in At-GFP-PTS-Pflanzen (Mano, Nakamori et al., 2002), um am Confocalen Laserscanning-Mikroskop die Frage nach der Beteiligung des PEX12 an Import peroxisomaler Matrixproteine und formgebenden Prozessen für Peroxisomen untersuchen zu können.

2.4.1. Erstellung der PEX12- Δ Zn Version mittels *Splicing by Overlap Extension-PCR (SOE-PCR)*

Der PEX12-N- (ca. 1.100 bp) und C-Terminus (ca. 450 bp) werden in der SOE I-Teilreaktion erzeugt und innerhalb der SOE II zum PEX12- Δ Zn-Vollängenkonstrukt fusioniert, wie in Abbildung 64 dargestellt.

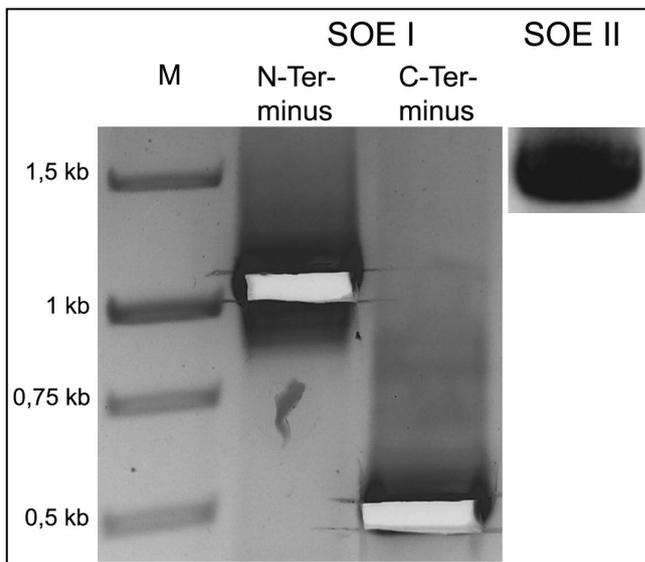


Abbildung 64: *Splicing by Overlap Extension-PCR (SOE)* an PEX12. Die mittels SOE I erzeugten N- und C-Termini von PEX12 werden in folgender SOE II zum 1,55 kb großen PEX12- Δ Zn-Vollängenkonstrukt fusioniert.

Es folgt der Verdau des PEX12- Δ Zn-Konstruktes und die Subklonierung in pGEM7Zf(+) (Promega, USA) über *Bam*HI und *Sma*I.

Abbildung 65 zeigt den Kontrollverdau positiver Klone mit *Nco*I und *Kpn*2I. *Nco*I schneidet spezifisch beide Versionen der PEX12 cDNA (Wt und Δ Zn) und erzeugt zwei Fragmente

der Größe 750 bp. *Kpn2I* schneidet aufgrund der über die Punktmutationen im Zink RING-Finger neu entstandenen *Kpn2I*-Schnittstelle nur in der Δ Zn Version der *PEX12* cDNA und liefert Fragmente der Größe 400 bp und 1150 bp. Über dieses Restriktionsenzym lassen sich folglich *PEX12*-Wt- und Δ Zn-Konstrukt diskriminieren. Zusätzlich wurden beide Versionen, *PEX12*- Δ Zn und *PEX12*-Wt, sequenziert.

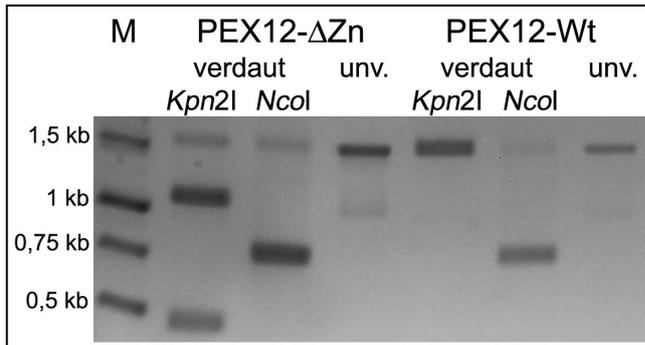


Abbildung 65: Kontrollverdau der Klonierung der Konstrukte *PEX12*-Wt sowie *PEX12*- Δ Zn in pGEM7Zf(+). Über *Kpn2I* lassen sich Wt- und Δ Zn-Konstrukt diskriminieren, da durch die SOE-PCR Punktmutationen in den Zink RING-Finger eingeführt wurden, die eine *Kpn2I*-Restriktionsschnittstelle entstehen lassen.

Der *NcoI*-Verdau dient der Kontrolle, es schneidet einmal spezifisch in der *PEX12*-cDNA.

2.4.2. Subklonierung von *PEX12*-Wt/ Δ Zn in pET28a(+)

Das Anhängen des T7-Tags, analog zu den Klonierungen von *PEX10*- und *PEX2*-T7, erfolgte hier durch Subklonierung beider *PEX12*-cDNAs (Wt und Δ Zn) via *Bam*HI und *Xho*I in den Klonierungsvektor pET28a(+), so dass der in pET28a(+) enthaltene T7-Tag 5' an die *PEX12*-cDNA angefügt wurde. Die Kontrolle der Ligation in pET28a(+) erfolgte mittels Amplifikation der *PEX12*-cDNA über die SOE-Außenprimer (s. Primerliste) und anschließendem Kontrollverdau mit *Kpn2I*, was die Unterscheidung der Δ Zn-Version von der Wt-Version der *PEX12*-cDNA ermöglicht, was auf Abbildung 66 gezeigt ist.

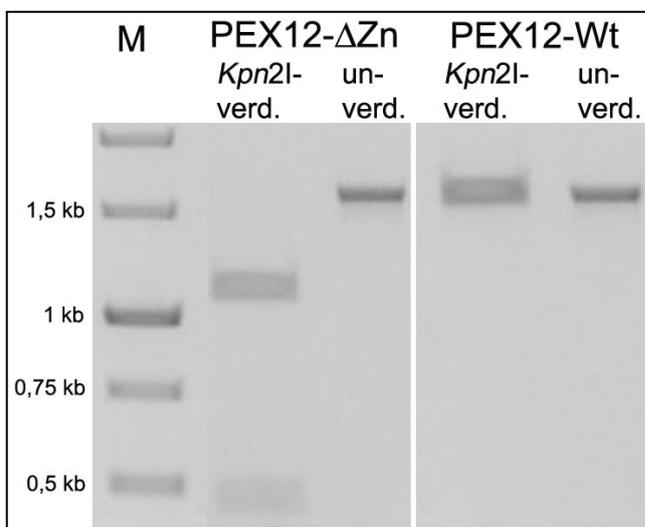


Abbildung 66: Kontrollverdau der Klonierung beider *PEX12*-cDNAs (Wt und Δ Zn) in pET28a(+). *Kpn2I* diskriminiert zwischen *PEX12*- Δ Zn- und Wt-cDNA. Die cDNA-Fragmente wurden mit den SOE-Außenprimern erhalten.

2.4.3. Ligation der *PEX12*-Konstrukte in pCAMBIA1301

Mangels geeigneter Restriktionsschnittstellen kann die *PEX12* cDNA (Wt bzw. Δ Zn) + T7-Tag nicht direkt über Verdau und Ligation aus dem Vektor pET28a(+) in den binären Vektor pCAMBIA1301 kloniert werden. Aus diesem Grund musste PCR-amplifiziert werden, um über die Primer At-*PEX12-BglII* und At-*PEX12-Eco72I* die notwendigen Schnittstellen *BglII* und *Eco72I* einzuführen. Durch PCR und Kontrollverdau wurde die erfolgreiche Klonierung in den binären Vektor pCAMBIA1301 bestätigt und beide Versionen der *PEX12*-cDNA (Wt und Δ Zn) + T7-Tag in pCAMBIA1301 wurden sequenziert.

Das *Screening* nach Hygromycin-resistenten Primärtransformanden erfolgte durch Ausbringen von je ca. 30.000 T₀-Samen auf MS-Agar_{Hygr100} unter Normalatmosphäre, um sofort einen eventuell sich entwickelnden Phänotyp auszulösen. Es wurden 19 unabhängige, Hygromycin-resistente *PEX12*-Wt-T7 in GFP-PTS1-Pflanzen, elf *PEX12*- Δ Zn-T7 in GFP-PTS1- und 21 *PEX12*- Δ Zn-T7 in PTS2-GFP-Pflanzen erhalten. Die hohe Ausbeute Hygromycin-resistenter Primärtransformanden, verglichen mit den Transformationen der *PEX10*- und *PEX2*-Konstrukte, ist auf das dreimalige Durchführen der Infloreszenz-Transformation mittels *floral dip* (Clough and Bent, 1998) zurückzuführen.

Die Überexpression des dysfunktionalen *PEX12* im At-GFP-PTS-Wildtyp-Hintergrund wird die Funktionsanalyse des Zink RING-Fingers von *PEX12* in Photorespiration, Matrixprotein-Import und Organellenkontakt in Zukunft ermöglichen.

2.5. Versuch eines *Suppressorscreens* zur Umgehung des photorespiratorischen Phänotyps in *PEX10*- Δ Zn-Pflanzen

Eine EMS-Mutagenese von Samen der in Wuchs und Photosyntheseleistung unter normalatmosphärischem CO₂-Partialdruck retardierten homozygoten *PEX10*- Δ Zn1-Mutante soll in anschließendem *Screen* auf Suppressoren dieses Phänotyps unter Normalatmosphäre Pflanzen erzeugen, die aufgrund einer *second-site* Mutation die Störung der Photorespiration der Mutante aufheben.

Die EMS-Mutagenese wurde von Prof. Dr. Erwin Grill an 25.000 Samen durchgeführt. Diese M₀-Samen wurden auf 24 Schalen, gefüllt mit Einheitserde Typ T (Fruhstorfer, Deutschland), ausgebracht und unter Hoch-CO₂ in Phytokammern angezogen (ca. 20.000 Pflanzen). Dadurch Anzucht unter Hoch-CO₂-Bedingungen wurde die Oxygenase-

Reaktion der RuBisCO und damit die photorespiratorischen Wachstumsstörungen unterdrückt, so daß möglichst viele M₁-Samen für den anschließenden *Suppressorscreen* zu Verfügung standen. Dieser wurde unter Normalatmosphäre durch Ausbringen von ca. 250.000 Samen durchgeführt und ergab das in Abbildung 67A dargestellte Verhältnis von zwergeuwüchsigen zu revertanten Phänotypen.

Das häufige Auftreten der Revertanten ließ die Wahrscheinlichkeit echter *second-site* Mutanten gering erscheinen und vermuten, dass 35S-Promotor-*Silencing* die Ursache des Phänotyps der Pflanzen war, die sich unter Normalatmosphäre supernormal entwickelten (Abbildung 67B). Daraufhin wurde eine Transkriptanalyse auf 20 ausgewählten „Revertanten“ durchgeführt, die in Abbildung 67C stellvertretend für alle untersuchten Pflanzen dargestellt ist. Die Verwendung der Primer PEX10fwd1-Sense und PEX10rev2-Antisense amplifiziert ein 248 bp großes cDNA-Fragment, das nach Verdau mit *Mbi*I in ein 176 und ein 72 bp-Fragment geschnitten wird, falls eine Δ Zn-Mutation vorliegt (s. Abbildung 67C, Plasmid-PEX10- Δ Zn). Die beiden exemplarisch für die „Revertanten“ in Abbildung 67B dargestellten Pflanzen A und B zeigen keinen Verdau des 248 bp cDNA-Fragments von PEX10 (Abbildung 67C, Gelbahnen 3 mit 6), was auf fehlende Transkription des Transgens und damit sehr wahrscheinlich auf ein *Silencing* des 35S-Promotors vor diesem Konstrukt schließen lässt und als Erklärung für den „revertanten“ Phänotyp herangezogen werden kann. Echte *second-site* Mutanten, die den in PEX10- Δ Zn-Pflanzen beobachteten, unter Normalatmosphäre zwergeuwüchsigen, chlorotischen Phänotyp durch Mutation einer Komponente des Glycolat-Zyklus oder der RuBisCO kompensieren, konnten aus diesem *Screen* nicht gezogen werden. Echte Revertanten oder Suppressoren dürften bei Wildtyp-Wuchs kein 35S-Promotor-*Silencing* zeigen.

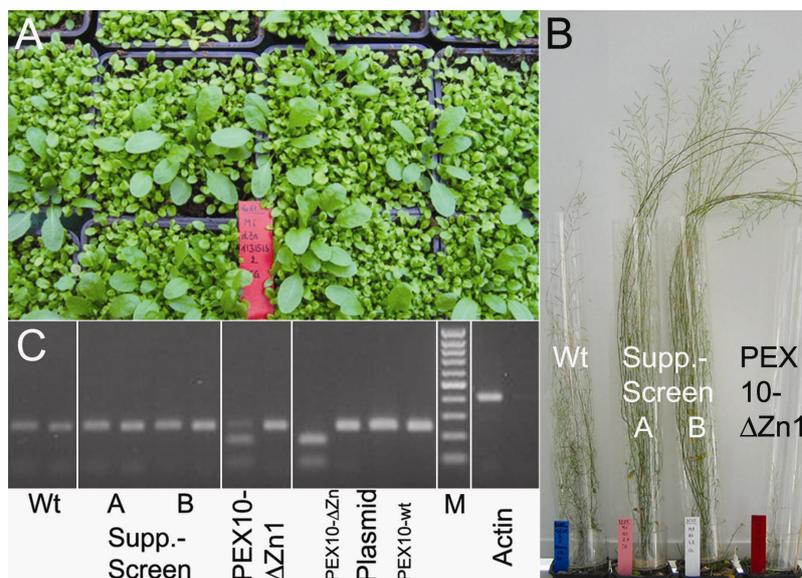


Abbildung 67: Silencing des 35S-Promotors vor dem PEX10- Δ Zn-Konstrukt ist die Ursache für den revertanten Phänotyp im Suppressorscreen. Suppressorscreen EMS-mutagenisierter PEX10- Δ Zn1-Samen. Häufiges Auftreten phänotypischer Revertanten im Screen (A) und Aufzucht ausgewählter großwüchsiger Pflanzen (B) mit anschließender Transkriptanalyse (C) zeigt den Zusammenhang zwischen revertantem Phänotyp und zugrunde liegendem *Silencing* des 35S-Promotors vor dem Δ Zn-Konstrukt. Das amplifizierte 248 bp-cDNA-Fragment wird nur bei Vorhandensein einer Δ Zn-Mutation nach Verdau mit *MbiI* in ein 176- und ein 72-bp-Fragment zerlegt, wie in den Gelbahnen 9 mit 12 (Plasmid, PEX10- Δ Zn bzw. PEX10-wt) an Plasmid-DNA gezeigt ist. Der Verdau in PEX10- Δ Zn1 (Pflanze rechts in B, Gelbahnen 7 und 8 in C) resultiert in der 176-, der 72- sowie der 248-bp-Bande, da letztere vom endogen noch vorhandenen Wildtyp-PEX10 stammt und sich somit nicht verdauen lässt. Das 248 bp-cDNA-Fragment der beiden Pflanzen A und B des Suppressorscreens (Pflanzen Mitte in B, Gelbahnen 3 mit 6 in C) lässt sich mit *MbiI* nicht verdauen, was auf fehlender Transkription des PEX10- Δ Zn-Konstrukts, also sehr wahrscheinlich auf *Silencing* des 35S-Promotors vor diesem Konstrukt beruht. *Second-site* Mutanten, die aufgrund einer Mutation z.B. eines Gens des Glycolat-Zyklus oder der RuBisCO den Δ Zn-Phänotyp kompensieren, konnten aus diesem Screen nicht gezogen werden, hierfür müssten Pflanzen ohne *Silencing* des 35S-Promotors einen mit Pflanze A und B vergleichbaren Phänotyp aufweisen. M, 100 bp-Marker (Fermentas, Kanada), 500 bp fett. 400 bp Actin8-Fragment als Kontrolle der Reversen Transkription mit (linke Bahn) und ohne Templat (rechte Bahn) in (C).

2.6. Die Klonierung eines cDNA-Fragments der Wassermelonen DEG15-Protease

Im Zuge der Dissertation von Michael Helm wurde die Glyoxysomale Processing Protease (GPP) aus 3 Tage alten, dunkelgekeimten Wassermelonenkeimblättern isoliert, über DEAE-Säulenchromatographie, präparative, native isoelektrische Fokussierung und 2D-Gelelektrophorese gereinigt und biochemisch analysiert (Helm, Lück et al., 2007).

Eine Bande auf einem Fluoreszenz-Aktivitätsgel-Assay korrelierte mit einer mittels anti-AtDEG15-Peptid-Antikörper erhaltenen Bande (Helm, 2006). Der Antikörper ist spezifisch für die *Arabidopsis*-DEG15-Protease, was die Wassermelonen-GPP als DEG15 identifizierte, zugehörig zu einer Gruppe Trypsin-ähnlicher Serin-Peptidasen mit *E. coli* DegP als Prototyp. Die Durchführung der Ak-Detektion am Westernblot eines 2D-Gels ergab Masse und pI des Proteins zu ca. 72 kD und 5,25. Da für eine Sequenzierung mengenmäßig zu wenig GPP vorhanden war, wurde die Masse von tryptischen Peptiden bestimmt. Wäre die Aminosäuresequenz der Wassermelonen-DEG15 bekannt, dann

würde die Massenbestimmung der isolierten Fragmente zur Identifizierung der DEG15 genügen.

Hier beginnt der in der vorliegenden Dissertation durchgeführte Teil der Klonierung der DEG15-cDNA aus *C. vulgaris* mittels reverser Genetik. Die Ermittlung der DEG15-cDNA-Sequenz ermöglichte die Übersetzung in die Aminosäuresequenz und damit die Zuordnung der Massen der Peptidfragmente zur DEG15-Aminosäuresequenz.

Nach Gesamt-RNA-Isolation, mRNA-Isolation, cDNA-Erststrang-Synthese und RT-PCR mit degenerierten Primern so wie einer PCR-Strategie, die das Problem niedriger cDNA-Abundanz und Unspezifität der Primer zu lösen hatte, konnte ein Fragment der *Citrullus vulgaris* DEG15-cDNA erfolgreich kloniert und sequenziert werden. Der anschließende Versuch, die Vollängen-cDNA mittels 5`- und 3`-RACE-PCR zu erhalten, schlug fehl.

2.6.1. Design degenerierter Primer zur Klonierung der Wassermelonen-DEG15

Ein mittels *T-Coffee* (Notredame, Higgins et al., 2000) erstelltes Alignment der DEG15-Aminosäuresequenzen aus *A. thaliana* und *O. sativa* war die Basis für die Entwicklung geeigneter Primer (s. Abbildung 68). Es wurden Bereiche hoher Konservierung (mit * in Abbildung 68 gekennzeichnet) herangezogen, die gleichzeitig Aminosäuren beinhalten, deren Codon einen möglichst niedrigen Degenerierungsgrad aufweist. Es galt aus diesem Grund die Aminosäuren Serin, Leucin und Arginin zu vermeiden.

```

Ath_Deg15   MDVSKVVVSFSRNFAVLVKVEGPDPKGLKMRKHAFHQYHSGNATLSASGILLPRDIFL-SG
Osa_Deg15   MAPREVA AAAARGFSAMARIVGPDPKAVKMRRHAFHLHQSGSTTLSASALLLPPGSLAEP
*      :*. : *.* : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
        :*. : *.* : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

Ath_Deg15   EVAAKVLFEAGQDMALVLTVASVVEPFLTLGHRTSSSISQDPVKLIPGAMIEIMVEGQLK
Osa_Deg15   PLLDRICAAAHGHAGGVALTSASLVEPFLVEEQRNPSQELQP-RLVPEAHLVDLVEHEES
        :  : :      * :  . : . ** ** : * * * * * .   : * . * . *   : * : * * *   : : : : * *   : .

Ath_Deg15   -----SEKESPFVWPAQLLSL-----VDVPVSSAALQSLIEA-SSGSKDSG
Osa_Deg15   RNIGGGKTGAPRWLSARLLAILYFSQQDSTVGLLVVDVQASADSVLSLLQHEGSLIRSSS
        . . . : * * : * . * : * * : : : : : : : : : : : : : : * * * . * : : : * * : : . *   : . * .

Ath_Deg15   WDIGWSLVSAANGSQPSINIEHYSKPLMQ---LDEPHNANFMAKSATRMAILGVP-LSLL
Osa_Deg15   WVCWVSLADV-NQKQVD-NDARYSLECNRNAYAEESTEPMLAKSATRIAILGVSNLNSS
** : ** . . . * . * . * : **   :   * . . : : * * * * * : * * * * . * .

```

```

Ath_Deg15  GQPSMNFASSSSKGDTLVALGSPFGILSPVNFNSVSTGSIANSYPSGSLKKSMLMIADVR
Osa_Deg15  NTRCINVSILMQQRGDSLLIMGSPFGILSPVHFFNSISVGVVANCLPPGTARSSLLMADVH
.  .:*.:  ..:***:  :*****:****:*.*  :*.  .*:  :.***:****:

Ath_Deg15  CLPGMEGAPVFAKNGHLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAIITACSHLLLEEPS----
Osa_Deg15  CLPGMEGAPVFDKNSCLVGLMLKPLRQRGSSTEVQLVITWDAICNAWNSDKLERIGHPPS
*****  **  *:*:*:****:..*:*:*:*.*  .  **  .

Ath_Deg15  --VEGKASQ--WGSEVLSVKSDASI-----PAQVAIEKAMESVCLITVNDGVWAS
Osa_Deg15  ELVDDKSSDCKYKESCVADKRRFVNSANNLNQYDVSPSLTEAISSVVLVTVSETSWAS
  *:*:*:  :  ..  :  *  :  ..  :  :*:.**  *:*:*:  ***

Ath_Deg15  GIILNEHGLILTNAHLLLEPWRYGKGGVYEGE----FKPYVLGAEEFSSTGSKFWEQKSQ
Osa_Deg15  GIILNKNGLIMITNAHLLLEPWRFRGRTSPLGLQNKIASFSEHICGGEN-----NL
*****:***:*****:*:  .  *  *  .  :  *:*:  .

Ath_Deg15  TLPKAPRNHYSSVGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWCPANVVYICKEQLDI
Osa_Deg15  LQPQCKVSNEDAVKHELSSL--FNFLGKKDRAISVRLDHGERKTWCNASVVFISKGPLDV
  *:.  .  :  :*  .:  .**  .  .  *  *  *  *  *  :  ***  *:*:*.*  **:

Ath_Deg15  ALLQLEYVPGKLQPITANFSSPPLGTTAHVVGHLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRR
Osa_Deg15  ALLQMEKTPIELCAIRPEFVCPAGSSVYVVGHLLGPRGSLSSSLSSGVVSKIVKIPST
****:*  .  *  :  *  .  :  *  .  *  :  :  *****:***.***.*:*****:***:

Ath_Deg15  LNTQISIS-QE--VAEFPAMLETTAAVHPGGSGGAVLNSSGHMIGLVTSNARHGAGTVIPH
Osa_Deg15  QHSQLSSVVEVNMDIPVMLQTTAAVHPGASGGVLLDSLGRMVGLITSNAKHGGGSTIPH
  :  *  *  *  :  :*:*:*****.***.:*  *:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Ath_Deg15  LNFSIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLDQPSEELSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLPKL
Osa_Deg15  LNFSIPCKSLEMVFKYSAK-GDFKILEQLDKPNEVLSSVWALAPTSSPFFSTSP-----
*****  *  :***:  .  :  .**:  **:*.*  ***.***  *  :  **  .  *

Ath_Deg15  LKDGNNKQTKGSQFAKFIAETQDMFVKP---TKLSRDVIPSKL
Osa_Deg15  ---NGRGGKVLEFSKFLADKQEGLSIKDIEAFLRDRIPSKI
  *.:  *  :***:***:*:  .  :  .  :  **  ****:

```

Abbildung 68: In T-Coffee (Notredame, Higgins et al., 2000) angefertigtes Alignment der beiden DEG15-Aminosäuresequenzen von *A. thaliana* und *O. sativa*. Homologe Bereiche sind mit Stern gekennzeichnet, ähnliche Aminosäuren mit 2 Punkten, weniger ähnliche mit nur einem Punkt und verschiedenartige Aminosäuren nicht gekennzeichnet. Die Homologiebereiche, die für das Design degenerierter Primer herangezogen wurden sind rot unterlegt. Auf den Aminosäuren

CLPGME sowie HLLPWP basieren die beiden Sense-Primer f-sG bzw. f-sD, auf DIALLQ der Antisense-Primer r-aD (Sequenz s. Primerliste).

Des Weiteren wurde die *codon usage* von *C. vulgaris* durch eine eigens aufgestellte Statistik (s. Abbildung 69) auf der Grundlage der bekannten cDNA-Sequenzen von prä-gMDH (Gietl, 1990) und prä-mMDH (Gietl, Lehnerer et al., 1990) wie folgt ermittelt:

Aminosäure	Codon (Alternativen)	In <i>C. vulgaris</i> bevorzugt	Bewertung (1= gut, 6= schlecht)
A	GC (TCAG)	n.s.	4
R	CG (TCAG), AG (AG)	-	5
N	AA (TC)	n.s.	2
D	GA (TC)	GAT	2
C	TG (TC)	-	2
Q	CA (AG)	-	2
E	GA (AG)	n.s.	2
G	GG (TCAG)	n.s.	4
H	CA (TC)	CAT	2
I	AT (TCA)	ATT	3
L	CT (TCAG), TT (AG)	CTN	5
K	AA (AG)	n.s.	2
M	ATG	-	1
F	TT (TC)	n.s.	2
P	CC (TCAG)	n.s.	4
S	TC (TCAG), AG (TC), (TA) (CG) C	-	6
T	AC (TCAG)	AC (TC)	4
W	TGG	-	1
Y	TA (TC)	-	2
V	GT (TCAG)	n.s.	4

Abbildung 69: Ermittlung der *codon usage* in *C. vulgaris* anhand der bekannten cDNA-Sequenzen gMDH und mMDH. Aminosäuren im Einbuchstabencode; n.s., nicht signifikant; -, *codon usage* nicht ermittelt. Bewertung der Aminosäuren für ein Primerdesign auf ihren Codons von 1 (gut), wenn Degenerierungsgrad niedrig (z.B. Tryptophan, W) zusätzlich in Fettdruck

hervorgehoben, bis 6 (schlecht), wenn Degenerierungsgrad hoch (z.B. Serin, S). *Wobble*-Möglichkeiten in Klammern.

Mit Hilfe der Information über die *codon usage* konnten die Primer f-sG bzw. f-sD, die auf der Aminosäuresequenz **CLPGME** bzw. **HLLEPW** basieren, so wie der Antisense-Primer r-aD, der auf **DIALAQ** basiert, entwickelt werden.

2.6.2. PCR-Strategie der Klonierung und Sequenzierung eines Fragments der *C. vulgaris*-DEG15-cDNA

In Abbildung 70 ist die PCR-Strategie dargestellt, die schließlich zur erfolgreichen Klonierung eines cDNA-Fragmentes der *C. vulgaris*-DEG15-Protease geführt hat.

In einer ersten PCR wurden die Primer f-sG und r-aD, die keine 5'-Restriktionsschnittstelle tragen, 8 Zyklen lang bei einer Annealingtemperatur von 45°C zum Templat gegeben. Es folgt die Zugabe der gleichen Primer, diesmal mit 5'-Restriktionsschnittstellen für *Hind*III bzw. *Eco*RI, im 9-fachen Überschuß, um über die zusätzlichen Restriktionsstellen die Spezifität der PCR etwas zu erhöhen. Es wurden 20 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von entsprechend 60°C gefahren. Das Ergebnis dieser PCR ist in Abbildung 70A dargestellt.

Die DEG15 aus *A. thaliana* hat eine Molekülmasse von 76 kD (709 As), was mit einer Nukleotidzahl von 2127 bp korreliert. Die DEG15 aus *C. vulgaris* hat laut 2-D-Gel (Helm, M., Dissertation, TU-München, 2006) eine Molekülmasse von 72 kD (entspricht ca. 655 As) und damit eine Nukleotidzahl von ca. 1965 bp. Dies entspricht in etwa 92% der Länge der *Arabidopsis*-DEG15. Daraus ergibt sich die in Abbildung 70 dargestellte, in *C. vulgaris* zu erwartende Fragmentlänge, die mit den auf *A. thaliana* und *O. sativa* entwickelten Primern f-sG und r-aD erwirtschaftet werden könnte, von 662 ± ca. 60 bp. Daraus resultiert die Größe der roten Umrandungen in Abbildung 70, die den für die Re-PCR akzeptierten Größenbereich abdecken.

Es folgen 2 Re-PCR (Abbildung 70B und C) unter exakt den gleichen Bedingungen wie Reaktion A nur von vornherein mit den Restriktionsschnittstellen-tragenden Primern. In Reaktion C konnte dann schließlich außer dem bisher erhaltenen Schmier eine schwache ca. 700 bp große Bande amplifiziert werden. Auf dieser Wurde eine vierte Re-PCR durchgeführt mit den Primern f-sD und r-aD, die keine Restriktionsschnittstellen tragen, und mit einer *Annealing*-Temperatur von entsprechend 45°C für 30 Zyklen. Der Primer f-sD liegt *nested* zum f-sG und wurde auf der Aminosäuresequenz HLLEPW designt. Die amplifizierte, ca. 300 bp lange, und damit im zu erwartenden Längenbereich liegende

Bande, wurde *blunt-end* in den Klonierungsvektor pJET (Fermentas, Kanada) kloniert und sequenziert.

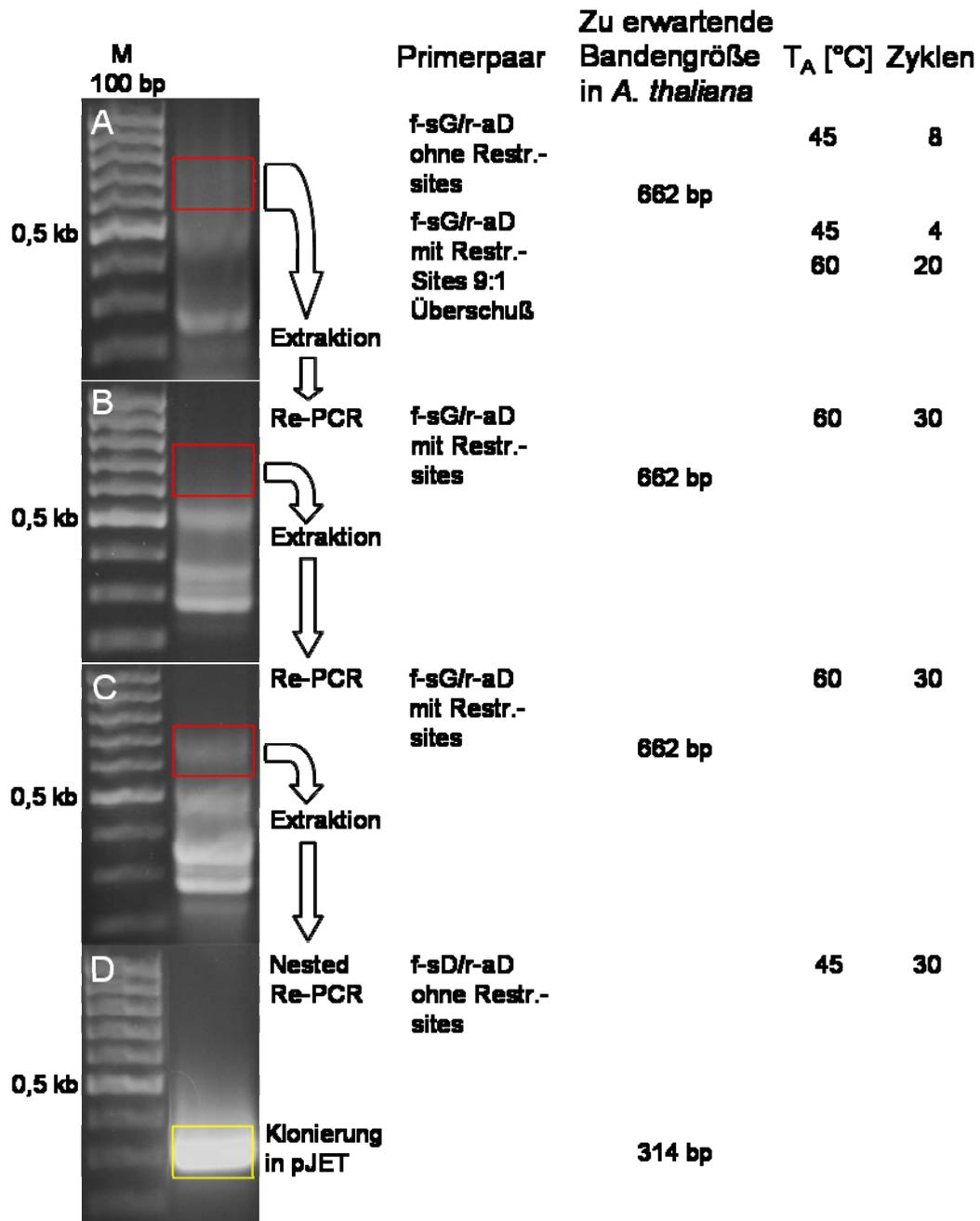


Abbildung 70: Schematische Darstellung der PCR-Strategie, die letztlich zur Klonierung des ca. 300 bp langen cDNA-Fragments geführt hat. Rot bzw. gelb umrandet sind die Bereiche, die einer Re-PCR unterzogen wurden bzw. für die Klonierung in pJET (Fermentas, USA) herangezogen wurden. Die jeweils verwendete Primerkombination ist angegeben so wie die daraus entstehende Fragmentgröße, die in *A. thaliana* zu erwarten wäre. Am rechten Bildrand sind die Annealingtemperatur und die PCR-Zyklen dargestellt. M 100bp, Molekular-Marker mit 100 bp-Schritten, 500 bp fett. Details s. Text.

Eine BLAST-Suche mit den erhaltenen Sequenzierungsergebnissen ergab neben Fragmenten der glyoxysomalen Malatsynthase und der S-Adenosyl-Methyltransferase das in Abbildung 71 rot abgebildete Fragment mit 90% Identität zum entsprechenden Bereich der *DEG15* aus *A. thaliana* (in Fettdruck dargestellt).

```
CGCAGATCATCTTCTGGAGCCGTGGAGGTTTGGAAAAGGTGGCCTAGTATATGGTGAAGG
AGACGACAATGGTTTAAAGACCTCATGTCTTAGGAGCTGAGGAGTTTTCTTCCACGAGAAG
TAGATTTTGGGAACAGGAGAGTCAAACACTGCCACGAAAAGCTCCAACAGATCTTCATGT
CAAGAAGTACAAGCACAATTTCTTCAGAGTGGGCATAGAGACATACGTGTACGGTTGTG
TGAACAAGATTCTTGGACTTGGTGTCTGCTAAAGTGGTCTATATCTGCAAGGAACAGTT
GGATGTTGCTCTACTACAATCTTTCTAGAAGATCTCTTACAATATTCTCAGCTGCCATGG
```

Abbildung 71: Sequenzierungsergebnis der Klonierung des ca. 300 bp langen *nested* Re-PCR-Fragments aus Abbildung 70 (gelb umrandet) in pJET (Fermentas, Kanada). Ein Ausschnitt des rot dargestellten Bereichs (Fettdruck) hat 90% Identität mit einem entsprechenden Fragment der *A. thaliana*-*DEG15*. Blau, die beiden PCR-Primer f-sD und r-aD. Unterstrichen, die Positivkontroll-Primer, die anhand der gewonnenen Sequenzinformation entwickelt wurden.

Abbildung 72 zeigt das BLAST-Alignment der beiden *DEG15*-Fragmente aus *A. thaliana* und *C. vulgaris*.

```
Score = 139 bits (70), Expect = 6e-30
Identities = 100/110 (90%), Gaps = 0/110 (0%)
Strand=Plus/Plus
```

```
Cvu 163 TACAAGCACAATTTCTTCAGAGTGGGCATAGAGACATACGTGTACGGTTGTGTGAACAA
      ||||| ||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||| || ||||| | | |
Ath 1498 TACAAACACAATTTCTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTTGTGTACCTA

Cvu 223 GATTCTTGGACTTGGTGTCTGCTAAAGTGGTCTATATCTGCAAGGAACA 272
      ||||||||||||||||| || ||||||||||| |||||||||||
Ath 1558 GATTCTTGGACTTGGTGTCTGCAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACA 1607
```

Abbildung 72: Alignment des klonierten *C. vulgaris*-*DEG15*-Fragments gegen einen homologen Bereich der *A. thaliana*-*DEG15* mit 90% Identität in BLAST. Fehlende senkrechte Striche zwischen den Sequenzen bedeuten Fehlpaarung. *Cvu*, *Citrullus vulgaris*; *Ath*, *Arabidopsis thaliana*. Die Zahlen vor und hinter den Sequenzen bezeichnen die jeweilige Nukleotidposition.

Dieses Alignment war Ausgangspunkt einer RACE-PCR zur Klonierung der Vollängen-*DEG15*-cDNA aus *C. vulgaris*, die allerdings fehlschlug, so daß das Projekt an diesem Punkt abgebrochen wurde.

3. Diskussion

In den ersten beiden Abschnitten dieser Arbeit wurde die Funktion des peroxisomalen Membranproteins PEX10 in *Arabidopsis thaliana* untersucht. Durch Überexpression einer im Zink RING-Finger-Motiv punktmutierten und damit dysfunktionalen Version des Peroxins (Δ Zn-Peroxin) im Wildtyp-Hintergrund wurde die Beteiligung des Peroxins und seiner Zink RING-Finger-Domäne am peroxisomalen Matrixprotein-Import und sein Einfluß auf den Kontakt zwischen Chloroplasten und Peroxisomen untersucht. Eine Analyse von Punktmutanten im N-terminalen Abschnitt von PEX10 konnte neben dem Zink RING-Finger weitere, für die Biogenese von Peroxisomen essentielle Domänen dieses Peroxins belegen.

Im dritten Teil der Arbeit erfolgte die Funktionsanalyse des peroxisomalen Membranproteins PEX2 und seines Zink RING-Fingers analog zu PEX10.

Die Klonierung je eines Wildtyp-Überexpressions- und eines Δ Zn-Konstrukts des Peroxins PEX12 und seine Transformation in *A. thaliana* war Bestandteil des vierten Abschnitts dieser Arbeit.

Innerhalb eines Screens EMS-mutagenisierter Samen der PEX10- Δ Zn1-Linie wurde nach Suppressoren des photorespiratorischen, chlorotischen Phänotyps dieser Mutante gesucht, was im fünften Teil der Arbeit beschrieben wurde.

Ein Seitenprojekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Klonierung eines cDNA-Fragments der glyoxysomalen Processing-Protease (DEG15) aus *Citrullus vulgaris* über *reverse genetics* und wurde im letzten Abschnitt dieser Arbeit behandelt.

3.1. Die Funktion der Zink RING-Finger Peroxine PEX10, PEX2 und PEX12 in Photorespiration, Matrixprotein-Import sowie Organellenkontakt zwischen Peroxisom und Chloroplast

Die lichtmikroskopischen und ultrastrukturellen Untersuchungen an vier PEX10- Δ Zn-Linien (Schumann, Prestele et al., 2007) lieferten eine Erklärung für den beobachteten Phänotyp dieser Mutanten, deren Entwicklung unter normal atmosphärischem CO₂-Partialdruck der Umgebungsluft von ca. 360 ppm stark beeinträchtigt ist. Zwergwuchs, Retardierung der Entwicklung um 4-6 Wochen und Chlorose an allen photosynthetisch aktiven Organen sowie die Normalisierung dieses Phänotyps unter Bedingungen, die die Oxygenase-Aktivität der RubisCO minimierten, sind Charakteristika klassischer

Photorespirationsmutanten. Somerville und Kollegen begannen Anfang der 80er Jahre erstmals mit der Beschreibung dieser Mutanten (Somerville, 2001). Abbildung 73 gibt einen Überblick über die Photorespiration und ihre Schlüsselenzyme. So führen Ausfälle dieser Enzyme meist zu Letalität der betroffenen Pflanzen, wenn sie unter Normalatmosphäre wachsen. Dies wurde für die beiden mitochondrialen Enzyme Glycin-Decarboxylase und Serin-Hydroxymethyl-Transferase, die Dicarboxylat-Transporter DiT1 und DiT2, die Glutamat-Synthase-Mutante *glu1* und die Glutamin-Synthetase-Mutante *gs* gezeigt. Zusätzlich zu Chlorose akkumulieren die Mutanten Ammonium in toxischen Konzentrationen und reichern bis auf die Glutamin-Synthetase-Mutante *gs* auch die schwache Säure Glyoxylat an (Somerville and Ogren, 1980; Somerville and Ogren, 1981; Somerville and Ogren, 1982; Somerville and Ogren, 1983; Wallsgrave, Turner et al., 1987). Ein Ausfall der Phosphoglycolat-Phosphatase lässt den Glycolat-Zyklus erst gar nicht beginnen und ist ebenfalls unter Normalatmosphäre letal (Somerville and Ogren, 1979).

Andere Mutanten des Glycolat-Zyklus wie *sgt* (=sat), die in dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurde, sterben in Normalatmosphäre nach Erreichen des 2-Kotyledonen-Stadiums, da die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase nicht redundant ist wie die beiden Enzyme für die Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase-Aktivität GGT1 und GGT2. Dadurch ist die *ggt1* (=aoat1) Mutante unter 360 ppm lebensfähig, zeigt jedoch einen typisch photorespiratorischen Phänotyp (Somerville and Ogren, 1980; Igarashi, Miwa et al., 2003; Liepman and Olsen, 2003). Eine Mutante, die das letzte Enzym des Glycolat-Zyklus betrifft, die Glycerat-Kinase, stellt unter Normalatmosphäre ihr Wachstum kurz nach der Keimung ein, zeigt jedoch auch unter Hoch-CO₂ ein reduziertes Wachstum (Boldt, Edner et al., 2005).

Die morphologischen Befunde der PEX10- Δ Zn-Mutanten mit teils bis zu 7 μ m elongierten Peroxisomen, deren physikalischer Kontakt mit Chloroplasten von 88% im Wildtyp auf 31% in der Mutante reduziert war, können den beobachteten photorespiratorischen Phänotyp der PEX10- Δ Zn-Mutanten unter Normalatmosphäre erklären. Die Defekte der bekannten Photorespirationsmutanten (s. a. Abbildung 73) beruhen auf dem Ausfall einzelner Enzyme des Glycolat-Zyklus, was teilweise zur Akkumulation von toxischen Werten von Glyoxylat führt, das direkt den Aktivierungszustand der RuBisCO erniedrigt und damit den Calvin-Zyklus beeinträchtigen kann (Campbell and Ogren, 1990), oder zu vermindertem Umsatz von Reduktionsäquivalenten über den Calvin-Zyklus führt, da das Recycling des C2-Körpers Glycolat über den Glycolat-Zyklus gestört ist (Wingler, Lea et al., 2000; Takahashi, Bauwe et al., 2007). In beiden Fällen ist eine Reduktion der Photosyntheseleistung mit einhergehender Chlorose unter Normalatmosphäre festzustellen. Auch die Mutanten PEX10- Δ Zn1 bis PEX10- Δ Zn4 zeigen eine Reduktion ihrer Photosyntheseleistung auf ca. 50% des Wildtypwertes. Da eine Reduktion des Matrixenzymgehalts, der den Glycolat-Zyklus beeinträchtigt hätte, so gut wie ausgeschlossen werden kann (s. 2.1.3.4 und 2.1.3.5), ist die Reduktion des Organellenkontakts zwischen Peroxisom und Chloroplast und die daraus resultierende Verschlechterung des Metabolitenaustausches über den Glycolat-Zyklus eine plausible Erklärung des Photorespirations-Phänotyps der PEX10- Δ Zn-Mutanten.

Eine Metabolom-Analyse des Wildtyps und der PEX10- Δ Zn1-Mutante (s. a. 2.1.2) zeigte, daß die Intermediate des Glycolat-Zyklus Glycin, Serin und Glycerat in PEX10- Δ Zn1 hochsignifikant gegenüber dem Wildtyp erniedrigt waren. Das Verhältnis von Serin zu Glycerat diente als Maß für den Austausch, den Fluß dieser Metaboliten zwischen den Kompartimenten des Glycolat-Zyklus und war ebenfalls hochsignifikant auf 30% des Wildtypwertes gesunken. Der Glycolat-Zyklus ist demnach in PEX10- Δ Zn-Pflanzen derart beeinträchtigt, daß sich ein konditional subletaler Phänotyp etabliert, der vergleichbar ist mit dem einer Photorespirationsmutante, die aufgrund von Redundanz eines ihrer ausgefallenen Enzyme mit photorespiratorischem Phänotyp unter Normalatmosphäre zu Wachstum fähig ist. Eine solche Situation findet sich in der Mutante, in der das *aoat1* (= *ggt1*) Gen für die Glutamat-Glyoxylat-Aminotransferase eine T-DNA Insertion enthält (Igarashi, Miwa et al., 2003). GGT2 übernimmt hier die Funktion der fehlenden GGT1. Jedoch ist die Leistungsfähigkeit des Glycolat-Zyklus erniedrigt und der Grund für den photorespiratorischen Phänotyp. Da das PEX10- Δ Zn-Konstrukt in den in dieser Arbeit verwendeten PEX10- Δ Zn-Mutanten in Gegenwart eines Wildtyp-*PEX10* Genes überexprimiert wird, kommt es zu einer „Verdünnung“ der Funktion des endogenen, intakten PEX10 durch das überexprimierte, dysfunktionale, so daß die Mutante einen

photorespiratorischen Phänotyp aufweist, aber lebensfähig ist. Der Ausfall von Enzymen, die nicht redundant sind und den Glycolat-Zyklus unterbrechen, sind alle unter Normalatmosphäre letal (Bsp. s. Abbildung 73). Solange der Glycolat-Zyklus ablaufen kann und das durch die Oxygenase-Aktivität der RuBisCO entstandene Glycolat recycelt werden kann, ist die Pflanze in der Lage auch den Calvin-Zyklus ungehindert ablaufen zu lassen und die in der Lichtreaktion gebildeten Reduktionsäquivalente in den Stoffwechsel einzubeziehen. Der Glycolat-Zyklus ist in Streß-Situationen wie hohen Temperaturen, in denen die Zufuhr von CO₂ über weniger weit geöffnete Stomata erschwert ist, als Schutzmechanismus vor Photoinhibition besonders essentiell. Dies äußert sich in einer Verstärkung des chlorotischen Phänotyps der PEX10-ΔZn-Mutanten unter Starklicht und hohen Temperaturen im Gewächshaus während des Sommers.

Abbildung 74 zeigt den Zusammenhang zwischen Störungen des Glycolat-Zyklus, dem Anstau von Reduktionsäquivalenten, dem daraus resultierenden Überschuß photochemischer Energie und sich entwickelnder Photoinhibition, die sich in einer Chlorose betroffener Pflanzen äußert.

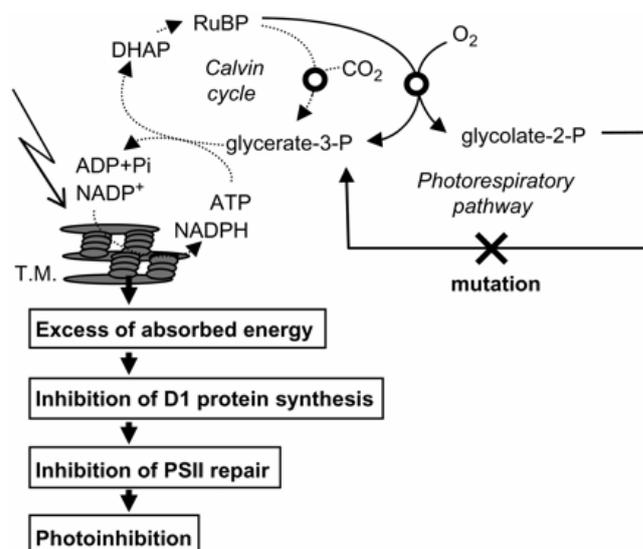


Abbildung 74: Hypothetisches Modell zur Photoinhibition des Photosystems II durch Störungen des Photorespirations-Zyklus. Abbildung übernommen aus (Takahashi, Bauwe et al., 2007)

Die Reduktion des Organellenkontaktes in den PEX10-ΔZn-Pflanzen führt zu einer Reduktion des Intermediat-Austausches über den Glycolat-Zyklus, wie in der Metabolom-Analyse gezeigt werden konnte, und hat ähnliche phänotypische Auswirkungen wie der Ausfall einzelner Enzyme des Glycolat-Zyklus, wie sie für die jeweiligen Mutanten beschrieben wurden.

Wie aus Abbildung 74 hervorgeht, kann dies zu einem verminderten Umsatz photochemischer Energie in Form von Reduktionsäquivalenten im Calvin-Zyklus führen, da die CO₂-Fixierungsrate innerhalb des Calvin-Zyklus sinkt (Wingler, Lea et al., 2000).

Die Folge davon ist ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Verbrauch photochemischer Energie, so daß die angeregten Elektronen aus Photosystem II vermehrt auf Sauerstoff in Photosystem I übertragen werden, eine von Mehler erstmals beobachtete Reaktion (Mehler, 1951). Das Resultat ist die Produktion von H_2O_2 über das Superoxid-Anion O_2^- an Photosystem I (Asada, Kiso et al., 1974). Wird Wasserstoffperoxid nicht effizient genug über Disproportionierung beseitigt, kann es die De-novo-Synthese von Proteinen des Photosystems II, vornehmlich des D1-Proteins, hemmen (Nishiyama, Yamamoto et al., 2001), (Nishiyama, Allakhverdiev et al., 2005), (Nishiyama, Allakhverdiev et al., 2006). Die Folge ist eine Reduktion der Photosyntheseleistung wie sie für die Pflanzen PEX10- ΔZn1 bis PEX10- ΔZn4 und andere Photorespirationsmutanten gezeigt werden konnte (Somerville, 2001; Schumann, Prestele et al., 2007). Die Bildung des hoch reaktiven Singulett-Sauerstoffs durch die Interaktion von in den Triplett-Zustand angeregtem P680* mit Sauerstoff ist eine weitere Quelle oxidativer Schädigung (Kozaki and Takeba, 1996; Osmond, Badger et al., 1997).

Auch kann der Überschuß an Excitationsenergie in PSII den *Oxygen-Evolving-Complex* (OEC) schädigen, was zur Freisetzung von Mangan-Ionen und zu einem Erliegen des Elektronennachschubs aus Wasser führt. Dadurch wird die Lebensspanne des Photosynthese-Reaktionszentrums im oxidierten Zustand P680+ erhöht, das ein starkes Oxidationsmittel ist und umliegende Proteine und Chlorophyll oxidiert (Chow, Lee et al.). Die Folge ist eine Bleichung wie sie in den PEX10- ΔZn -Linien und anderen Photorespirationsmutanten anhand der Chlorose deutlich wird. Die verringerten Werte für Chlorophyll a und b in den PEX10- ΔZn -Pflanzen und den Pflanzen mit Mutationen in den Enzymen GLYK, GOGAT, SHMT und DiT2 konnten unter Normalatmosphäre gezeigt werden (Schumann, Prestele et al., 2007; Takahashi, Bauwe et al., 2007). Durch Anzucht unter Hoch- CO_2 -Bedingungen kommen Beeinträchtigungen des Glycolat-Zyklus gar nicht zum Tragen, da die Notwendigkeit dieses Zyklus hinfällig wird, wenn kein Glycolat gebildet wird. Der Calvin-Zyklus kann folglich unter ausschließlicher Produktion zweier Moleküle 3-Phosphoglycerat die Reduktionsäquivalente aus der Lichtreaktion nahezu vollständig abnehmen, so daß Produktion und Verbrauch photochemischer Energie im Gleichgewicht sind.

Beeinflußt der in den Photorespirationsmutanten beobachtete oxidative Streß den Organellenkontakt in PEX10- ΔZn -Mutanten?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine Metabolom-Analyse an der PEX10- ΔZn1 -Mutante mit dem stärksten photorespiratorischen Phänotyp durchgeführt, die unter 1800 ppm CO_2 , d.h. unter Hoch- CO_2 -Bedingungen angezogen wurde. Die PEX10- ΔZn -Mutanten zeigen unter diesen Bedingungen Wildtyp-Wuchs und keinerlei Anzeichen

oxidativen Stresses wie Chlorose. Das Metabolitprofil (s. 2.1.7.1) zeigte, daß selbst unter „Nicht-Streß-Bedingungen“ die Intermediate des Glycolat-Zyklus Glycin, Serin und Glycerat signifikant zum Wildtyp erniedrigt waren. Da 1800 ppm CO₂ zwar ausreichen den Phänotyp zu unterdrücken nicht jedoch die Photorespiration gänzlich, findet eine geringfügige Fixierung von Sauerstoff in Form von 2-Phospho-Glycolat statt, das über den Glycolat-Zyklus zur CO₂-Fixierung rückgeführt wird. Da das Verhältnis aus Serin zu Glycerat, als Maß für den Metabolitenfluß innerhalb des Glycolat-Zyklus, jedoch auch unter Hoch-CO₂ signifikant niedriger ist als das im Wildtyp, ist der Austausch der Intermediate auch unter diesen Bedingungen beeinträchtigt. Dieser Befund kann mit einem reduzierten Organellenkontakt zwischen Chloroplast, Peroxisom und evtl. auch Mitochondrien, wie er bereits unter Normalatmosphäre gezeigt wurde, erklärt werden. Somit hat oxidativer Streß keinen Einfluß auf den Kontakt der Organellen der Photorespiration in der PEX10-ΔZn-Mutante.

Die sat-Mutante war eine der ersten von Somerville und Kollegen beschriebenen Photorespirationsmutanten, und Liepman und Olsen identifizierten eine Punktmutation (P251L), die für den Verlust der Aminotransferase-Aktivität verantwortlich war (Somerville and Ogren, 1980; Liepman and Olsen, 2001). Die Mutante ist konditional letal und nur unter Hoch-CO₂ zur Entwicklung fähig. In dieser Arbeit sollte die sat-Mutante ebenfalls die Frage beantworten, in wie weit oxidativer Streß den physikalischen Kontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten beeinflusst. Dazu wurden Blätter der Mutante, die unter Hoch-CO₂ angezogen wurde und für 72 h in Normalatmosphäre überführt wurde bzw. Blätter der Mutante, die unter Dauer-Hoch-CO₂ wuchsen, unter dem Lichtmikroskop und Transmissionselektronenmikroskop untersucht. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen war eine Verlängerung der Peroxisomen festzustellen, wenn das entsprechende Blatt von einer für 72 h in Normalatmosphäre überführten Pflanze stammte. Unter Dauer-Hoch-CO₂ erfolgte diese Formänderung nicht; lediglich der Durchmesser der Peroxisomen war wie im Wildtyp leicht vergrößert. In der sat-Mutante akkumulieren Glyoxylat, das den Aktivierungszustand der RuBisCO herabsetzt und dadurch zur Photoinhibition beiträgt, und Serin, da die Desaminierung zu Hydroxypyruvat nicht stattfinden kann. Dieser Metabolitenstau könnte zur beobachteten Formveränderung der Peroxisomen führen. Eine vergrößerte Peroxisomen-Oberfläche gestattet Glycin als Vorstufe von Serin vermehrt mit Cytosol und/oder Chloroplasten ausgetauscht zu werden, zumal der Glycolat-Zyklus die Hauptquelle des Glycins zur Synthese von Glutathion (GSH) ist (Noctor, Arisi et al., 1999). Glutathion ist eine wichtige zelluläre Komponente zur ROS-Detoxifikation (Noctor and Foyer, 1998). Die Oberflächenvergrößerung der Peroxisomen könnte eine Reaktion der sat-Mutante sein, oxidativen Schäden zu begegnen. Allerdings kann die Reihenfolge von oxidativem Streß und Formveränderungen an Peroxisomen

nicht genau geklärt werden. Der Metabolitenstau ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ursache für den oxidativen Streß, da die Rückführung des Glycolats in den Calvin-Zyklus beeinträchtigt ist; ob oxidativer Streß allerdings die Formveränderung der Peroxisomen nach sich zieht oder die Formveränderung eine Folge des Metabolitenstaus ist, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Die normal geformten Peroxisomen unter Dauer-Hoch-CO₂ können bedeuten, daß bei kaum stattfindender Photorespiration kein Metabolitenstau auftritt und damit keine Formstörung der Peroxisomen zu beobachten ist; sie können aber auch bedeuten, daß die Pflanze unter Hoch-CO₂ nur wegen Wegfalls des oxidativen Streß normal geformte Peroxisomen aufweist.

Die Analyse von TEM-Bildern ergab einen schwach signifikant reduzierten Organellenkontakt Peroxisom zu Chloroplast in der sat-Mutante 72 h unter Normalatmosphäre, der sich auf den Hoch-CO₂-Aufnahmen nicht beobachten ließ. Auf Grund der geringen Anzahl verfügbarer TEM-Aufnahmen muß dieser Befund noch auf eine breitere Basis gestellt werden.

Drei Tage nach der Blattentnahme für die Mikroskopischen Aufnahmen, d.h. sechs Tage nach Transfer der sat-Mutante von Hoch-CO₂ (zur Anzucht) nach Normalatmosphäre, war die Mutante tot. Organellenformveränderungen im Zuge apoptotischer Prozesse unter Beteiligung der Proteine Mff (*Mitochondrial fission factor*), Drp1 (*Dynamamin related protein 1*) und Fis1 (*Fission 1*), die an der Teilung von Mitochondrien und Peroxisomen beteiligt sind, wurden für Mitochondrien und Peroxisomen in *Drosophila* beschrieben (Gandre-Babbe and van der Bliek, 2008). Ein beginnender Zelltod in der sat-Mutante zum untersuchten Zeitpunkt könnte also ebenfalls Auslöser einer Formveränderung von Peroxisomen in der sat-Mutante sein. Ob dadurch - oder ausgelöst durch Oberflächenvergrößerung zum Zwecke des Glycin-Austauschs - zusätzlich auch der Organellenkontakt beeinträchtigt ist, kann an dieser Stelle nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Unter Einbezug der Abbildung 74 wird ersichtlich, daß oxidativer Streß, der sich in Photoinhibierung äußert, die Folge einer gestörten Photorespiration ist. Diese Störung der Photorespiration wird in der sat-Mutante durch einen Metabolitenstau ausgelöst, der auf dem Ausfall eines Schlüsselenzyms der Photorespiration beruht. Ob die mögliche Beeinträchtigung des Organellenkontaktes durch den Metabolitenstau direkt, oder über den sich entwickelnden oxidativen Streß indirekt ausgelöst wird, ist unklar. Über die sat-Mutante kann folglich die Frage, ob oxidativer Streß einen Kontaktverlust zwischen Peroxisomen und Chloroplasten auslösen kann, nicht vollständig beantwortet werden.

In PEX10-ΔZn1 ist der Metabolitenaustausch über den Glycolat-Zyklus durch verringerte physikalische Kontaktfläche reduziert; dadurch ist die Leistungsfähigkeit des Calvin-Zyklus beeinträchtigt, und das Ungleichgewicht zwischen Produktion und Verbrauch

photochemischer Energie resultiert in oxidativem Streß, der sich als Photoinhibition äußert. Oxidativer Streß ist folglich in PEX10- Δ Zn1 nicht der Auslöser des reduzierten Organellenkontakts, sondern eine Folge davon.

Die durch die Photoinhibierung noch verstärkte Reduktion der Photosyntheseleistung führt u.a. auch zur verringerten Einlagerung von Reservestoffen in die Kotyledonen von PEX10- Δ Zn-Linien, was sich in einem reduzierten Tausendkorngewicht der Samen äußert (s. 2.1.5).

Es sollte die Frage geklärt werden, ob PEX10 am Import peroxisomaler Matrixproteine beteiligt ist. Die Funktion aller drei in der vorliegenden Arbeit behandelten Zink RING-Finger Peroxine wird mit dem Matrixprotein-Import in Peroxisomen in Zusammenhang gebracht.

Die PTS-Rezeptoren Pex5p (PTS1-Rezeptor) und Pex20p (PTS2-Co-Rezeptor) akkumulieren in Hefe und Säugern an der Peroxisomenmembran, wenn die RING-Finger Peroxine dysfunktional sind (Dodt and Gould, 1996; Chang, Warren et al., 1999). Auch konnte gezeigt werden, daß der Ausfall eines der drei Peroxine zum Zerfall des heteromeren Komplexes aus PEX10, PEX2 und PEX12 führt und damit zum Verlust des Rezeptor-Recyclings und einem gestörten Matrixprotein-Import (Chang, Warren et al., 1999; Okumoto, Abe et al., 2000; Hazra, Suriapranata et al., 2002; Weller, Gould et al., 2003; Zhang, Leon et al., 2006).

Auch wenn der genaue Mechanismus der Ubiquitinierung der Importrezeptoren Pex5p Pex18p und Pex20p, sowie eventuell Pex7p, noch nicht bekannt ist, so gibt es deutliche Hinweise, daß Ubiquitinierung für das Recycling der Importrezeptoren essentiell ist.

Der erste Schritt der Ubiquitinierung von Substratproteinen ist die Aktivierung des Ubiquitins durch Knüpfung einer Thioether-Bindung zwischen Ubiquitin und einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1). Es folgt die Übertragung des aktivierten Ubiquitins auf eine weitere Thiolgruppe eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2 oder Ubc). Der Transfer des Ubiquitin-Restes auf das Substrat erfolgt mit Hilfe der E3-Ubiquitin-Ligasen, die die räumliche Nähe zwischen E2 und Substrat herstellen.

Eine Polyubiquitinierung, vermittelt durch das E2-Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc4p, bewirkt die Degradation der Rezeptoren über das Proteasom, während Monoubiquitinierung durch das E2-Ubiquitin-konjugierende Enzym Pex4p am Recycling der Rezeptoren beteiligt ist (Kragt, Voorn-Brouwer et al., 2005). Beide Ubiquitinierungsarten sind abhängig von der Lokalisation der PTS-Rezeptoren an der Peroxisomenmembran, da Beeinträchtigungen des Docking-Apparates zu einer Reduktion der Ubiquitinierung von Pex5p führen. Die Monoubiquitinierung ist des Weiteren abhängig von einem funktionierenden Zink RING-Finger-Komplex.

Fallen die erst spät in das Recycling involvierten AAA-ATPasen Pex1p und Pex6p aus, ist die Freisetzung der Rezeptoren ins Cytosol beeinträchtigt, unabhängig von der Anzahl angehängter Ubiquitinreste.

Die Monoubiquitinierung der PTS-Rezeptoren kann möglicherweise vom RING-Finger-Komplex zusammen mit Pex4p katalysiert werden, da eine Pex22p-abhängige Interaktion von Pex10p mit Pex4p nachgewiesen wurde und dieses Zusammenspiel einer E3-Ligase mit einem E2-konjugierenden Enzym eine Voraussetzung für Ubiquitinierungsprozesse ist (Lorick, Jensen et al., 1999; Eckert and Johnsson, 2003). Des Weiteren zeigt die RING-Domäne von Pex10p hohe Sequenzähnlichkeit mit der RING-Domäne des humanen c-Cbl-Proteins, dessen E3-Ligase-Aktivität nachgewiesen wurde (Joazeiro, Wing et al., 1999). Für die Interaktion von PEX12 mit PEX10 konnte in Säugern der Zink-Finger als essentiell belegt werden und PEX12 interagiert über seinen Zink-Finger ebenfalls mit dem PTS1-Rezeptor PEX5 (Chang, Warren et al., 1999).

In Pflanzen wurden weder die Komplexbildung der drei RING-Peroxine noch die Ubiquitinierung eines Import-Rezeptors untersucht. Da aber alle Komponenten für eine Ubiquitinierung in Hefe, Säugern und Pflanzen konserviert sind, dürfte ein ähnlicher Ablauf auch in Pflanzen vorliegen.

Da homozygote KO-Mutationen der drei RING-Peroxine in Pflanzen zu Embryoletalität führen (Hu, Aguirre et al., 2002; Schumann, Wanner et al., 2003; Sparkes, Brandizzi et al., 2003; Fan, Quan et al., 2005), wurden RNAi-Linien erzeugt, die aufgrund der *down-regulation* der jeweiligen Peroxine nicht letal waren, sondern einen klassischen photorespiratorischen Phänotyp zeigten (Hu, Aguirre et al., 2002; Fan, Quan et al., 2005; Nito, Kamigaki et al., 2007). Nito und Kollegen (2007) konnten in den *knock-down*-Linien, die die RING-Peroxine betrafen, durchweg einen gestörten Import von GFP-PTS1 nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung des Imports peroxisomaler Matrixproteine das jeweilige Δ Zn-Konstrukt der Peroxine PEX10, PEX2 und PEX12 im At-GFP-PTS-Genotyp überexprimiert. Zur Untersuchung an PEX10 wurde zusätzlich die bereits vorliegende PEX10- Δ Zn1-Mutante (Schumann, Prestele et al., 2007) mit der At-GFP-PTS1-Linie gekreuzt. Des Weiteren wurden peroxisomale Markerenzym-Assays durchgeführt. Die Kreuzung PEX10- Δ Zn1xAt-GFP-PTS1 zeigte auch am Confocalen Laserscanning-Mikroskop keine cytoplasmatische Lokalisation des GFP-PTS1, was die lichtmikroskopischen und transmissionselektronenmikroskopischen Befunde unterstützt. Zwei der drei neu transformierten PEX10- Δ Zn-T7-Linien zeigten eine begrenzte peroxisomale Formveränderung und eine leichte Importstörung des GFP-PTS1. Im Hydroxypyruvat-Reduktase-Assay konnte dieser leichte Importdefekt jedoch nicht

bestätigt werden, so daß die Störung des Matrixprotein-Imports des GFP-PTS1 nur von geringem Ausmaß sein dürfte.

Die phänotypischen Unterschiede zwischen der PEX10- Δ Zn1-Linie und den drei neu transformierten PEX10- Δ Zn-T7-Linien könnten in unterschiedlichen Transkriptmengen-Verhältnissen zwischen endogenem, intaktem und überexprimiertem, dysfunktionalem PEX10 liegen. Eine quantitative RT-PCR könnte auch die Unterschiede der drei PEX10- Δ Zn-T7-Linien untereinander klären, von denen sich nur eine der drei Linien durch erhöhte CO₂-Konzentration zu normaler Entwicklung bringen läßt (s. 2.1.3.2). Die durchweg nicht vorhandene Chlorose in diesen drei Linien und die weniger stark ausgeprägte Peroxisomen-Formstörung könnten mit einem PEX10:PEX10- Δ Zn-Verhältnis erklärt werden, das verglichen mit der PEX10- Δ Zn1-Mutante größer ist. Einzig die Tatsache, daß zwei der drei neu transformierten Linien durch Hoch-CO₂ nicht zu beeindrucken sind, ist inkonsistent, denn man würde erwarten, daß ein schwächerer Phänotyp sich eher durch CO₂ retten läßt, als ein starker. Den ausgeprägtesten photorespiratorischen Phänotyp hat dagegen die PEX10- Δ Zn1-Pflanze, die sich sehr leicht durch Hoch-CO₂ in einen vom Wildtyp nicht unterscheidbaren Phänotyp retten läßt. Diese Mutante zeigte hingegen auch am Confocalen Mikroskop ausschließlich formgestörte Peroxisomen und keine Import-Defizienz. Das trifft auch für die dritte der T7-Tag-haltigen PEX10- Δ Zn-Linien zu, deren Wuchs sich durch Hoch-CO₂ in Richtung Wildtyperscheinung verschieben läßt. Aber auch sie zeigte keine Chlorose, sondern lediglich wie die beiden anderen Linien unter Normalatmosphäre eine um 4-6 Wochen verzögerte Entwicklung. Der am N-Terminus des PEX10 angebrachte T7-Tag hat folglich einen Einfluß auf die Entwicklung der Pflanze, d.h. einen Einfluß auf die Funktionalität des Peroxins. Vorstellbar wäre eine leicht reduzierte Interaktion des PEX10 mit sich und Interaktionspartnern in der Peroxisomenmembran, die zu einer leichten Beeinträchtigung des Proteins beiträgt in Bezug auf Photorespiration und Matrixprotein-Import. Die schwächer ausgeprägte Formstörung der Peroxisomen der PEX10- Δ Zn-T7-Linien spricht für ein höheres Transkriptionsverhältnis PEX10:PEX10- Δ Zn, so daß sich keine Chlorose ausbildet, jedoch eine leichte Wachstumsverzögerung. Der T7-Tag kann evtl. die Interaktion mit den beiden anderen am vermutlichen Komplex beteiligten Peroxinen PEX2 und PEX12 beeinträchtigen, so daß die Funktion dieses Komplexes, nämlich der Import von Matrixprotein (das Rezeptor-Recycling), gestört ist. Tatsächlich entwickeln diese T7-Tag-Linien auch eine leichte Matrixprotein-Importstörung, die am CLSM beobachtet werden konnte (s. 2.1.3.4). Die nicht reduzierte Photosyntheseleistung dieser PEX10- Δ Zn-T7-Mutanten ist mit der fehlenden Chlorose kongruent (s. 2.1.3.3).

Schumann und Mitarbeiter (2007) konnten zeigen, daß das Primärwurzelwachstum der PEX10- Δ Zn-Mutanten erst ab dem dritten Tag nach Keimung, d.h. mit Beginn der Photoautotrophie, hinter dem des Wildtyps zurückbleibt. Eine Beeinträchtigung der Glyoxysomen durch die Δ Zn-Mutation in PEX10 wurde deshalb für unwahrscheinlich gehalten. Ein Wurzelwachstums-Assay auf IBA-haltigem MS-Agar sollte Aufschluß geben, ob die beobachteten peroxisomalen Defekte der PEX10- Δ Zn-Mutanten (Schumann, Prestele et al., 2007) auch die Glyoxysomen betreffen.

Indol-Buttersäure (IBA) wird mittels der Enzyme der β -Oxidation zum Auxin Indol-Essigsäure metabolisiert, das hemmende Eigenschaften auf das Längenwachstum der Primärwurzel besitzt. Alle vier PEX10- Δ Zn-Linien zeigten eine vergleichbare Hemmung des Primärwurzelwachstums wie der Wildtyp, woraus geschlossen wird, daß die Funktion des Zink RING-Fingers erst während der Photorespiration essentiell ist. Dies bekräftigt die Befunde aus Lichtmikroskopie, Elektronenmikroskopie und confocaler Mikroskopie, daß der Zink RING-Finger von PEX10 evtl. nur indirekt am Import von PTS1-tragenden Matrixproteinen beteiligt ist (bzw. am Recycling des Importrezeptors PEX5) und eine größere Rolle z.B. in der Kontaktvermittlung zwischen Peroxisomen und Chloroplasten besitzt, sei es direkt oder indirekt. Eine vorläufige Untersuchung des glyoxysomalen Reticulums der PEX10- Δ Zn1-Linie am CLSM ergab ein Bild, das manchmal dem Wildtyp glich, manchmal war das glyoxysomale Reticulum reduziert, wobei die im IBA-Assay nicht untersuchten PEX10- Δ Zn-T7-Linien eine leichte Importstörung der Glyoxysomen aufwiesen (Georg Hierl, mündliche Mitteilung). Ob das glyoxysomale Reticulum in PEX10- Δ Zn1 in seiner räumlichen Verzweigung tatsächlich gestört ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Die Fähigkeit der Glyoxysomen, β -Oxidation durchzuführen, war jedoch unbeeinträchtigt.

Die beiden Kontrolllinien des IBA-Wurzelwachstumsassay *pex4* und *pex6* waren gegenüber der inhibierenden Wirkung von IBA insensitiv, d.h. die Umwandlung von IBA in IAA konnte aufgrund peroxisomaler Dysfunktion nicht stattfinden. PEX6 vermittelt die Freisetzung der PTS-Rezeptoren von der Peroxisomenmembran und Mutationen von PEX6 führen zu einer Störung des Matrixprotein-Imports (Zolman and Bartel, 2004).

Die Insensitivität der *pex4*-Mutante gegenüber IBA, obwohl der generelle Matrixprotein-Import nicht gestört ist, läßt Zolman und Kollegen (2004) vermuten, daß diesem Peroxin evtl. eine spezielle Rolle während der Umwandlung von Glyoxysomen in Peroxisomen oder der Retro-Translokation beschädigter Proteine aus der Peroxisomenmatrix ins Cytoplasma zukommt. Folglich scheint PEX4 nicht direkt am Recycling des PTS1-Rezeptors PEX5 beteiligt zu sein und die E2-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von PEX4 für diesen Prozess nur von untergeordneter Rolle (Zolman, Monroe-Augustus et al., 2005).

Die Sensitivität der PEX10- Δ Zn-Mutanten gegenüber IBA belegt den unbeeinträchtigten Matrixprotein-Import der PEX10- Δ Zn1-Mutante weiter und verstärkt das Argument, daß der Zink-Finger von PEX10 nicht, oder nur indirekt, am Recycling der PTS-Rezeptoren beteiligt sein dürfte.

Für die Erklärung der Diskrepanz zwischen den Erkenntnissen über die Funktion von PEX10 in dieser Arbeit, die eine Formstörung der Peroxisomen belegt, und in der von Nito und Kollegen (2007), die eine Importstörung von GFP-PTS1 in *pex10i*-Pflanzen nachgewiesen haben, gibt es zwei Möglichkeiten.

Die erste Möglichkeit ist, daß für einen erfolgreichen Matrixprotein-Import in Peroxisomen eine Komplexbildung der drei Zink RING-Finger-Peroxine PEX10, PEX2 und PEX12 vermutlich auch in Pflanzen notwendig ist, so wie es in Säugern und Hefe beschrieben wurde (Chang, Warren et al., 1999; Okumoto, Abe et al., 2000; Hazra, Suriapranata et al., 2002; Weller, Gould et al., 2003; Zhang, Leon et al., 2006). Für diese Interaktion ist ein bestimmter Schwellenwert an Peroxin notwendig, der in den RNAi-Linien von Nito und Kollegen (2007) mit ca. 30%, 38% und 25% verbleibendem Expressionsniveau für PEX2, PEX10 und PEX12 vermutlich unterschritten wurde. In einer semiquantitativen RT-PCR an den PEX10- Δ Zn-Linien (Schumann, Prestele et al., 2007) waren endogenes, intaktes und überexprimiertes, dysfunktionales PEX10 in etwa gleichen Transkriptmengen vorhanden, d.h. ein „Rest“ von ca. 50% endogenem, intaktem PEX10 steht diesen Linien zur Verfügung. Dieser Befund wird auch dadurch unterstützt, daß während des Screenings der T1-Pflanzen von PEX10- Δ Zn-T7 und PEX2- Δ Zn-T7 nur ein Drittel der untersuchten Pflanzen am CLSM einen Phänotyp entwickelten, die sich nach Segregationsanalyse als die Homozygoten herausstellten. Ein gewisses Expressionsniveau des dysfunktionalen zum intakten Peroxin schien für die Entwicklung eines Phänotyps notwendig und trotz 35S-Überexpression der Δ Zn-Versionen der Peroxine kann nicht von einem dominant negativen Effekt gesprochen werden, wenn Heterozygotie für das dysfunktionale Peroxin noch keinen Phänotyp auslöst. Die in dieser Arbeit untersuchten Δ Zn-Linien könnten demnach aufgrund eines höheren relativen Transkriptionsniveaus des endogenen, intakten Peroxins noch keine Importstörung zeigen, wohingegen die RNAi-Linien mit deutlich auf unter 50% reduziertem Expressionsspiegel diese Importstörung zeigen. Der Befund, daß sich die *pex10*-RNAi-Linie durch das Herbizid 2,4-DB nicht im Primärwurzelwachstum hemmen läßt, belegt einen Defekt in der β -Oxidation innerhalb der Glyoxysomen und - die Funktion des Peroxins berücksichtigend - einen Defekt im Matrixprotein-Import bzw. Recycling der PTS-Rezeptoren. Die PEX10- Δ Zn1-Mutante hingegen besitzt voll funktionsfähige Glyoxysomen, was für intakten Matrixprotein-Import spricht.

Als zweite Möglichkeit wäre eine Interaktion zwischen PEX10 und den beiden anderen am vermuteten Komplex beteiligten Peroxinen PEX2 und PEX12 – sei es über den N-Terminus, sei es über den Zink-Finger im C-Terminus von PEX10 - vorstellbar. PEX10 wäre somit für die Stabilität des RING-Komplexes bestehend aus PEX2, PEX10 und PEX12 zuständig; die eigentliche Monoubiquitinierung des PEX5-Rezeptors für dessen Recycling ins Cytoplasma findet nicht über PEX10, sondern evtl. über PEX2 statt.

Da die Peroxisomen des Mesophylls der *pex10*-RNAi-Linie trotz stark reduziertem Expressionsniveau des endogenen PEX10 keine Formstörung aufweisen, die PEX10- Δ Zn-Mutanten - mit einer ca. 1:1-Verdünnung von endogenem zu dysfunktionalem PEX10 - jedoch keine Import-Defizienz aber peroxisomale Formveränderungen zeigen, ist es wahrscheinlicher, daß die beobachtete Importstörung in der RNAi-Linie von Nito und Kollegen (2007) sekundär durch verminderte Komplexbildung zwischen PEX10, PEX2 und PEX12 hervorgerufen wird. Die eigentliche Ubiquitinierung des PTS1-Rezeptors PEX5 zum Recycling ins Cytosol wird nicht direkt von PEX10 übernommen, denn sonst zeigten die PEX10- Δ Zn-Linien ebenfalls einen gestörten Import des GFP-PTS1 am CLSM.

Die Befunde der PEX2- Δ Zn-T7-Linien und die der PEX10-TILLING-Linien unterstützen diese Sichtweise.

Die Erzeugung der PEX2- Δ Zn-T7-Linien erfolgte analog zum Vorgehen in PEX10. Mittels *Splicing-by-Overlap-Extension-PCR* wurde der Zink RING-Finger in vier Nukleotiden so mutiert, daß das dritte, das vierte und das fünfte Cystein so wie das Histidin durch Glycin bzw. Leucin ersetzt wurden und die Fähigkeit Zink-Ionen zu koordinieren verloren ging (s. Abbildung 8 in 1.6). N-Terminal wurde ebenfalls ein T7-Tag angehängt, um das Protein und potentielle Interaktionspartner reinigen zu können und eine Immun-Lokalisation durchführen zu können. Die Transformation erfolgte in die At-GFP-PTS-Pflanzen (Mano, Nakamori et al., 2002), um am Confocalen Mikroskop (CLSM) die Frage nach der Beteiligung des Peroxins am Import peroxisomaler Proteine am Beispiel des GFP-PTS1 beantworten zu können. Die homozygoten T₂-Pflanzen zeigten äußerlich keinen erkennbaren photorespiratorischen Phänotyp, wobei die Analyse der T₁-Pflanzen am CLSM das bereits in PEX10- Δ Zn-Pflanzen beobachtete Verhältnis von 1:3 bezüglich mikroskopischem Phänotyp ergab. Das heißt, daß auch in den PEX2- Δ Zn-Pflanzen Heterozygotie für das überexprimierte, dysfunktionale Peroxin zur Ausbildung der im Folgenden beschriebenen Importstörung nicht ausreicht und folglich ein gewisser Schwellenwert für mutiertes PEX2 vorhanden sein muß, um die Funktion des endogenen

PEX2 genügend zu „verdünnen“ und seine Funktion zu beeinträchtigen. Eine quantitative Transkriptbestimmung würde den zur Ausprägung eines Phänotyps nötigen Anteil an dysfunktionalem PEX2 bestimmen lassen. Allerdings zeigten die fünf in dieser Arbeit erzeugten PEX2- Δ Zn-Linien alle keinen photorespiratorischen Phänotyp, so daß die Frage nach der Menge an Transkript, die nötig wäre, um einen photorespiratorischen Phänotyp zu entwickeln, nicht beantwortet werden könnte; auch sind die Unterschiede der Importstörung der einzelnen Linien am Confocalen Laserscanning-Mikroskop so gering, daß der Zusammenhang zwischen beginnender Import-Defizienz und Transkriptmenge ebenfalls nicht bestimmt werden könnte. Jedoch haben Nito und Kollegen (2007) den PEX2-Transkript-Level drei ihrer pex2-RNAi-Linien als auf ca. 30% reduziert bestimmt. Diese RNAi-Linie ist bezüglich des Herbizids 2,4-DB, das ebenfalls mittels der Enzyme der β -Oxidation in das wachstumshemmende Essigsäure-Derivat 2,4-D umgesetzt würde, insensitiv. Dies bekräftigt den Befund eines gestörten Imports des GFP-PTS1 am CLSM (Nito, Kamigaki et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit zeigten drei ausgewählte PEX2- Δ Zn-T7-Linien am CLSM ebenfalls einen deutlich gestörten Import des GFP-PTS1 (s. Abbildung 54). Das Cytoplasma, das die Chloroplasten umgibt, fluoresziert in diesen Mutanten grün, das GFP wird folglich ins Cytoplasma fehl-lokalisiert. Auf einigen Abbildungen ist zusätzlich zum Mesophyll die Epidermis dargestellt, deren typische Form anhand des cytoplasmatischen GFP-Signals erkennbar ist. Unter Annahme, daß PEX2 als Bestandteil des RING-Komplexes in Pflanzen eine Aufgabe im Recycling des PTS1-Rezeptors PEX5 übernimmt und an der Ubiquitinierung beteiligt ist, so wie es in Hefe gezeigt wurde (Platta, Girzalsky et al., 2004; Kiel, Emmrich et al., 2005; Kragt, Voorn-Brouwer et al., 2005), liegt die Fehl-Lokalisation des GFP-PTS1 ins Cytoplasma an der Beeinträchtigung der Freisetzung von PEX5 zurück ins Cytoplasma, damit dieses für neue Importzyklen wieder zur Verfügung steht.

Die unabhängig davon durchgeführten Markerenzym-Assays der Hydroxypyruvat-Reduktase und v.a. der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase konnten ebenfalls eine Reduktion der jeweiligen Enzymaktivität im Rohorganellen-Pellet und damit eine Reduktion des Imports der betreffenden Enzyme in die peroxisomale Matrix nachweisen (s. 2.3.2.3).

Die Befunde von Nito und Kollegen (2007) stimmen mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen überein. Sowohl die Herabregulierung von PEX2 als auch die Überexpression eines punktmutierten Zink RING-Fingers führen zu Mislokalisierung PTS1-getagten GFPs ins Cytoplasma.

Aus den licht- und transmissionselektronen-mikroskopischen Aufnahmen der PEX2- Δ Zn-Linien ist ersichtlich, daß die für PEX10 beobachtete Formstörung der Peroxisomen und

der reduzierte Organellenkontakt Peroxisom-Chloroplast, hier nicht vorliegt. Die Peroxisomenform war rundlich bis oval mit einem Durchmesser von ca. einem knappen Mikrometer und mit 88% waren ebenso viele Peroxisomen mit Chloroplasten assoziiert wie im Wildtyp (s. 2.3.2.1 und 2.3.2.2). Die Mutation des Zink RING-Fingers von PEX2 hat folglich außer einem reduzierten Matrixprotein-Import keinen weiteren Einfluß auf die Photorespiration. Die Reduktion des Imports der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase konnte als auf knapp unter 40% des Wildtypwertes bestimmt werden. Da die PEX2- Δ Zn-Mutanten jedoch keinen Phänotyp zeigen, muß angenommen werden, daß eine Reduktion des Matrixprotein-Imports auf Werte um die 40% des Wildtyp-Niveaus die betroffene Pflanze noch nicht maßgeblich schädigt. Fan und Kollegen (2005) konnten die graduelle Ausprägung eines photorespiratorischen Phänotyps in Abhängigkeit vom Transkriptionslevel in pex12-RNAi-Pflanzen nachweisen, auch wenn sie nicht den für das Erscheinen eines Phänotyps nötigen Transkriptions-Schwellenwert bestimmt haben und dieser wahrscheinlich für jedes Protein individuell ist.

Die vom Wildtyp nicht verschiedene Photosyntheseleistung der PEX2- Δ Zn-Pflanzen unter Normalatmosphäre bestätigt das Fehlen eines photorespiratorischen Phänotyps (s. 2.3.4).

Eine Metabolom-Analyse 14 Tage alter Rosettenblätter, die unter Normalatmosphäre wuchsen, sollte Aufschluß über den Grad der Beeinträchtigung des Glycolat-Zyklus in PEX2- Δ Zn-Pflanzen geben. Das Ergebnis der Vermessung der Proben über GC-TOF-MS ergab in der Hauptkomponenten-Analyse (PCA) keine klare Trennung der Probengruppen von Wildtyp und PEX2-Mutante. Die erste Hauptkomponente, die den größten Teil der Varianz ausdrückt, repräsentierte lediglich gut 20% der Gesamtvarianz. Des Weiteren entfiel auf die zweite Hauptkomponente noch einmal knapp 20% der Varianz. Die relativ niedrige Varianz entlang der ersten Hauptkomponente spiegelt den fehlenden photorespiratorischen Phänotyp der untersuchten PEX2- Δ Zn-Pflanze wider, und es wäre interessant, ob ein stärkeres Allel, wegen eines stärker gestörten Matrixprotein-Imports, zu einer deutlicheren Trennung von Wildtyp und PEX2- Δ Zn-Proben entlang der ersten Hauptkomponente geführt hätte. Die hohe Varianz entlang der zweiten Hauptkomponente ist aus der ausschließlichen Verwendung biologischer Replika und aus dem Verzicht auf technische Parallelproben, die in den Untersuchungen an PEX10- Δ Zn-Pflanzen mit herangezogen wurden, abzuleiten. Die Unterschiede zwischen Wildtyp und PEX2- Δ Zn scheinen jedenfalls geringer zu sein als die zwischen Wildtyp und PEX10- Δ Zn. Die Metaboliten, deren unterschiedliche Abundanzen in Wildtyp und PEX2- Δ Zn-Mutanten trotz geringer Gesamtvarianz signifikant verschieden waren, umfassen wie bereits in PEX10- Δ Zn jene des Glycolat-Zyklus, mit einem wesentlichen Unterschied: Alanin, Serin und Glycerat sind in PEX2- Δ Zn-Pflanzen nicht erniedrigt, sondern in ihrer Abundanz

gegenüber dem Wildtyp erhöht. Nach Aufstellung des Serin-Glycerat-Verhältnisses zur Darstellung des Metabolitenflusses zwischen den Organellen der Photorespiration wird ersichtlich, daß der Glycolat-Zyklus „ungehindert“ abläuft, d.h. Glycerat aus Serin unbeeinträchtigt metabolisiert werden kann, da die Verhältnisse in Wildtyp und PEX2-Mutante vergleichbar hoch waren. Es haben sich folglich in PEX2- Δ Zn sowohl Serin als auch Glycerat in gleichem Maße erhöht. Dies ist nur möglich, wenn der Kontakt der Organellen in PEX2- Δ Zn nicht reduziert ist, so wie es in PEX10- Δ Zn der Fall war, was eine Beeinträchtigung des Metabolitenflusses zur Folge hatte und am erniedrigten Serin-Glycerat-Verhältnis festgemacht werden konnte. Die relative Erhöhung der Glycolat-Zyklus Intermediate in PEX2- Δ Zn spiegelt demnach einen reduzierten Gesamtumsatz der Metaboliten wider, wie er durch verringerte Enzymaktivität d.h. reduzierten Matrixprotein-Import zustande kommt. Die Metabolom-Analyse konnte folglich die Befunde über den generell gestörten Import PTS1-tragender Enzyme am Beispiel des GFP-PTS1 und die Reduktion der beiden Markerenzym-Aktivitäten von HPR und SGAT bestätigen (s. 2.3.3). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann postuliert werden, daß die Funktion des RING-Fingers in PEX2 womöglich in der direkten Ubiquitinierung des PTS1-Rezeptors liegt, d.h. daß PEX2 die für die Ubiquitinierung von PEX5 nötige E3-Ligase darstellt. Eine andere Möglichkeit als Ursache für ein reduziertes Recycling des PTS1-Rezeptors PEX5 wäre der Zerfall des heteromeren Komplexes bestehend aus PEX10, PEX2 und PEX12 durch das dysfunktionale PEX2 und einer indirekten Beteiligung von PEX2 an der Ubiquitinierung von PEX5 durch Stabilisierung des Komplexes. Allerdings kann PEX10 aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse als E3-Ligase für PTS1-tragende Enzyme so gut wie ausgeschlossen werden, so daß lediglich noch das dritte Peroxin PEX12 im vermuteten Komplex in Frage käme. Der Nachweis der Komplexbildung zwischen PEX10, PEX2 und PEX12 sowie ein direkter Nachweis ihrer E3-Ligase-Aktivität steht für Pflanzen bis heute noch aus. Die Befunde über fehlende Ubiquitinierung von Pex5p bei Beeinträchtigung des Zink RING-Finger-Komplexes stammen aus *S. cerevisiae* und geben nur indirekten Hinweis auf die Wichtigkeit von PEX2 für die Ubiquitinierung (Kragt, Voorn-Brouwer et al., 2005). Allerdings sind alle Komponenten für eine Ubiquitinierung in Hefe, Säugern und Pflanze konserviert und eine Ubiquitinierung von PEX5 unter Beteiligung der einzigen E3-Ligase-Peroxine PEX10, PEX2 und PEX12, die teils hohe Sequenzähnlichkeiten mit bereits bestätigten E3-Ligasen aufweisen, erscheint immer wahrscheinlicher (Joazeiro, Wing et al., 1999).

Ein weiterer Teil dieser Arbeit sollte die Auswirkungen von Punktmutationen in PEX10-TILLING-Linien untersuchen. Von insgesamt sieben Linien, deren Einzelnukleotid-

Polymorphismen (SNP) zwischen N-Terminus und Zink RING-Finger in der codierenden Sequenz verteilt waren, zeigten zwei Linien mit Punktmutationen in konservierten N-terminalen Bereichen (PEX10-G93E und PEX10-P126S) und eine Linie mit einem Stopcodon direkt vor dem Zink RING-Finger (PEX10-W313*) einen Phänotyp, der durch zwerghaften Wuchs unter Normalatmosphäre auffiel. Im Laufe der Selbstung dieser drei Linien konnten von PEX10-P126S homozygote Pflanzen mittels dCaps-Analyse (s. 2.2.1) ermittelt werden, von den anderen beiden nicht, was ein Hinweis auf den Grad der Beeinträchtigung durch die jeweilige Mutation war.

Die Ermittlung der Entwicklungsspanne der Embryonen in Schoten der TILLING-Linien konnte die Wichtigkeit des Zink RING-Fingers für die Embryonalentwicklung, unabhängig von den Befunden von Schumann und Mitarbeitern (2003) an PEX10-KO-Mutanten, zeigen. 25% der Embryonen in Schoten von PEX10-W313* entwickelten sich nicht weiter als bis zum Herzstadium. Dies belegte die Embryoletalität von homozygoten Pflanzen, denen der PEX10-Zink RING-Finger komplett fehlt, ähnlich den KO-Mutanten von PEX10, die durch ein PEX10- Δ Zn-Konstrukt nicht „gerettet“ werden konnten (Schumann, Wanner et al., 2003). Heterozygote PEX10-W313* zeigen zwerghaften Wuchs unter Normalatmosphäre, da im Gegensatz zu den heterozygoten KO-Mutanten, die noch keinen Phänotyp entwickelten, in PEX10-W313* nicht nur die Hälfte an funktionierendem PEX10 zur Verfügung steht, sondern die 50% ohne Zink RING-Finger die intakten 50% PEX10 in ihrer Funktion „verdünnen“. Das bedeutet, daß der Grad der Schädigung der heterozygoten PEX10-W313* schwerer wiegt als der einer heterozygoten KO-Mutante.

Eine Beeinträchtigung der Peroxisomenform in der PEX10-W313*-Mutante wurde erst am Transmissionselektronenmikroskop ersichtlich. Hier zeigte die Mutante deutliche peroxisomale Formveränderungen und eine Kontaktstörung zwischen Peroxisom und Chloroplast. Es konnten zwei Populationen von Peroxisomen ausgemacht werden. Die erste wich mit einer Länge von $0,76 \pm 0,2 \mu\text{m}$ nicht vom Wildtyp ab. Die zweite war mit einer durchschnittlichen Länge von $1,71 \pm 0,35 \mu\text{m}$, die vereinzelt sogar $3 \mu\text{m}$ Länge erreichte, signifikant vom Wildtyp verschieden (**, $P < 0,01$, $n=20$). Diese Beobachtung konnte auch in TEM-Aufnahmen von PEX10- Δ Zn1 gemacht werden (s. Abbildung 10), in der ca. 40% der Peroxisomen in diese zweite, längere und vom Wildtyp verschiedene Population fallen. In PEX10-W313* sind es ca. 33% und damit vergleichbar viele. Auch ist der Kontakt zwischen Chloroplast und Peroxisom in PEX10-W313* auf $24 \pm 34\%$ gesunken, was ebenfalls der Situation in PEX10- Δ Zn1 entspricht, in der $31 \pm 21\%$ der Peroxisomen in Kontakt mit einem Chloroplast standen. Das bedeutet, daß die Verdünnung von zwei intakten, endogenen Allelen PEX10 durch zwei Allele PEX10- Δ Zn-Konstrukt in PEX10- Δ Zn1 subzellulär ähnliche Auswirkungen hat wie die Verdünnung

eines Allels intakten PEX10 mit einem Allel PEX10, dem der Zink RING-Finger fehlt, wie es in der PEX10-W313*-Mutante der Fall ist. Die Bedeutung des RING-Finger-Motivs für die pflanzliche Entwicklung und v.a. den Kontakt der Organellen des Glycolat-Zyklus konnte mit dieser Mutante unabhängig weiter belegt werden.

Die beiden anderen PEX10-TILLING-Linien mit den Aminosäuresubstitutionen G93E im hochkonservierten Motiv TLGEEY und P126S, die ein hochkonserviertes Prolin betrifft, zeigten ebenfalls einen zwerghenwüchsigen Phänotyp. Eine Segregationsanalyse von Keimlingen der PEX10-G93E-Mutante ergab ein Verhältnis von ca. drei zu eins sich über das Zwei-Kotyledonen-Stadium hinaus entwickelnder und in diesem Stadium absterbender Keimlinge, die sehr wahrscheinlich die Homozygoten repräsentieren und nach Transfer in Erde und auch in Hoch-CO₂ nicht hochgezogen werden konnten. Von dieser Linie sind ausschließlich heterozygote Vertreter zu Wachstum fähig; sie lassen sich nur in geringem Ausmaß durch Hoch-CO₂ beeinflussen und bleiben demnach relativ kleinwüchsig (s. Abbildung 41c).

Das Motiv TLGEEY im N-Terminus von PEX10 scheint demnach speziell für die Transformation der Pflanze vom heterotrophen in den autotrophen Zustand, bzw. für die Anlage von Primärblättern, von entscheidender Bedeutung, da die Embryonalentwicklung nicht gestört war, wie es bei PEX10-W313* beobachtet werden konnte. Diese Transformation entspricht auf zellulärer Ebene dem Zeitpunkt der Umwandlung von Glyoxysomen in Blatt-Peroxisomen und impliziert eine Beeinträchtigung des Matrixprotein-Imports oder Austausches. Untersuchungen über eine Störung des Matrixprotein-Imports in beiden TILLING-Linien stehen noch aus; nach Rückkreuzung in At-GFP-PTS1 kann eine Importstörung über die Fehllokalisierung von GFP-PTS1 ins Cytoplasma beurteilt werden. Die Metabolom-Analyse lieferte allerdings bereits deutliche Hinweise auf eine Importstörung (s. unten). Der Import bedarf eines funktionierenden RING-Finger-Komplexes. Dieser Befund bekräftigt die hier aufgestellte Hypothese, daß der N-Terminus von PEX10 eine wichtige Rolle in der Komplexbildung zwischen PEX2, PEX10 und PEX12 spielen könnte.

Die Punktmutation P126S der zweiten N-terminalen PEX10-Mutante scheint zwar ebenfalls zu einem zwerghaften Wuchs zu führen, hat jedoch keine gravierenden Einflüsse auf Embryonalentwicklung oder Keimlingsetablierung und homozygote Pflanzen konnten erhalten werden. Dennoch kann diese Pflanze nicht durch erhöhte CO₂-Werte der Umgebungsluft zu normalem Wachstum angeregt werden, auch die beiden anderen TILLING-Linien reagierten darauf nur in geringfügiger Erhöhung ihrer Biomasse (s. Abbildung 41). Es muß festgehalten werden, daß zum Zeitpunkt des Abschlusses dieser Doktor-Arbeit noch keine Rückkreuzung in den Wildtyp durchgeführt wurde, und die beobachtete Insensitivität gegenüber CO₂ durch sekundäre SNP ausgelöst werden

könnte. Auch ist das Einleiten von CO₂ aus einer Flasche über einen Schlauch in eine Conviron-Kammer kein System, das ein exaktes Einstellen und den Erhalt eines konstanten CO₂-Partialdrucks ermöglicht. Es war ausreichend, um die jeweils als Kontrolle mit angezogene PEX10-ΔZn1 zu retten, kann aber zu wenig gewesen sein, um die PEX10-TILLING-Linien zu normalem Wachstum zu bewegen.

Von den beiden im N-Terminus punktmultierten PEX10-TILLING-Linien zeigte PEX10-G93E an Licht- und Elektronenmikroskop eine auffällige Formveränderung der Peroxisomen. Sie erreichten eine Länge von bis zu 5 μm am LM, was am TEM als mehrere, verstreut liegende Peroxisomen sichtbar war und stark an die Befunde der PEX10-ΔZn1-Mutante erinnerte. Die Bestimmung des Organellenkontaktes zwischen Peroxisomen und Chloroplasten zeigte jedoch den entscheidenden Unterschied. Die Mutation des konservierten TLGEEY-Motivs im N-Terminus von PEX10 beeinträchtigt zwar die Form der Peroxisomen, nicht aber deren Kontakt mit Chloroplasten.

In PEX10-P126S waren die Peroxisomen geringfügig kleiner als im Wildtyp und lagen zu kleinen Gruppen dicht nebeneinander. Eine Verlängerung der Peroxisomen konnte nicht beobachtet werden. Am TEM bestätigte sich dieses Bild dicht nebeneinander liegender Peroxisomen, die ebenfalls keine Kontaktstörung zu Chloroplasten aufwiesen.

Die an den beiden im N-Terminus von PEX10 punktmultierten Linien PEX10-G93E und PEX10-P126S durchgeführte Metabolom-Analyse 14 Tage alter Rosettenblätter bestätigte die Befunde nicht gestörter Organellenkontakte in beiden Linien. Die Intermediate des Glycolat-Zyklus Glycin, Serin, Glycerat, Glutamat und Alanin konnten bestimmt werden. Die beiden Linien wichen untereinander bezüglich unterschiedlicher Abundanzen einzelner Metaboliten voneinander signifikant ab, jedoch waren der Spiegel für Serin und Glycerat in beiden Linien hochsignifikant vom Wildtyp verschieden und zwar stark erhöht. Ein ähnliches Bild ergab sich in der Metabolom-Analyse der PEX2-ΔZn-Pflanzen, deren nachweislich gestörter Matrixprotein-Import zu den hohen Spiegeln von Serin und Glycerat beigetragen hat, was sich in reduziertem Umsatz dieser Metaboliten äußerte. Wie in PEX2-ΔZn auch ist das Verhältnis aus Serin und Glycerat nicht erniedrigt, es ist sogar erhöht. Folglich ist der Metabolitenfluß innerhalb des Glycolat-Zyklus in den PEX10-TILLING-Linien in jedem Fall nicht verschlechtert. Eine Nettoerhöhung des Transportflusses durch die beiden Punktmutationen ist zumindest in PEX10-P126S anhand vieler kleiner, normal rund geformter Peroxisomen nur schwer vorstellbar. Die Vergrößerung der Peroxisomenoberfläche wie sie in PEX10-G93E beobachtet wurde, könnte als Erklärung für einen verstärkten Metabolitenfluß dienen, allerdings dürfte sich ein derartiges Szenario nie negativ auf einen Phänotyp in Bezug auf Photorespiration auswirken, es sei denn, die Oberflächenvergrößerung beeinflusste den Kontakt der

Peroxisomen spezifisch nur mit Mitochondrien. Dies würde den erhöhten Flux der Metaboliten Serin und Glycerat erklären können.

Die Erhöhung der Glycolat-Zyklus-Intermediate impliziert jedenfalls eine Beeinträchtigung des peroxisomalen Matrixprotein-Imports in beiden untersuchten PEX10-TILLING-Linien mit den Mutationen G93E bzw. P126S, da auch PEX2- Δ Zn-Pflanzen eine Erhöhung der Glycolat-Zyklus-Intermediate aufwiesen und als im Matrixprotein-Import gestört belegt werden konnten. Die Rückkreuzung beider Linien in die At-GFP-PTS-Linien wird diese Frage eingehend klären können, so wie die bereits beschriebenen Markerenzym-Assays. Anhand der TEM-Bilder der PEX10-W313*-Pflanze mit gestörtem Organellenkontakt wäre es interessant, wie sich diese Linie in einer Metabolomic-Studie verhält. Ein Szenario vergleichbar der PEX10- Δ Zn1 wäre denkbar und daraus abgeleitet sollte in dieser Mutante auch der Matrixprotein-Import nicht gestört sein, da die Punktmutation „lediglich“ zur Termination der Translation kurz vor dem Zink RING-Finger führt, aber den N-Terminus nicht betrifft; die Rückkreuzung in At-GFP-PTS-Linien bzw. Enzymassays werden auch hier zur Klärung beitragen können.

Aus den Ergebnissen der Punktmutationen im Zink RING-Finger von PEX10 und PEX2, den Auswirkungen des Fehlens des Zink RING-Fingers in PEX10-W313*, so wie den Punktmutationen in konservierten Bereichen des N-Terminus von PEX10 ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- Der Zink RING-Finger von PEX10 spielt eine Rolle in der Kontaktvermittlung zwischen Peroxisomen und Chloroplasten, sei es direkt oder indirekt. Eine Metabolom-Analyse bestätigte die mikroskopischen Aufnahmen. Die PEX10-W313*-TILLING-Linie mit Stopcodon vor dem Zink-Finger zeigte die Auswirkungen eines um den Zink-Finger verkürzten PEX10 auf den Kontakt beider Organellen und – unabhängig von den PEX10-KO-Mutanten - die Bedeutung von PEX10 für die Embryonalentwicklung. Jedoch scheint der Zink-Finger in PEX10 keine Rolle im Import PTS1-tragender Matrixenzyme zu spielen, wie mit Markerenzym-Assays und durch Confocale Mikroskopie am Beispiel des GFP-PTS1 gezeigt werden konnte.
- Der Zink RING-Finger von PEX2 hat entweder eine direkte Rolle im Import PTS1-tragender Enzyme als E3-Ubiquitin-Ligase oder eine indirekte Rolle, indem er die Bildung des vermuteten Komplexes zwischen PEX10, PEX2 und PEX12 und dadurch den Import peroxisomaler Proteine beeinflusst, wie dies an GFP-PTS1 gezeigt wurde.
- Veränderungen in konservierten Bereichen des N-Terminus von PEX10 führen zu zwerg-wüchsigem Phänotyp. Die Punktmutation im hochkonservierten Motiv TLGEEY nach TLEEEY in PEX10-G93E verhindert vermutlich die Umwandlung von Glyoxysomen in Blatt-Peroxisomen, und sowohl die Mutation G93E als auch P126S

könnten zu einem gestörten Matrixprotein-Import geführt haben, wie sich aus den erhöhten Metabolitwerten für Intermediate des Glycolat-Zyklus ableiten läßt.

- Des Weiteren scheint das Anhängen eines T7-Tags an den N-Terminus von PEX10 das pflanzliche Wachstum ebenfalls zu beeinflussen; zusätzlich zur Δ Zn-Mutation und deren Auswirkung auf die Form der Peroxisomen kann in PEX10- Δ Zn-T7-Linien eine leichte Matrixprotein-Importstörung am Confocalen Mikroskop anhand des GFP-PTS1 beobachtet werden.

Änderungen des Zink RING-Fingers von PEX2 führen zu Störungen des Matrixprotein-Imports und stimmen mit Befunden aus RNAi-Linien überein, deren PEX2-Transkript auf 30% reduziert war (Nito, Kamigaki et al., 2007).

Punktmutationen des Zink RING-Fingers von PEX10 haben strukturelle Änderungen der Peroxisomen und Kontaktverlust zwischen Peroxisomen und Chloroplasten zur Folge, jedoch keine Auswirkung auf den Import PTS1-tragender Matrixenzyme. Die Beeinträchtigung des Matrixprotein-Imports tritt erst auf, wenn Veränderungen am N-Terminus des Peroxins vorgenommen werden, z.B. das Anhängen eines T7-Tags in den PEX10- Δ Zn-T7-Linien oder die Punktmutationen in konservierten Bereichen des N-Terminus wie in den beiden TILLING-Linien PEX10-G93E und PEX10-P126S. Folglich hat der N-Terminus Einfluß auf den Matrixprotein-Import, der C-terminale Zink RING-Finger jedoch nicht. Der Zink RING-Finger von PEX10 kann somit weder für die Monoubiquitinierung des PTS1-Rezeptors PEX5 direkt verantwortlich sein, noch für die Interaktion mit PEX2 oder PEX12, da - bei Annahme eines Komplexes dieser drei Peroxine als Voraussetzung für das Rezeptor-Recycling - in PEX10- Δ Zn-Linien sonst ein gestörter Matrixprotein-Import fest zu stellen gewesen wäre.

Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen werden wesentlich unterstützt durch den Befund, daß in *S. cerevisiae* der Zink RING-Finger von Pex10p *in vitro* und *in vivo* essentiell für die Ubc4p-abhängige Ubiquitinierung, d.h. für die Polyubiquitinierung von Pex5p ist und keine Rolle in der Monoubiquitinierung spielt (Williams, van den Berg et al., 2008).

Eckert und Kollegen (2003) haben in *S. cerevisiae* mit einem *Split-Ubiquitin*-Assay die Interaktion zahlreicher Peroxine miteinander getestet. Sie konnten daraus eine räumliche Annäherung von Pex10p und Pex12p, sowie von Pex10p und Pex4p, wenn Pex22p vorhanden ist, ableiten. Eine Interaktion von Pex2p mit diesen Proteinen konnten diese Autoren nicht nachweisen. Sie räumen jedoch eine gewisse Unvollständigkeit des von ihnen gezeichneten Interaktionsnetzwerks ein, da das Anhängen der N- bzw. C-terminalen Ubiquitinhälften an N- oder C-Termini der Peroxine potentielle Protein-Protein-Wechselwirkungen sterisch behindern könnte. Auch sind kurzlebige Interaktionen wie z.B.

die von Pex5p mit Pex13p des Docking-Komplexes und von Pex5p mit Pex12p dem Split-Ubiquitin-Assay vermutlich nicht zugänglich.

Chang und Kollegen (1999) konnten neben der Interaktion von PEX12 und PEX10 auch diejenige von PEX12 mit PEX5 in einem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* in Säugern nachweisen; und die Zink RING-Finger-Domäne von PEX12 ist für diese Interaktion notwendig.

Hayashi und Kollegen (2009) zeigten über *Yeast-two-Hybrid* und bimolekulare Fluoreszenz-Komplementierung, daß PEX12 in *Arabidopsis* mit dem PTS2-Rezeptor PEX7 interagiert und einen Vermittler zwischen Docking-Komplex sowie PEX2 und PEX10 darstellt; die Domäne, die für diese Interaktion verantwortlich ist, wurde jedoch nicht näher untersucht (Singh, Hayashi et al., 2009).

Reguenga und Kollegen konnten in Säugern einen Komplex nachweisen, in dem PEX2, PEX10, PEX5 und PEX14 gemeinsam vorliegen (Reguenga, Oliveira et al., 2001).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß die RING-Finger Peroxine in Pflanzen ähnliche Komplexe bilden könnten.

Welche Proteinpartner kommen für PEX10 in Pflanzen für eine Polyubiquitinierung von Substratproteinen in Frage?

Aus der Pex22p-abhängigen Interaktion von Pex10p und Pex4p in Hefe kann geschlossen werden, daß Pex10p den Kontakt mit Pex22p herstellt; die räumliche Nähe zwischen Pex4p, dem E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzym, und dem Ubiquitinierungssubstrat Pex5p wird entweder über den Zink RING-Finger von Pex2p oder den von Pex12p vermittelt. Pex2p und Pex12p konnten in Hefe jedoch noch nicht als mit Pex4p interagierend nachgewiesen werden, eventuell wegen der Kurzlebigkeit der Proteininteraktion während des eigentlichen Ubiquitinierungsschrittes (Eckert and Johnsson, 2003). Allerdings scheint das pflanzliche PEX4, anders als Pex4p aus *Pichia pastoris*, nicht am Matrixprotein-Import bzw. am Rezeptorrecycling beteiligt zu sein (Collins, Kalish et al., 2000). Die *pex4/pex22*-Doppelmutante zeigt bei normalem Matrixprotein-Import Schwierigkeiten im Abbau des glyoxysomalen Enzyms Isocitrat-Lyase, das einige Tage länger als im Wildtyp in der Matrix nachweisbar ist; dies veranlasste die Autoren zur Annahme, daß dieser Enzymkomplex speziell für den Austransport von Matrixproteinen zwecks Abbau im Proteasom zuständig ist (Zolman, Monroe-Augustus et al., 2005). Die erhöhten Werte für Glyoxylat in der PEX10- Δ Zn1-Mutante, die nicht auf einer Reduktion der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase-Aktivität beruhen, könnten eine Aktivität von nicht abgebauten Glyoxylat-Zyklus-Enzymen in Peroxisomen widerspiegeln. Auch die erhöhte HPR-Aktivität in den PEX10- Δ Zn-Linien könnte ein Hinweis auf die Beteiligung von PEX10 an diesem Austransport von

Matrixenzymen sein. Allerdings setzt nach momentanem Kenntnisstand der Abbau von Proteinen über das Proteasom eine Polyubiquitinierung voraus (Kragt, Voorn-Brouwer et al., 2005). Dies impliziert, daß das pflanzliche PEX4 an diesem Prozess beteiligt ist. In Hefe hingegen konnte Pex4p als das für die Monoubiquitinierung von Pex5p verantwortliche E2-Ubiquitin-konjugierende Enzym nachgewiesen werden.

Daraus ergibt sich in Pflanzen, daß PEX4 kaum das E2-Ubiquitin-konjugierende Enzym sein kann, mit dem die E3-Ligase PEX2 interagiert, um die Monoubiquitinierung von PEX5 zu katalysieren, denn sonst würde die pex4-Mutante ebenfalls Importstörung zeigen. Folglich muß das E2-konjugierende Enzym, das für Monoubiquitinierung in Pflanzen verantwortlich ist, noch identifiziert werden!

Die in PEX10- Δ Zn-Pflanzen gemachte Beobachtung formgestörter Peroxisomen, deren Kontakt mit Chloroplasten auf 30% reduziert war, kann mit den oben aufgeführten Funktionen von PEX10 als E3-Ligase für Polyubiquitinierung allein nicht erklärt werden und gibt Raum für Spekulationen über Aufgaben von PEX10, mit denen es bisher noch nicht in Zusammenhang gebracht wurde.

Nito und Kollegen (2007) beobachteten in ihren RNAi-Linien diverser Peroxine in pex10i-Pflanzen einen ebenfalls pleiotropen Phänotyp, der durch Defekte in bekannten peroxisomalen Funktionen allein nicht erklärt werden kann. So zeigte diese Mutante kleinere Wurzelzellen und als einzige der beschriebenen RNAi-Linien einen zwergwüchsigen Phänotyp mit kleinen Schoten und panaschierten Blättern. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß dieser Phänotyp auch unter Hoch-CO₂ erhalten bleibt. Des Weiteren ist Pex10p in Hefe zur Oligomerisierung mit sich selbst befähigt; die Funktion der Oligomerisierung ist bisher nicht untersucht worden (Eckert and Johnsson, 2003).

PEX10 ist essentiell für die Formgebung der Peroxisomen und für die Kontaktvermittlung zwischen Peroxisomen und Chloroplasten; zwei mögliche Wirkungsweisen wie die Kontaktvermittlung von PEX10 bewerkstelligt wird sind denkbar:

- Der Zink RING-Finger von PEX10 ist direkt an der Kontaktvermittlung mit Chloroplasten beteiligt. Dies würde einen Interaktionspartner in der äußeren Chloroplasten-Hüllmembran implizieren. Die beobachteten peroxisomalen Formstörungen stellten demnach Oberflächenvergrößerungen dar, um den Organellen-Kontaktverlust auszugleichen. Oberflächenvergrößerungen von Organellen zum Zwecke der Erhöhung des Stoff-Austauschs wurden für Mitochondrien und Chloroplasten beschrieben (Scott, Sparkes et al., 2007). Der Austausch von Proteinen zwischen Chloroplasten über Ausstülpungen der Chloroplastenmembran, sog.

Stromules, konnte in Arabidopsis-Wildtyppflanzen gezeigt werden (Kohler, Cao et al., 1997; Natesan, Sullivan et al., 2005).

Eckert und Kollegen (2003) konnten in einem Split-Ubiquitin-Assay Interaktionen einiger Peroxine mit dem Transporter der äußeren Mitochondrienmembran TOM22 nachweisen. In Abwesenheit des Peroxins Pex3p interagierten sowohl Pex11p als auch Pex12p mit TOM22. Die Autoren argumentieren, daß diese Interaktion auf einer Mislokalisierung der beiden Peroxine in die Mitochondrienmembran beruht, wenn aufgrund der Abwesenheit von Pex3p keine funktionalen Peroxisomen vorhanden sind. Dieses Phänomen konnte auch in Säuger Zell-Linien nachgewiesen werden, die PEX19-defizient waren (Sacksteder, Jones et al., 2000). Das Fehlen peroxisomaler Membranen war für diese Beobachtungen jedoch immer Voraussetzung; die Mislokalisierung stellt somit keinen natürlichen Zustand dar. Die beobachtete Interaktion von Pex11p und Pex12p mit TOM22 beruht folglich nicht auf einer Interaktion über die Membranen von Peroxisomen und Mitochondrien hinweg, sondern auf einer Interaktion innerhalb der Mitochondrienmembran.

Metabolitenstau als Ursache für Oberflächenvergrößerungen an Peroxisomen wurde bereits in Zusammenhang mit der Aminotransferase-Mutante *sat* diskutiert, deren Enzymausfall zu einer Formveränderung der Peroxisomen geführt hat. Piekarska und Kollegen (2008) konnten einen Zusammenhang zwischen Metabolitenstau und der Ausprägung von „Riesenperoxisomen“ in *Candida albicans* *fox2* Δ/Δ -Zellen, die einen Defekt im Transport von Succinat und/oder Acetyl-CoA über die Peroxisomenmembran hinweg zeigen, beschreiben (Piekarska, Hardy et al., 2008).

Ob PEX10 in Pflanzen alleine oder im Zusammenwirken mit anderen peroxisomalen Membranproteinen oder mit cytoplasmatischen Zwischenträgern den Kontakt zu Membrankomponenten der an der Photorespiration beteiligten Organellen herstellt, könnte über *cross-linking* Versuche an Membranpräparationen untersucht werden. Vorstellbar wäre eine für Pflanzen spezifische Interaktion von Organellen bzw. Membranproteinen, die dem Stofftransport während der Photorespiration dient. Ob für den Organellenkontakt die E3-Ligase-Aktivität des Zink RING-Fingers nötig ist, d.h. ob Ubiquitinierungsprozesse eine Rolle spielen, ist unklar. Das Zink RING-Finger-Motiv ist als eine generelle Protein-Protein-Interaktionsdomäne nicht zwingend in die Kontaktaufnahme mit E2-konjugierenden Enzymen involviert, wie die Interaktion des Zink-Fingers von PEX12 mit PEX5 und PEX10 in Säugern gezeigt hat (Chang, Warren et al., 1999).

Ob die Mitochondrien in der hier untersuchten PEX10- Δ Zn1-Mutante ebenfalls form- und kontakt-gestört sind, wäre von Interesse und ließe sich durch Anfärbung mit

MitoTracker Orange CM-H2TMRos (Molecular Probes Inc., Niederlande) am Confocalen Laserscanning-Mikroskop untersuchen.

- PEX10 und sein Zink RING-Finger interagieren mit Bestandteilen des Cytoskeletts, wie es für PEX11 beschrieben wurde (Kobayashi, Tanaka et al., 2007) und ist am Teilungsapparat von Peroxisomen beteiligt. Die beobachteten Formveränderungen in PEX10- Δ Zn stellten demnach nicht vollständig voneinander getrennte Peroxisomen dar und der verringerte Organellenkontakt wäre eine Folge der Formveränderung. DRP-Proteine (*dynamamin-related protein*) sind an der Teilung von Mitochondrien und Peroxisomen beteiligt und katalysieren zusammen mit Proteinen der FISSION1-Gruppe die Trennung der Peroxisomen- so wie der Mitochondrienmembran. An drp-Mutanten konnte ebenfalls die Beobachtung elongierter Peroxisomen gemacht werden, die den in dieser Arbeit an PEX10- Δ Zn1 beobachteten Formveränderungen ähnlich sind (Mano, Nakamori et al., 2004; Zhang and Hu, 2009). Bevor diese Trennung vollzogen werden kann müssen PEX11-Peroxine die Einschnürung der Membranen katalysieren, was in einer tubulären Verlängerung der Peroxisomen, als Voraussetzung für die Trennung durch DRP- und FIS-Proteine, resultiert (Fagarasanu, Fagarasanu et al., 2007). Arabidopsis besitzt fünf PEX11-Proteine (PEX11a-e) und die Überexpression oder *down regulation* individueller PEX11-Proteine führt zu einer Elongation der Peroxisomen ohne stattfindende Abschnürung (Lingard and Trelease, 2006; Nito, Kamigaki et al., 2007; Orth, Reumann et al., 2007). Auch zeigte eine Doppelmutante der beiden PEX3-Proteine eine ähnliche Peroxisomenmorphologie, was die Autoren vermuten ließ, daß PEX3 als frühes Peroxin zusammen mit PEX19 nicht nur Membranperoxine rekrutiert, sondern auch Bestandteile des Teilungsapparates (Nito, Kamigaki et al., 2007). PEX10 konnte in der Arbeit von Flynn und Kollegen (2005) als in ER-Subkompartimenten lokalisiert nachgewiesen werden und wurde ebenfalls als frühes Peroxin vorgeschlagen (Flynn, Heinze et al., 2005). Ein *knock out* dieses Peroxins beeinträchtigt in frühen Embryonalstadien die Ausbildung von Peroxisomen und die vom ER abknospenden Protein- und Lipid-*bodies* (Schumann, Wanner et al., 2003). PEX10 könnte nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit am Teilungsapparat von pflanzlichen Peroxisomen beteiligt sein und womöglich den Kontakt zwischen FIS1 und DRP3-Proteinen ermöglichen, die anders als in Säugern nicht direkt miteinander interagieren (Yoon, Krueger et al., 2003; Lingard, Gidda et al., 2008). PEX10 könnte diese Aufgabe bereits früh im ER ausführen, was die fehlende Ausbildung, d.h. Abknospung der Protein- und Lipidbodies vom ER in den Arbeiten von Schumann und Kollegen (2003) mit erklären könnte.

Die Funktion von PEX10 als E3-Ligase in der Polyubiquitinierung von Import-Rezeptoren oder anderen Substratproteinen und seine Beteiligung am Organellenkontakt, sei es direkt, sei es über den Teilungsapparat von Peroxisomen, schließen sich nicht gegenseitig aus. PEX10 könnte demnach in Pflanzen eine Doppelfunktion erfüllen, wobei die Beteiligung an der Formgebung von Peroxisomen auch unabhängig von einem Komplex aus PEX10, PEX2 und PEX12 stattfinden könnte.

3.2. Versuch einer Identifizierung von *second-site*-Mutanten, die den konditional subletalen Phänotyp der PEX10- Δ Zn1-Mutante kompensieren

Photorespirations-Mutanten, die durch eine *second-site*-Mutation die photorespiratorischen Defekte ausgleichen, gäben weiteren Aufschluß über den Mechanismus der Photorespiration und wie man sie eventuell umgehen könnte. Dies war in den 70er und 80er Jahren für die Landwirtschaft von großem Interesse, da Photorespiration, wenn man nur die Photosynthesebilanz betrachtet, einen Biomasseverlust darstellt und die Produktivität von C3-Pflanzen v.a. unter Hitze- und Trockenstreß-Bedingungen limitiert (Parry, Andralojc et al., 2003).

Die PEX10- Δ Zn1-Mutante, die unter normalatmosphärischem CO₂-Partialdruck in Wuchs und Photosyntheseleistung und damit Produktivität retardiert ist, sich aber unter erhöhtem CO₂-Partialdruck normal entwickelt, weist eine Störung der Photorespiration auf. Eine EMS-Mutagenese von Samen dieser Mutante mit anschließendem *Screen* auf Suppressoren des kleinwüchsigen Phänotyps unter Normalatmosphäre sollte die Möglichkeit eröffnen einen potentiellen neuen Teilnehmer der Photorespiration zu identifizieren, oder eine Mutation eines bereits bekannten, in die Photorespiration eingebundenen Proteins als für die Suppression des Δ Zn-Phänotyps verantwortlich zu finden.

Von den 250.000 M₂-Pflanzen, die unter Normalatmosphäre im Gewächshaus angezogen wurden, blieb ca. 1% schnee-weiß, klein und entwickelte sich nicht weiter. Dies waren Chlorophyll-Mutanten, die die Effizienz der EMS-Mutagenese belegten. Darüber hinaus entwickelte sich ein hoher Anteil der Pflanzen überproportional vital mit einer Biomasse, die deutlich über der des Wildtyps lag. Da die 35S-getriebene Überexpression des punktmutierten PEX10- Δ Zn-Konstrukts für die Ausprägung des zwergeuwüchsigen,

chlorotischen Phänotyps der PEX10- Δ Zn1-Mutante verantwortlich war, wurde ein *Silencing* des 35S-Promotors vor dem Δ Zn-Konstrukt als Ursache für den vitalen Phänotyp vermutet. Eine RT-PCR konnte das *Silencing* des 35S-Promotors in den vitalen Pflanzen belegen (s. 2.5).

Der verminderte Organellenkontakt zwischen Peroxisomen und Chloroplasten (evtl. auch der Mitochondrien) und nicht ein reduzierter Matrixprotein-Import konnte im Verlauf der vorliegenden Arbeit als Grund für den photorespiratorischen Phänotyp in PEX10- Δ Zn-Linien gezeigt werden. Die Ursachen dieses Kontaktverlusts wurden weiter oben bereits diskutiert. Neben einer direkten Interaktion des Zink RING-Fingers von PEX10 mit einem Proteinpartner in der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten wäre auch eine Interaktion von PEX10 mit Bestandteilen des Teilungsapparates von Peroxisomen vorstellbar. Die Auswirkungen einer möglichen beeinträchtigten Polyubiquitinierung von PEX5 oder Bestandteilen der Matrix, die für den Abbau über das Proteasom vorgesehen sind, auf den Organellenkontakt sind unklar.

Eine Mutation in Interaktionspartnern von PEX10 in der Chloroplasten- oder evtl. auch Mitochondrienmembran, die die verringerte Wechselwirkungsfähigkeit des PEX10- Δ Zn-Proteins ausgleicht, wäre vorstellbar, wenn auch unwahrscheinlich.

Die Überexpression von PEX5 oder PEX10 konnte das Fehlen des Zink RING-Fingers von PEX12, die Domäne über die PEX12 Kontakt zu PEX5 und PEX10 herstellt, ausgleichen. Dies spricht für eine gewisse Redundanz für die Proteine des RING-Komplexes (Chang, Warren et al., 1999). Ob auch PEX10 durch erhöhte Proteinabundanz von PEX2 oder PEX12 „ersetzt“ werden kann, könnte durch Überexpression der Wildtypkonstrukte von PEX2 oder PEX12 im PEX10- Δ Zn-Hintergrund untersucht werden, oder durch Einkreuzung der PEX2-Wt-Überexpressionslinie in die PEX10- Δ Zn1-Linie.

Da die Zink-Finger-Mutation in PEX10 aber keine Auswirkung auf den Matrixprotein-Import hat, anders als zumindest für PEX2 in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist der für den Matrixprotein-Import notwendige Komplex der drei Peroxine nicht gestört. Die Auswirkung der Zink-Finger-Mutation in PEX10 auf den Organellenkontakt ist demnach speziell und vielleicht unabhängig von einem Komplex. Demnach könnte diese Funktion von PEX10 nicht von den anderen beiden Zink-Finger-Peroxinen übernommen werden und erhöhte Transkriptmengen von PEX2 und/oder PEX12 blieben ohne Auswirkung auf den Organellenkontakt-Verlust in PEX10- Δ Zn1. Damit wäre eine second-site Mutation, die PEX12 oder PEX2 betrifft und deren Aktivität steigert, ohne Auswirkung auf den Organellenkontakt. Eine derartige Aktivitätssteigerung erlaubte die Identifizierung des pflanzlichen PEX2 über die *ted3*-Mutante, die eine Punktmutation vor dem Zink RING-Finger von PEX2 trägt und zu einer Funktionssteigerung des Peroxins führte, so daß

dieses den deetiolierten Phänotyp der *det1*-Mutante ausgleichen konnte (Hu, Aguirre et al., 2002).

Von weit größerem Interesse, weil nicht auf die photorespiratorischen Defekte der PEX10- Δ Zn-Mutante beschränkt, wäre die Unterdrückung des photorespiratorischen Phänotyps in PEX10- Δ Zn1 durch eine generelle Reduktion der Photorespiration, die einen Glycolat-Zyklus überflüssig machen würde. Dadurch blieben mögliche Beeinträchtigungen des Zyklus von vorne herein ohne Wirkung. Das würde bedeuten, daß die Oxygenaseaktivität der RuBisCO auf die eine oder andere Weise gesenkt werden müsste. Forschungsarbeiten darüber begannen kurz nach Entdeckung der Oxygenase-Aktivität der RuBisCO durch Bowes und Kollegen (1971). Durch Anzucht von Pflanzen unter atmosphärischen Bedingungen, die knapp oberhalb des CO₂-Kompensationspunktes lagen, konnten Pflanzen mit niedriger Photorespirationsrate gedeihen, während solche mit normaler Photorespirationsrate starben. Vergleichbare *Screens* wurden auch von Somerville und Kollegen (1986) und anderen Arbeitsgruppen an induzierten Mutanten der Photorespiration unternommen (Medrano and Primo-Millo, 1985). Die Versuche, Pflanzen zu isolieren deren Spezifitätsfaktor der RuBisCO bezüglich CO₂ und Sauerstoff erhöht war, scheiterten jedoch (Parry, Andralojc et al., 2003).

Angesichts des häufig auftretenden 35S-*Silencings* als Grund für normales Wachstum der „Revertanten“ des photorespiratorischen Phänotyps der PEX10- Δ Zn1-Mutante, wäre eine Wiederholung eines *Suppressorscreens* mit Pflanzen, deren Δ Zn-Konstrukt unter der Kontrolle des endogenen Promotors steht, vorstellbar.

Allerdings bleibt zu berücksichtigen, daß die Senkung der Photorespiration mit einer Abnahme der Nitrat-Assimilation verbunden ist, was an *Arabidopsis* und Weizen gezeigt werden konnte, die unter Hoch-CO₂ wuchsen. Pflanzen, die ihren N-Bedarf hauptsächlich über Nitrat und nicht über Ammonium decken, wie das auf gut durchlüfteten Ackerböden und Weideland gemäßigter Breiten der Fall ist, wären bei reduzierter Photorespiration mit einem Stickstoffmangel konfrontiert, der sich in einer Reduktion des Proteingehalts und damit auch der RuBisCO in den oberirdischen Pflanzenteilen äußert (Rachmilevitch, Cousins et al., 2004).

Die steigende Konzentration von CO₂ in der Atmosphäre, die, nach Schätzungen, bis zum Ende des 21. Jahrhunderts 600 bis 1000 ppm erreicht haben wird, könnte darüber hinaus nach Pflanzen mit verringerter Spezifität der RuBisCO für CO₂ verlangen, so daß Anstrengungen zur Reduktion der Photorespiration über eine Erhöhung der Spezifität der RuBisCO für CO₂ sich erübrigen würden, da der Proteingehalt der Pflanzen dadurch sinkt (Cox, Betts et al., 2000).

3.3. Die Klonierung eines cDNA-Fragments der Wassermelonen-DEG15-Protease

Die Glyoxysomale Processing Protease (GPP) aus Wassermelone konnte über einen α -DEG15-Antikörper, der gegen die DEG15 aus *Arabidopsis* gerichtet war, als DEG15 identifiziert werden (Helm, Lück et al., 2007). Für eine Sequenzierung des Proteins war mengenmäßig zu wenig Protein vorhanden, so daß die Bestimmung der Masse tryptischer Peptide die Identifizierung der glyoxysomalen Processing Protease als DEG15, unabhängig vom Western-Blot, ermöglichen sollte.

Hierfür war die Kenntnis der Aminosäuresequenz nötig, da die Abweichung von nur einer Aminosäure die Sequenzbestimmung aus den Massenspektren unmöglich gemacht hätte. Hierfür wurde in dieser Arbeit ein revers genetischer Ansatz zur Klonierung der DEG15 aus Wassermelone über RT-PCR mit degenerierten Primern unternommen, die anhand eines Alignments der Aminosäuresequenz der DEG15 von *Arabidopsis* und Reis entwickelt wurden, und der in der erfolgreichen Klonierung eines Teilfragments der DEG15 resultierte.

Mehrere Re-PCR-Reaktionen auf einem extrahierten Schmierbereich der Agarosegele, der in etwa der mit den verwendeten Primerkombinationen zu erwartenden Fragmentgröße entsprochen hat, resultierten in einer ca. 300 bp langen cDNA-Bande. Nach Klonierung und Sequenzierung musste festgestellt werden, dass trotz der Versuche die Spezifität der degenerierten Primer so hoch wie möglich zu gestalten und den Re-PCR-Reaktionen neben der DEG15-cDNA noch cDNA-Fragmente der glyoxysomalen Malatsynthase und der S-Adenosyl-Methyltransferase kloniert wurden.

Die Primerspezifität wurde durch Vermeidung der Aminosäuren Arginin, Leucin und Serin, deren Anitcodon einen besonders hohen Degenerierungsgrad aufweist, ebenso erhöht wie durch die Ermittlung der *codon usage* anhand der bekannten Sequenzen von prä-gMDH und prä-mMDH aus Wassermelone, die eine Eingrenzung der „Wobble-Möglichkeiten“ erlaubte. Das anfängliche Weglassen der für die Subklonierung der cDNA-Banden vorgesehenen Restriktionsschnittstellen an den Primerenden und das Hinzufügen der gleichen Primer mit Restriktionsschnittstellen im Verhältnis 9 zu 1 innerhalb der verbleibenden 24 PCR-Zyklen sollte die Spezifität der PCR gleich zu Beginn so hoch wie möglich gestalten. Die ersten Versuche unter Verwendung von Primern mit Restriktionsschnittstellen von Beginn der PCR an schlugen fehl. Sie lieferten zwar distinkte DNA-Banden auf Agarosegelen, die sich jedoch als Fragmente zahlreicher cDNAs von unterschiedlichsten Proteinen herausstellten.

Die letzte der zur erfolgreichen Klonierung geführten PCR-Reaktionen stellte eine *Nested-PCR* dar wodurch nochmal eine Erhöhung der Spezifität erreicht werden konnte.

Anhand der über einen BLAST-Sequenzvergleich als DEG15-Fragment identifizierten Teilsequenz wurde ein Primerpaar entworfen, das exakt diesen Abschnitt spezifisch amplifizieren und in der folgenden RACE-PCR als Positivkontrolle der RNA-Isolation dienen sollte (s. Abbildung 71). Für die eigentliche RACE-PCR musste erneut RNA aus Wassermelonenkeimlingen isoliert werden. Der Versuch einer Amplifikation des bereits bekannten cDNA-Abschnitts mit den eben erwähnten, als Positivkontrolle gedachten Primern schlug jedoch fehl. Es wurde vermutet, dass bei der zweiten RNA-Isolation zwei Tage alter Wassermelonenkeimlinge das optimale Zeitfenster für die Isolation der mRNA der DEG15 um vielleicht wenige Stunden verpasst wurde.

Tatsächlich war bei den Keimlingen dieser zweiten Aufarbeitung das Hypokotyl bereits etwas länger, was bei der ersten Aufarbeitung noch nicht der Fall war, obwohl die Wachstumsbedingungen beider Versuche gleich waren. Während der Fettmobilisierung im Zuge der Keimung ist ein vermehrter Import von Matrixproteinen in die Glyoxysomen festzustellen, die an β -Oxidation und Glyoxylat-Zyklus beteiligt sind. Einige dieser Enzyme tragen ein Peroxisomales Targetingsignal Typ 2 (PTS2), das nach erfolgtem Import des Proteins in die Peroxisomenmatrix von der DEG15 abgespalten wird. Folglich ist die Abundanz der DEG15 zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung fettspeichernder Keimlinge besonders hoch. Für die Reinigung des DEG15-Proteins aus Wassermelone wurden deshalb drei Tage alte Keimlinge herangezogen. Eine mRNA-Isolation des gleichen Proteins sollte demnach vor diesem Zeitpunkt erfolgen. Es wäre innerhalb einer Zeitreihe herauszufinden wann das Expressionsniveau der DEG15 am höchsten ist, um den optimalen Zeitpunkt für die mRNA-Isolation zu ermitteln.

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, dienen die Firmen Sigma-Aldrich GmbH (München), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) sowie Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) als Bezugsquellen für Chemikalien und Lösungsmittel.

4.2. Anzucht und *Screening* von Organismen

4.2.1. *Escherichia coli*

Lösungen:

- LB-Medium (Trypton (10g), Hefeextrakt (5g), NaCl (10g), Angaben pro Liter).

Bestandteile in 950 ml ddH₂O lösen, den pH-Wert auf 7,0 mittels 5 N NaOH einstellen und auf 1l mit ddH₂O auffüllen. Nach Zugabe von 18 g Agar, wenn Selektionsplatten gegossen werden sollen, autoklavieren. Wenn das Medium Handwärme erreicht hat, entsprechendes Antibiotikum steril zugeben.

Über-Nacht-Kulturen für Plasmidisolierungen sowie Vorkulturen zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen werden mit einer Einzelkolonie in 5 ml LB_{liqu.} angeimpft und ü/N bei 37°C und 200 rpm bis Erreichen der stationären Phase hochgezogen. Hauptkulturen (400 ml) werden mit 400 µl aus Vor-Kulturen angeimpft und bis zur gewünschten OD₆₀₀ inkubiert.

Die Kultivierung frisch transformierter *E. coli* erfolgt in SOB-Medium (s. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*).

Agrobakterien werden ebenfalls in LB-Medium kultiviert, allerdings bei 28-30°C inkubiert. Sowohl Vor- als auch Hauptkulturen werden für 24h angezogen.

4.2.2. *Arabidopsis thaliana*

Substrate:

- MS-Medium (2,5 ml 400x Mikrosalze, 0,1l 10x Makrosalze, 10 g Saccharose, 1 g MES, 9 g Agar, pH-Wert auf 5,8 mittels KOH einstellen, Angaben pro Liter)
- Fruhstorfer Einheitserde Typ T

Reagenzien:

- Makrosalze (16,5 g NH_4NO_3 , 19 g KNO_3 , 1,7 g KH_2PO_4 , 4,4 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,7 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Angaben pro Liter)
- Mikrosalze (27,8 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 37,2 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,75 mg KJ, 10 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 mg H_3BO_3 , 2 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mg $\text{Na}_2\text{MoSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,025 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,025 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Angaben pro Liter)

Vor dem Ausbringen auf MS-Agar werden Arabidopsis Samen für 25 min in 80% Ethanol und 0,1% Triton-x-100 in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen unter heftigem Schütteln oberflächensterilisiert. Weitere 3 min zusätzlich mit 3% NaOCl, um Pilzsporen zu eliminieren. Es folgen 4 Waschschrte mit sterilem ddH₂O. Mittels 1000 ml Pipette werden die Samen einzeln nebeneinander zu je ca. 100 pro 15-cm-Petrischale ausgebracht. Die Samenruhe wird durch Inkubation der Platten für 24 h bei 4°C gebrochen. Die Keimung erfolgt bei 22°C in Dauerlicht (250 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Nach 12 Tagen erfolgt das Pikieren in Töpfe mit Einheitserde, die mit einer 1 cm dicken Perlit Tonschicht zur Feuchtigkeitsregulation unterfüttert ist. Das weitere Wachstum findet entweder in Phytokammern (Convicon, Kanada) unter Langtag Bedingungen (16 h Licht, 65% rel. Luftfeuchte, 22°C und 8 h Dunkelheit, 75% rel. Luftfeuchte, 18°C) oder im Gewächshaus ebenfalls unter Langtag allerdings unter stärker schwankenden Feuchtigkeitsbedingungen statt. Die Bewässerung erfolgt ca. alle 3 Tage manuell.

Das Screening der PEX10- und PEX2-Primärtransformanden erfolgt durch ausbringen von ca. 15000 Samen je Erdschale, die mit 1,5 l 1/1000 verdünnter Basta-Lösung getränkt wird. Die Folgegenerationen segregieren auf MS-Agar, dem Basta in einer Verdünnung von 1/30000 vor dem Gießen der Platten zugegeben wird. Das Screening der PEX12-Mutanten erfolgt auf MS-Agar unter Hygromycin-Selektionsdruck [100 $\mu\text{g/ml}$].

Die PEX10- bzw. PEX2-Primärtransformanden werden unter Hoch-CO₂ Bedingungen (1800 ppm CO₂ Partialdruck) in Phytokammern des Lehrstuhls für Grünlandlehre (Prof. H. Schnyder) gescreent, um auch starke Allele zur Samenreife zu bringen. Für die PEX10-TILLING-Linien, PEX10- und PEX2-RNAi-Linien, die Aminotransferase-Mutanten sowie immer dann, wenn ein photorespiratorisch auffälliger Phänotyp unterdrückt werden soll, erfolgt die Anzucht dieser Pflanzen unter Hoch-CO₂ Bedingungen entweder am Lehrstuhl für Grünlandlehre oder im Haus. Letzteres geschah in eigens dafür präparierter Phytokammer, die durch direktes einleiten einer zur Unterdrückung des Phänotyps ausreichenden Menge CO₂ versorgt wird (Flußrate 40 ml/min, damit ist bei einem Kammervolumen von 1,7 m³ ein Partialdruck von 5000 ppm, der ca. 8,5 l CO₂ entspricht, nach gut 3 h erreicht). Das Anbringen zweier Spundwände mit Randdichtung verhindert das sofortige Ausströmen des CO₂ bei Öffnen der Türen.

Die PEX12-Mutanten werden unter Normalatmosphäre gescreent, um sofort einen eventuellen Phänotyp zu provozieren.

4.2.3. *Citrullus vulgaris*

Zur Bestimmung der *C. vulgaris* *DEG15* cDNA-Sequenz mittels degenerierter Primer werden Wassermelonen-Samen („Dixie-Queen“; Landreth Seed Co., USA) für eine halbe Stunde in 30% Ethanol sterilisiert, 4 mal mit sterilem ddH₂O gewaschen und auf autoklaviertem Filterpapier in kleinen Petrischalen kreisförmig zu je ca. 15 Stück ausgebracht. Die Keimung erfolgt im Dunkeln bei 30°C für 2 Tage. Die RNA-Isolation erfolgt wie unter „Isolation pflanzlicher Gesamt-RNA“ beschrieben.

4.3. Oligonukleotide

MWG (Martinsried) lieferte die Oligonukleotide (Primer) für PCR-Reaktionen und Sequenzierungen. Die Lyophilisate wurden nach Herstellerangaben mit doppelt destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt und bei -20°C gelagert. Das Design der Primer erfolgte, wenn nicht anders angegeben, auf den Internetseiten *isectprimers* des SALK-Instituts (<http://signal.salk.edu/isectprimers.html>) bzw. *dCAPS finder* (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>), zur Klärung der Zygotie-Verhältnisse in TILLING-Linien. Eine *in silico* Analyse der gewonnenen Primer auf eventuelle Sekundärstrukturen oder Dimer-Bildung untereinander erfolgte mittels des Programms *genewalker* auf der *web page* von *cybergene* (<http://www.cybergene.se/primerdesign/genewalker/genewalker11.html>). Die damit berechnete Schmelztemperatur der Primer wurde als Richtlinie für die Berechnung der Annealing Temperatur in den PCR-Reaktionen herangezogen.

PEX10:

Primer	Sequenz [5` - 3`]	T _m [°C]	Verwendung
PEX10fwd1-Sense	GAAATGCACTCTCTGCTTAAGCAC	61	Nachweis ΔZn-Konstrukt in Pflanzen mittels überspannter <i>MbiI</i> -site auf genomischer wie auf cDNA-Ebene
PEX10rev2-Antisense	ATGCACTGTCCTTAGGTGTCCTG	61	s.o.
ΔZn1-fwd-sense	TGACTGGTTAATTATAGCCCA	56	Genomische

			Verifikation der T-DNA-Integrationen in Δ Zn 1, 2 und 4
Δ Zn1-rev-anti	CAATAGGTACGAGAACACCTG	56	s.o.
Δ Zn2-fwd-sense	GAAATGAGTACATCGCCATAG	56	s.o.
Δ Zn2-rev-anti	GGGAGTAAAGAAAATGGAGTC	56	s.o.
Δ Zn4-fwd-sense	CGAACACAACCAAAGATAAAC	56	s.o.
Δ Zn4-rev-anti	CCATATTCGTCTCTGTTCTTG	56	s.o.
PEX10TILLf-s	TGAGTTTCCATGAGATTTTTGATTATTTG	63	Genomische Verifikation der PEX10-TILLING-Linien
PEX10TILLr-a	AGTCTCAAAATAGGATTAACATATAACCTTGT	60	s.o.
PEX10TILL94121	AAATGCGACGAAACCTAATCTCGCTG	64	s.o.
PEX10TILL92077	TTTGTTCATATTGTACCAGACCGCGGTT	65	s.o.
PEX10TILL94019	GGGAATTTGATAACTTCGGAACCTGAAAA	66	s.o.
AtPEX10-pBI-Antisense	<u>TTGAGCTCGTCTTGTAATAGATCTCCAAT</u>	65	Klonierung von AtPEX10 in binären Vektor pBI121 und SOE-Außenprimer, <u>SacI</u>
AtPEX10-pBI-sense	<u>AAGGATCCATGAGGCTTAATGGGGATTTCG</u>	69	s.o., <u>BamHI</u>
Pex10-sequ.-mitte	GATAACTTCGGAAGCTGAAAAGG	59	Sequenzierung, bindet kurz vor Zink Finger
AtPEX10-T7-se1	ATAT <u>GCTAGC</u> <u>ATGGCTTCTATGACTGGAGGACAACAAATGGGA</u> (GGATCT) ₃ ATGAGGCTTAATGGGGATTTCG	57	T7-tagging, <u>NheI</u>
AtPEX10-T7-se2	ATAT <u>GCTAGC</u> <u>ATGGCTTCTATG</u>	58	s.o.
At-PEX10-T7-as	A <u>GAGCTC</u> CTAAAAATCAGAATGATACAAAC	58	s.o., <u>SacI</u>
dZn1-cDNA-fwd	GGGAATTTTCAAGAGAAAACCA	58	Transkript-Verifikation der Gene, in welche die T-DNA in Δ Zn 1, 2 und 4 integriert ist.
dZn1-cDNA-rev	ATGGCTACATCTGACTGCAAG	58	s.o.
dZn2-cDNA-fwd	TCTCTGTATACGTCTCGGTGC	58	s.o.
dZn2-cDNA-rev	TCTGCAGGTAAGATGGCATAG	58	s.o.
dZn4-cDNA-fwd	ATGGCTTCCTTCACCTGTTC	59	s.o.
dZn4-cDNA-rev	ATGTTCTCCTCCGCCAAA	59	s.o.
Sail/Salk-Zn1-fwd	GACTGCAACCAAAGCAATTTA	58	Genomische Verifikation der T-DNA-Integrationen in Salk-Linien
Sail/Salk-Zn1-rev	ATGGTTGGAGGATATCAAAGC	58	s.o.
Sail-Zn2-fwd	TCTTACACTCTTCTGTGTCGG	58	s.o.
Sail-Zn2-rev	CGGGCTTAAGGTACTTAGCTG	58	s.o.
Salk-Zn2-fwd	CCGACACCATATTCAACAAAG	58	s.o.
Salk-Zn2-rev	CGATCTCCTTGTCGATACTCA	58	s.o.
Sail-Zn4-fwd	GGAAGAAAAACCTGACGAGAC	58	s.o.

Sail-Zn4-rev	GAAATCGCAAAAACCTCAGAGA	57	s.o.
QRT-T7-se	<u>GCTAGCATGGCTTCTATGACTGG</u>	60	Q-PCR, bindet auf T7-tag, <i>NheI</i>
PEX10-QRT-as	CATAGTAAAGCATCTGTCCAAGT	59	Q-PCR, liefert mit QRT-T7-se 301 bp
PEX10QRT5' UTRse	CATCATTCGGCAAGTTCATCGAT	60	Q-PCR, liefert mit PEX10-QRT-as 286 bp
AD-2	NGTCGA (G/C) (A/T) GANA (A/T) GAA		Zufällig degeneriert, <i>TAIL</i> -PCR, Bestimmung T-DNA-Integration in PEX10- Δ Zn
RB3	GCTCATTAAGTCCAGAAACCC		Bindet <i>right border</i> von pBI121, <i>TAIL</i> -PCR, s.o.

PEX2:

At-PEX2-pBI-sense	ATCCCCGGGATGACGCCGTCTACG CCTGCAGACG	63 ab Startcodon	Klonierung von AtPEX2 in pGEM7 und SOE-Außenprimer, <i>SmaI</i>
At-PEX2-pBI-antisense	TTGAGCTCTTCATTCAACAATGGT AGGTTCTCAAC	63 ohne Restriktionsstelle	s.o., <i>SacI</i>
At- Δ Zn2-sense	GGTCAGCTCAGGTACGGTTACTAC GGCATAAGGACCCGCTGCGC	79	Erzeugung der Δ Zn-Version in SOE-PCR, <i>Bpu10I</i>
At- Δ Zn2-antisense	GCCGTAGTAACCGTACCTG AGCTG ACCAGGCAGAGCTATAAACGG	78	s.o.
At-PEX2-T7-se1	ATAGCTAGC ATGGCTTCTATGACT GGAGGACAACAAATGGGA (GGATC T) ₃ ATGACGCCGTCTACGCCTGC	57 ab Startcodon	T7-tagging, <i>NheI</i>
At-PEX2-T7-se2	ATAGCTAGC ATGGCTTCTATG	57	s.o.
At-PEX2-T7-as	<u>AGAGCTCTCATTTGCCACTTGAAA</u> CACC	57	s.o., <i>SacI</i>

Aminotransferasen:

At2g13360-agt-fs	TCAATAAACAAATTTAGTAAGCGGG	56	Genomische Verifikation der T-DNA-Integrationen in Salk-Linien
------------------	---------------------------	----	----------------------------------------------------------------

At2g13360-agt- ra	AAGGCTTTCTGAGACCCAGTC	60	s.o.
At1g23310- ggt1-fs	TCATAGGTTTTGATGGAAATGGG	57	s.o.
At1g23310- ggt1-ra	CACTTAACCGGCGAGAGAATC	60	s.o.
At1g70580- ggt2-fs	GGTTGTAGAGGGGAAGTGAGG	62	s.o.
At1g70580- ggt2-ra	ATGATAAAACCAAATGAAATGGCTC	56	s.o.
ggt1-AT Flag rev	GTCCTCAGATGGAACACA	52	RT-PCR auf Flag_367D02 in Kombination mit At1g23310- ggt1-fs

PEX12:

At-PEX12- pBI-sense	AAGGATCCATGTTGTTTCAGGT GGGAGGTG	67	Klonierung von AtPEX12 in pGEM7 und SOE- Außenprimer, <u>BamHI</u>
At-PEX12- pBI- antisense	CACCCGGGATAAAATTTGA TCAGTATATAAA TTTT	78	s.o., <u>SmaI</u>
At-dZn12- se-Kpn2I	GGATTTGTTTTTCGGCTATTCCGGAAGT ATTTAAGTATGTTTCAAAGTACAAGCG	78, Überlappung mit At- dZn12-as- Kpn2I hat ~70°C	Erzeugung der Δ Zn- Version in SOE- PCR, <u>Kpn2I</u>
At-dZn12- as-Kpn2I	ATACTTAAATACTCCGGAATAGCC GAAAACAAATCCAGAGACAGTGAC	78	s.o.
At-PEX12- BglII	TTTAGATCTAATGGCTAGCATGACTGGT	64	Amplifikation der PEX12-T7-cDNA aus pET28a(+), <u>BglII</u>
At-PEX12- Eco72I	TTTCACGTGCCGGGATAAATTTGATCA	64	s.o., <u>Eco72I</u>

Sonstige:

EGFP-for- atg	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	58	Nachweis GFP, genomisch und cDNA
------------------	--------------------	----	----------------------------------------

EGFP-rev-stop	TCTTACTTGTACAGCTCGTC	55	s.o.
Actin-fw	ATGAAGATTAAGGTCGTGGCA	56	RT-PCR-Kontrolle
Actin-rev	TTCGAGTTTGAAGAGGCTAC	57	s.o.
LB3/LB232	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC	65	T-DNA <i>left border</i> Primer für SAIL-Linien, wenn mit pCSA110 erzeugt
f-s G	<u>CAAGCTT</u> GTGYCTNCCNGGNATGGA	66, 55 ohne Restr.- site	Deg15 <i>Sense</i> - Primer, auf As CLPGME basierend
f-s D	<u>CAAGCTT</u> GCATCTNCTNGARCCNTGG	66, 56 ohne Restr.- site	Deg15 <i>Sense</i> - Primer, auf As HLLPEW basierend
r-a D	<u>GGAATTC</u> CCTGNAGNAGNGCAAYATC	63, 50 ohne Restr.- site	Deg15 <i>Antisense</i> - Primer, auf As DIALLO basierend
Deg-ctr-fwd-td	GGCCTAGTATATGGTGAAGGAGACGACAATGG	70	Deg15 Positivkontrolle
Deg-ctr-rev-td	CAGATATAGACCACTTTAGCAGGACACCAAGTCC	70	s.o.
LBa1/LB302	TGGTTCACGTAGTGGCCATCG	60	T-DNA <i>left border</i> Primer für SALK-Linien oder für SAIL-Linien, wenn mit pDAP101 erzeugt

Tabelle 1: Primerliste. Namen der in dieser Arbeit verwendeten Primer, deren Sequenz, Schmelztemperatur (T_m) und Verwendungszweck. Die in den Primern f-sG, f-sD und r-aD verwendeten Buchstaben Y, N und R stehen für C/T, A/G/C/T und A/G gemäß dem Universalcode.

4.4. Molekularbiologische Techniken

4.4.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zu analytischen Zwecken wird die exponentielle Amplifikation von DNA standardmäßig in einem Reaktionsvolumen von 20 µl wie folgt durchgeführt. 1 µl einer Plasmid-DNA-

Präparation (V_{ges} 50 μl) wird mit dem Mastermix bestehend aus 0,5 μl Polymerase Phire-Hotstart (Finnzymes, Finnland), 4 μl entsprechenden 5x-Reaktionspuffers, je 1 μl Primer (Endkonzentration 5 μM), 1 μl dNTPs (Endkonzentration 0,5 mM) und 11,5 μl ddH₂O zur Reaktion gebracht. Die Initialdenaturierung findet bei 98°C für 2 min statt. Die anschließenden 30 Zyklen wechseln zwischen Denaturierung bei 98°C für 5 sek, der Annealingtemperatur für 10 sek und der Elongation bei 72°C für 15 sek/kb. Die finale Elongation bei 72°C für 2 min wird durch Abkühlung des Reaktionsansatzes auf 18°C abgebrochen.

Zu präparativen Zwecken wie Klonierung und Restriktionsverdau findet die PCR in einem Reaktionsvolumen von 50 μl statt. Die Konzentrationen oben genannter Komponenten sind dieselben. Zu Klonierungen findet eine Polymerase mit 3`-5`-Exonuklease Aktivität (*Proof-Reading*) wie die High-Fidelity (Roche®) oder die Phusion (Finnzymes, Finnland) Verwendung, wobei die Elongationszeit der niedrigeren Prozessivität der jeweiligen Proof-Reading-Polymerase angepasst wird.

4.4.2. RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)

Die Synthese des cDNA-Erststranges erfolgt mit Hilfe des *Reverse Transcription System-Kits* (Promega, USA) nach Angaben des Herstellers wie folgt:

-11 μl Gesamt-RNA (ca. 0,5 – 0,6 μg) zusammen mit je 1 μl Oligo (dT)-Primer und *Random Hexamer*-Primer bei 70°C für 5 min inkubieren, um RNA-Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. Auf Eis für 5 – 10 min inkubieren. Anschließend erfolgt die Zugabe folgenden Reaktionsgemisches:

-5 μl M-MLV 5x Reaktionspuffer, 5 μl dNTPs (10 mM je Nukleotid), 0,6 μl rekombinanter RNasin Rnase Inhibitor und 1 μl M-MLV Reverse Transkriptase.

Der Ansatz wird bei 40°C für 60 min inkubiert, was der Arbeitstemperatur der M-MLV-Polymerase entspricht. Es folgt eine Inkubation bei 90°C für 5 min, um die M-MLV zu inaktivieren. Der Ansatz wird auf 4°C abgekühlt und auf 100 μl mit DEPC-ddH₂O aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei -20°C oder es wird gleich im Anschluß eine PCR angesetzt, die die Unterscheidung zwischen cDNA-Amplifikat und möglicher genomischer Verunreinigung erlaubt. Eine Verdünnung des Erststrang-Ansatzes in der darauf folgenden PCR von 1/20 sollte nicht unterschritten werden, um eine Inhibition der Taq-Polymerase durch Pufferbestandteile des Erststrang-Ansatzes auszuschließen.

4.4.3. TAIL-PCR (*Thermal Asymmetric Interlaced-PCR*)

Zur Bestimmung der T-DNA Integrationsstellen in den 4 unabhängigen PEX10- ΔZn -Linien von Uwe Schumann wurde in Kollaboration von Henriette O`Geen (University of California Davis) eine TAIL-PCR (engl., *Thermal Asymmetric Interlaced-PCR*) durchgeführt (Liu,

Mitsukawa et al., 1995). Da die Linien mit dem binären Vektor pBI121 erzeugt wurden, kam eine Kombination aus die pBI121 *right border* erkennenden Primern RB1 (5'-CTGCGTGCAATCCATCTTGTTTC-3'), RB2 (5'-GGAACGTCAGTGGAGCATTTTTG-3') oder RB3 (5'-GCTCATTAAGTCCAGAAACCC-3') und 3 verschiedenen degenerierten, zufällig im Genom von *A. thaliana* bindenden AD-Primern (*arbitrary degenerate*) zum Einsatz (Stahl, Horvath et al., 2002). Die Kombination der Primer AD-2 (NGTCGA (G/C) (A/T) GANA (A/T) GAA) und die *right border* erkennenden RB3 (GCTCATTAAGTCCAGAAACCC), der *nested* zum Primer RB2 (GGAACGTCAGTGGAGCATTTTTG) liegt, ergab die spezifischen DNA-Banden.

4.4.4. *Splicing by Overlap Extension-PCR*

Ursprünglich entwickelt, um beliebige DNA-Sequenzen aneinander zu *splicen*, findet die *Splicing by Overlap Extension-PCR* (kurz *SOE*, (Horton, Hunt et al., 1989)) in dieser Arbeit zur Erzeugung der Δ Zn-Versionen der Peroxine 2 und 12 Verwendung. Abbildung 75 zeigt schematisch die Vorgehensweise. In einer ersten PCR-Reaktion (*SOE1*) werden der N- und der C-terminale Bereich der Peroxine unabhängig voneinander mittels der Primer At-PEX2-pBI-sense und At- Δ Zn2-antisense (Reaktion A) bzw. At-PEX2-pBI-antisense und At- Δ Zn2-sense (Reaktion B) (Primerspezifikationen s. Oligonukleotide) amplifiziert. Im Falle von PEX12 kommen At-PEX12-pBI-sense und At- Δ Zn12-as-*Kpn2I* sowie At-PEX12-pBI-antisense und At- Δ Zn12-se-*Kpn2I* zum Einsatz.

Der *Reverse-Primer* der Reaktion A sowie der *Forward-Primer* der Reaktion B tragen die gewünschten Punktmutationen, die zur gerichteten Mutagenese der konservierten Aminosäuren des Zink RING-Finger-Motivs führen. In PEX10 führt diese Mutation zum Austausch der 3 Cysteine (342, 347 und 350) zu Glycin und des Histidins (344) zu Leucin. In PEX2 zum Austausch der 3 Cysteine (293, 298 und 301) zu Glycin und des Histidins (295) zu Leucin. In PEX12 zum Austausch der 2 Cysteine (360 und 363) zu Glycin. In diesem Teil findet eine Polymerase ohne 3'-5'-Exonuklease Aktivität wie die Phire-Hotstart (Finnzymes, Finnland) Verwendung, um die *site*-gerichtete Mutagenese zu gewährleisten. In der zweiten PCR werden die beiden Produkte der *SOE1* in äquimolarem Verhältnis gemischt und dienen 5 Zyklen lang einander als Primer, wodurch das gewünschte mutierte Konstrukt entsteht, das über die 2 nun zugesetzten Außenprimer der *SOE1* (At-PEX2-pBI-sense und At-PEX2-pBI-antisense für PEX2 bzw. At-PEX12-pBI-sense und At-PEX12-pBI-antisense für PEX12) innerhalb der folgenden 25 Zyklen amplifiziert wird. In der *SOE2* kommt eine Polymerase mit 3'-5'-Exonuklease zum Einsatz wie die High-Fidelity (Roche®, USA).

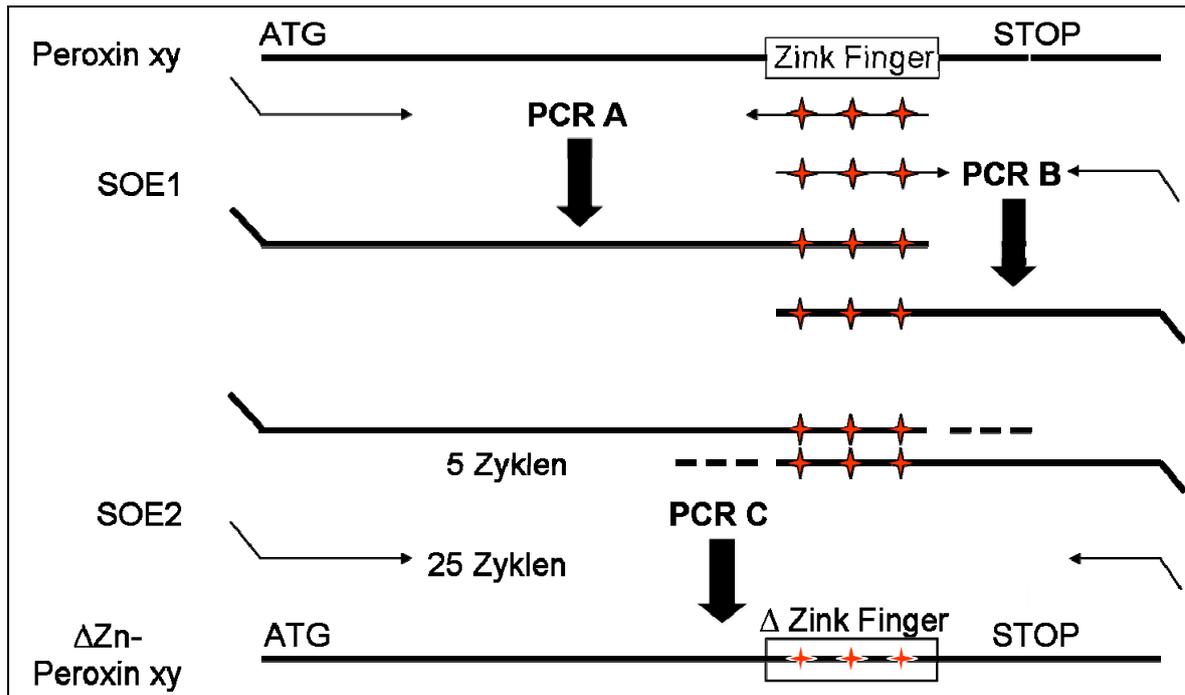


Abbildung 75: Schematische Darstellung der *Splicing by Overlap Extension* PCR mit ihren beiden Teilreaktionen SOE1 und SOE2. In der SOE1 werden N- und C-Terminus getrennt voneinander in PCR A- und B site-gerichtet mutiert. In der SOE2 werden die Teilfragmente innerhalb der ersten 5 Zyklen aneinander gespleißt und anschließend innerhalb der restlichen 25 Zyklen wird das Vollängenkonstrukt amplifiziert (PCR C). Punktmutationen sind als rote Sterne dargestellt.

In Abbildung 76 (s. n. Seite) sind die Zusammensetzung der einzelnen PCR-Reaktionen sowie die Programme der SOE-PCR aufgelistet:

SOE I	N-Term	C-Term	PCR- Programm			
ddH ₂ O	30,5 µl	30,5 µl	1.	98 °C	120 s	
Phire 5 x Puffer	10 µl	10 µl	2.	98 °C	30 s	
dNTPs	4 µl	4 µl	3.	50 °C	30 s	
AtPEX xy pBI sense	2 µl	X	4.	72 °C	60 s	30 x
AtΔZn xy as Restr. site	2 µl	X	5.	72 °C	120 s	
AtΔZn xy sense Restr. site	X	2 µl	6.	18 °C	Pause	
AtPEX xy pBI antisense	X	2 µl				
Templat: PEX xy wt cDNA	1 µl	1 µl				
Phire DNA- Polymerase	0,5 µl	0,5 µl				

SOE II (Fusion N-und C-Terminus)			PCR- Programm			
ddH ₂ O		1,5 µl	1.	95 °C	120 s	
Phusion 5 x Puffer		10 µl	2.	95 °C	30 s	
dNTPs		4 µl	3.	60 °C	60 s	
Templat		15 µl N-Term	4.	72 °C	30 s	5 x
		15 µl C-Term	5.	72 °C	120 s	
Phusion DNA- Polymerase		0,5 µl	6.	18 °C	Pause	

SOE II (Vollängenamplifikation)			PCR- Programm			
AtPEX xy pBI sense		2 µl	1.	95 °C	120 s	
AtPEX xy pBI antisense		2 µl	2.	95 °C	30 s	
			3.	60 °C	60 s	
			4.	72 °C	60 s	25 x
			5.	72 °C	240 s	
			6.	18 °C	pause	

Abbildung 76: In der *Splicing by Overlap Extension*-PCR verwendete Reagenzien, Volumina und zugehörige PCR-Programme. Das Kürzel „xy“ im Primernamen steht für die jeweilige cDNA, auf der die SOE innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurde, entweder PEX2 oder PEX12. „Restr. site“ im Primernamen steht für *NdeI* in PEX2, bzw. *Kpn2I* in PEX12.

Die über die SOE erhaltenen ΔZn-Versionen der PEX-cDNAs werden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in den Vektor pGEM7Zf(+) (Promega, USA) kloniert (s. Klonierungsstrategien).

4.4.5. Agarose Gelelektrophorese

Reagenzien:

- TAE-Puffer 50x (2M Tris, 5,7% Essigsäure, 50 mM EDTA, pH 8,0).
- Ethidiumbromid-Stammlösung (1% w/v)

Das Lösen der Agarose (1-3%) erfolgt in 1x TAE-Puffer durch aufkochen in der Mikrowelle bei 600-700 W. Nach Abkühlen auf Handwärme werden 2 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel zugegeben (Endkonzentration 0,2 µg/ml) und selbiges in Gießständen formgegossen. Präparative Agarosegele werden auf der GNA 200 Gelelektrophorese Apparatur (Pharmacia, Schweden) bei 130 V für ca. 90 min laufen gelassen, analytische Gele in Eigenbau-Kammern (Reischenbeck Josef) bei 200V für ca. 45 min. Die Dokumentation der DNA-Banden erfolgt unter UV-Licht (Bachofer-Laborgeräte, Deutschland) mittels Doc-it Apparatur und Software (Itf Labortechnik GmbH & Co KG, Deutschland).

4.4.6. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Für Restriktionsverdau sowie Re- bzw. *SOE-PCR* werden Gelbanden unter UV-Licht mittels Skalpell aus dem Gel geschnitten und dem Protokoll des Gel Extraktionskits NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Deutschland) unterzogen. Die Elution erfolgt in 15-33 µl mit doppelt destilliertem Wasser (70°C). Zur Erhöhung der Ausbeute wird das Eluat ein zweites Mal über die Säule zentrifugiert.

4.4.7. Restriktionsverdau von DNA

Analytische Verdau werden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt und 1 µl Restriktionsenzym auf 5 µl Plasmid-DNA (50µl *high-copy* Plasmidlösung) gegeben. Präparative Verdau werden in 50 µl durchgeführt, wobei sowohl Plasmid- als auch Enzymmenge verdoppelt werden. Das Enzym wird in zwei Anläufen à 1 µl zupipettiert, um die Vollständigkeit des Verdau zu gewährleisten. Die optimalen Pufferbedingungen in Doppelverdau werden über *DoubleDigest*[™] (Fermentas International Inc., Kanada) ermittelt.

4.4.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Ein typischer Ligationsansatz wird wie folgt pipettiert:

- 2 µl T4-DNA-Ligase
- 2 µl T4-Puffer

die verbleibenden 16 µl setzen sich aus Insert und Vektor, im als optimal für die Transformationseffizienz ermittelten Mol-Verhältnis von 3/1 bzw. 5/1, zusammen. Die

zuvor durchgeführten Verdau-Ansätze von Plasmid und Insert werden so gestaltet, dass ein möglichst geringes Volumen dem Ligationsansatz zupipettiert werden kann, um die T4-Pufferbedingungen im Optimum zu halten. Das verbleibende Volumen wird mit ddH₂O auf 20 µl Gesamtvolumen eingestellt.

Der Ansatz wird entweder bei RT für eine Stunde oder bei 4°C ü/N inkubiert und vollständig in darauf folgender Transformation eingesetzt.

4.4.9. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Reagenzien:

- Transformationspuffer (MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, PIPES 20 mM pH6,7). Ad 1l mit ddH₂O, Sterilisation durch 0,45 µm-Filter.
- SOB (nach Sambrook and Russel, *Molecular Cloning*, third edition, A 2.3) (Trypton 20 g, Hefeextrakt 5 g, NaCl 0,5 g). In 950 ml ddH₂O unter Schütteln lösen. Zugabe von 10 ml einer 250 mM KCl-Lösung. Einstellung des pH auf 7,0 mittels 5 N NaOH. Gesamtvolumen auf 1l mit ddH₂O einstellen. Sterilisation durch Autoklavieren. Vor Gebrauch Zugabe von 5 ml einer sterilen 2 M MgCl₂-Lösung.

Zwei mal je eine Kolonie von auf LB-Agar ausgestrichenen DH5α in 5 ml LB_{liqu.} animpfen und ü/N bei 37°C inkubieren. Davon 1 ml bzw. 200 µl in je 25 ml SOB überimpfen und 6-8 h bei 37°C inkubieren. Davon 7 ml bzw. 2 ml in je 200 ml SOB überimpfen und ü/N bei 18°C inkubieren. Zelldichte am folgenden Tag photometrisch bei 600 nm bestimmen und alle 45 min kontrollieren. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,55 werden die Kolben für 10 min auf Eis gestellt und die Zellsuspension anschließend bei 2500- 4000g und 4°C zentrifugiert. Den Überstand aspirieren und das Pellet in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer unter leichtem Schütteln resuspendieren. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 2500- 4000g und 4°C, der Überstand wird erneut aspiriert und das Pellet in 20 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert. 1,5 ml DMSO unter Schütteln zugeben und 10 min auf Eis vorhalten. Aliquots à 210 µl in N_{2liqu.} schockfrieren und bei -80°C bis zum Einsatz lagern.

4.4.10. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Reagenzien:

- SOC-Medium (Sambrook and Russel, *Molecular Cloning*, third edition, A 2.3): Entsprechend SOB-Medium (s. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*), zusätzlich 20mM Glucose (1M sterile Stock-Lösung), die nach Abkühlen des SOB-Mediums auf mind. 60°C zugesetzt wird, um eine Karamellisierung zu verhindern.
- TCM-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, steril filtriert)

Den Ligationsansatz mit 100 µl TCM-Puffer verdünnen und auf Eis vorhalten. 200 µl kompetente *E. coli* Zellen zupipettieren und 30-60 min auf Eis präzipitieren. Bei 25°C für 20 min „hitzebehandeln“, 500 µl SOC-Medium zugeben und 1h bei 37°C in mit Parafilm abgedichteten Eppendorf-Reaktionsgefäßen sanft schüttelnd inkubieren. Auf mit entsprechendem Antibiotikum versetztem LB-Agar ausplattieren.

4.4.11. Plasmid Präparation aus *E. coli*

Präparationen zu Sequenzierungszwecken wurden mit DNA-Mini-Präparations-Kits der Firmen Macherey-Nagel sowie Analytic-Jena nach Herstellerangaben durchgeführt. Zu Klonierungszwecken wurde folgendes Protokoll angewendet (Hattori and Sakaki, 1986):

Reagenzien:

- Lösung I (GET-Puffer: 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA in H₂O)
- Lösung II (1% (w/v) SDS, 0,2 M NaOH)
- Lösung III (3 M K-Acetat, 11,5% Eisessig)
- Phenol
- Chloroform
- 96% Ethanol
- 70% Ethanol

4 ml einer 5 ml Über-Nacht-Kultur in 2 Anläufen à 2 ml im selben Eppendorf Reaktionsgefäß bei 14.000 rpm für 2 min zentrifugieren. Das Pellet in 100 µl Lösung I durch Vortexen resuspendieren und für 5 min bei RT inkubieren. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II 10x vorsichtig invertieren und für 5 min auf Eis inkubieren. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III 10x vorsichtig invertieren und 5 min auf Eis inkubieren. Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min, Überstand mit 500 µl Phenol extrahieren, mischen und weiter 2 min bei RT inkubieren. Zugabe von 200 µl Chloroform, mischen und bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugieren. Die obere, wässrige Phase in 1 ml 96% Ethanol überführen und bei RT für > 10 min die Plasmid-DNA fällen. Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min den Überstand aspirieren, das verbliebene Pellet mit 70% Ethanol waschen, 2 min zentrifugieren, den Überstand erneut aspirieren und das Pellet bei RT für 15 min trocknen. Aufnahme des Pellets in 49 µl 0,1x TE + 1 µl RNase (Stock: 100 µg/ml), Inkubation bei 37°C für 1 h.

4.4.12. Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens*

Reagenzien:

- 10% (v/v) Glycerin

Eine 500 ml Über-Nacht-Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0,5–1 zuerst auf Eis kühlen und dann für 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugieren. Waschen der Zellen mit 500 ml eiskaltem ddH₂O und erneutes Zentrifugieren für 10 min bei 5000 rpm. Letzter Schritt wird einmal wiederholt, das Pellet in 20 ml 10 % Glycerol (steril) resuspendiert und erneut bei 5000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Zellen werden in 3 ml 10 % Glycerin (steril) aufgenommen und als Aliquots à 250 µl in N₂liqu. schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.4.13. Transformation elektrokompetenter *A. tumefaciens*

Geräte und Reagenzien:

- Elektroporator (Parameter: - V= 2000 V, R= 700 Ω, C= 25 µF, T= 17,5 ms)
- elektrokompetente Agrobakterien Stamm C58 pGV3101 (Van Larebeke, Engler et al., 1974) mit Ti-Plasmid pMP90 (bakterielle Resistenzmarker gegen Rifampicin und Gentamycin ((Koncz and Schell, 1986); (Ferrando, Farràs et al., 2000)), Stammsammlung #845
- LB-Medium

Kompetente Agrobakterien auf Eis auftauen, 80 µl davon mit 1 µl Plasmid-DNA (50 µl-Präparation) mischen, in Elektroporationsküvetten füllen und einem Stromstoß unterziehen. Anschließend die Zellen mit 600 µl LB-Medium versetzen und bei 28-30°C für 1,5-2 h sanft schütteln. Anschließend bei 1.200 rpm für 2 min zentrifugieren und den Überstand vorsichtig aspirieren, da das Pellet sehr locker ist. Selbiges in 100 µl LB-Medium aufnehmen und 10 bzw. 90 µl auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsdruck ausplattieren. Inkubation für etwa 2 d bei 28-30°C.

4.4.14. Transformation von *A. thaliana* mittels *floral dip*

Reagenzien:

- Infiltrationsmedium (50 g Saccharose, 500 µl Vac-IN-Stuff (Silwet L-77, Lehle Seeds, USA) und 10 µl BAP (Stock 1 mg/ml in DMSO oder EtOH), Angaben pro Liter)

Die Methode des *floral dip* (Clough and Bent, 1998) dient der Agrobakterien vermittelten Transformation der Infloreszenzen von ca. 2,5-3 Wochen alten Arabidopsis Pflanzen. Die

Anzucht der Pflanzen erfolgte in 4 großen Töpfen (9 x 9 cm) mit je ca. 20 Pflanzen pro zu transformierenden Konstrukts.

Eine 400 ml LB-Über-Nacht-Kultur elektrotransformierter, als positiv für das zu transformierende Konstrukt getesteter Agrobakterien, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt (Kan₅₀, Rif₅₀ für pBIAsclBar und pCAMBIA), wird für 8 min bei 5000g in einem zuvor autoklavierten Gefäß zentrifugiert. Das Pellet wird in Infiltrationsmedium resuspendiert und in ebenfalls zuvor autoklavierte 400 ml- Dipgefäße überführt. Der eigentliche Transformationsvorgang erfolgt durch Eintauchen möglichst vieler Infloreszenzen in diese Dipgefäße für ca. 10 sek. Nicht benetzte Infloreszenzen werden mittels Pipette mit dem Medium in Kontakt gebracht. Durch einwickeln der Pflanztöpfe über Nacht mit Cellofanfolie wird ein feuchtes, den Infiltrationsvorgang positiv beeinflussendes Milieu geschaffen. Nach drei Tagen wird obige Prozedur einmal wiederholt. Zellen, die sich erst beim zweiten infiltrieren im richtigen Entwicklungsstadium befinden, können nun transformiert werden, wodurch die Transformationseffizienz gesteigert wird.

4.4.15. DNA Isolation aus *A. thaliana* mittels CTAB

Modifiziert nach (Murray and Thompson, 1980).

Reagenzien:

- 2x CTAB-Puffer (2% (w/v) Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid (CTAB), 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA)
- Chloroform
- 2-Propanol
- 0% Ethanol
- TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA)

Bis zu 100 mg Blattmaterial (in N₂liq. schockgefroren) in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen mittels Rotor-Stator pulverisieren. Zugabe von 300 µl 2x CTAB-Puffer und bei 65°C für mindestens 10 min (bis zu mehreren Stunden) inkubieren. Auf Eis kurz abkühlen und 300 µl Chloroform zugeben, gründlich vortexen. Zentrifugation bei 14.000 rpm für 2 min (Phasentrennung) und wässrigen Überstand in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen. Zugabe von 300 µl 2-Propanol, gut mischen und bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugieren (Pelletierung der DNA). Überstand aspirieren, Pellet mit 500 µl 70% Ethanol waschen (kurz vortexen) und erneut bei 14.000 rpm für 2 min zentrifugieren. Überstand vorsichtig aspirieren und Pellet 15 min trocknen lassen.

Anschließend 49 µl 0,1x TE-Puffer (+1µl RNase (Stock: 100 µg/ml)) zugeben und bei 37°C für 1h inkubieren. Einsatz von 1 µl pro PCR-Reaktion.

4.4.16. RNA Isolation aus Pflanzen

4.4.16.1. Isolation pflanzlicher Gesamt-RNA

Pflanzliche Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Kits RNA II (Macherey-Nagel, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte zweimal mit 60 µl auf 70°C erwärmten, doppelt destillierten, DEPC-behandelten Wassers.

4.4.16.2. RNA-Fällung

Die Fällung *gepoolter* Gesamt-RNA erfolgte durch Zugabe von 3 M Na-Acetat (Endkonzentration 300 mM) und 100% Ethanol (Endkonzentration 70%). Es folgen eine Inkubation für 6 h bei -20°C, Zentrifugation für 30 min bei 10.000g, waschen des Pellets mit 80% Ethanol und erneute Zentrifugation für 10 min bei 10.000g. Das Pellet wird in DEPC-dd resuspendiert.

4.4.16.3. Isolation pflanzlicher mRNA über Oligo-dT-Zellulose

Nach "Selection of Poly(A)+ RNA by Batch Chromatography, Sambrook, 3rd ed., 2001, 7.18, 7.19".

Reagenzien:

- TES-Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 7,5), 0,1% (w/v) SDS)
- Oligo-dT-Zellulose (Pharmacia Typ 7)
- Absorptions-/Waschpuffer (TES + 0,5 M NaCl)
- Ammonium-Acetat (10 M)

Eine Gesamt-RNA von 1 mg (~23 u) wird auf 600 µl mit TES-Puffer aufgefüllt und mit Oligo-dT-Cellulose (Pharmacia Typ 7) vereint, die eine Kapazität von 80 u polyA+/g aufweist. Unter Annahme, dass 1 mg Gesamt-RNA zwischen 10 und 50 µg polyA+RNA (d.h. zwischen 1 und 5% bzw. zwischen 0,2 u und 1 u) enthalten, wurden 50 mg Oligo-dT-Cellulose in 500 µl Absorptionspuffer quellen gelassen und äquilibriert, um mit dieser knapp 4-fach höheren Menge als nötig ausreichend Bindekapazität zur Verfügung zu stellen.

Die 600 µl Gesamt-RNA-Lösung werden in abgedichteten Reaktionsgefäßen für 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend im Eiswasserbad schnell auf ca. 0°C abgekühlt. Die Salzkonzentration wird durch Zugabe von 75 µl (0,1 Volumen) 5 M NaCl eingestellt. 50

mg (500 µl) der äquilibrierten Zellulose werden zu den 600 µl RNA-Lösung gegeben und die Mischung bei RT für 15 min auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 600-800g (~1.500-2.500 rpm) in einer Tischzentrifuge wird der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und auf Eis vorgehalten.

Die verbliebenen, mRNA enthaltenden Pellets werden durch Zugabe von 1ml eiskaltem Absorptions-/Waschpuffer durch vorsichtiges Vortexen in Dispersion gebracht und erneut auf einem Rotationsschüttler für 2 min inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 2 min bei 600-800g, wobei die Überstände verworfen werden. Dieser letzte Absatz wird zweimal wiederholt.

Das mRNA enthaltende Pellet wird in 400 µl eiskaltem DEPC-dd durch vorsichtiges vortexen resuspendiert und sofort für 2 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Den Überstand behutsam aspirieren.

Die Elution der gebundenen mRNA erfolgt durch Zugabe von 400 µl DEPC-dd, Inkubation für 5 min bei 55°C und anschließende Zentrifugation für 2 min, 14.000 rpm und 4°C. Den Überstand in neuem Reaktionsgefäß sammeln und die Elution zweimal wiederholen.

Die Fällung der *gepoolten* mRNA erfolgt durch Zugabe von 0,2 Vol 10 M Ammonium-Acetat, 2,5 Vol 100% Ethanol und anschließender Inkubation bei -20°C für 30 min. Die mRNA wird durch Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm und 4°C pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Der Überstand wird jeweils vorsichtig aspiriert und der verbliebene Ethanol evaporiert.

Die mRNA wird in gewünschtem Volumen DEPC-dd gelöst und sofort einer cDNA Erststrang-Synthese unterzogen. Die Lagerung der mRNA erfolgt entweder in Formamid, aus dem es durch Fällung mit 4V Ethanol oder vierfacher Verdünnung mit 0,2 M NaCl und anschließender, konventioneller Zugabe von 2V Ethanol rückgewonnen wird, oder in DEPC-dd mit 0,1% SDS und 0,1 mM EDTA.

4.4.16.4. Isolation pflanzlicher mRNA mittels Magnetkugeln

Alternativ zur Oligo-dT-Cellulose kam das mRNA-Isolation Kit (Roche®) zum Einsatz, welches Streptavidin beschichtete Magnet-Kügelchen zur Separation der mRNA verwendet. Die Gesamt-RNA (hier 130 µg) wurde mit Lysepuffer auf ein Volumen von 200 µl eingestellt und nach Angaben des Herstellers weiter prozessiert. Die Magnetkugeln werden resuspendiert, 150 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mittels Magnetständer vom überstehenden Aufbewahrungspuffer separiert. Es folgt ein Waschschrift mit 250 µl Lysepuffer.

Parallel erfolgt die Hybridisierung der RNA-Lösung mit 1,5 µl Biotin-markierter Oligo-dT-Sonde. Markierte RNA-Lösung und Magnetkugeln werden vereinigt, letztere gründlich resuspendiert und das Gefäß für 5 min bei 37°C inkubiert.

Mittels Magnetständer erfolgt die Separation der jetzt mRNA beladenen Magnetkugeln von der Lösung innerhalb von ca. 3 min. Der Überstand wird verworfen und die Magnetkugeln dreimal in je 250 µl Waschpuffer resuspendiert und daraus separiert. Die Elution der mRNA erfolgte in 25 µl DEPC-dd durch Erhitzung auf 65°C und anschließende magnetische Separation der jetzt unbeladenen Magnetkugeln. Der die mRNA enthaltende Überstand wird in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Die mRNA wird einer sofortigen cDNA-Erststrang Synthese unterzogen oder gelagert wie unter 4.4.16.3 beschrieben.

4.4.17. Erststrangsynthese einer cDNA

Nach erfolgter RNA-Isolation wird selbige in cDNA überschrieben, um eine RT-PCR durchführen zu können. Die Synthese des cDNA-Erststranges erfolgt mittels *First-Strand-Synthesis-Kit* (Promega, USA) nach Herstellerangaben:

-ca. 0,5-1 µg Gesamt-RNA werden mit je 1 µl Oligo-dT-Primer und *Random-Hexamer*-Primer versetzt und 5 min bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Der Ansatz wird in 5°C-Schritten 2 min auf RT abgekühlt, um ein bestmögliches *Annealing* der Primer zu gewährleisten. Anschließend wird das Gemisch aus 5 µl M-MLV 5x Reaktionspuffer, 5 µl dNTPs (je 10 mM), 0,6 µl RNasin® Rnase-Inhibitor und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase hinzupipettiert und der cDNA-Erststrang 1h bei 40°C synthetisiert. Die Inaktivierung der M-MLV erfolgt bei 95°C für 5 min. Der Ansatz wird auf 4°C abgekühlt, ad 100 µl mit DEPC-ddH₂O aufgefüllt und entweder bei -20°C gelagert oder sofort einer PCR unterzogen, wobei zwischen 1 und 2 µl eingesetzt werden; wird mehr cDNA-*Template* eingesetzt, inhibieren die Bestandteile des Reaktionspuffers der M-MLV die Polymerase gänzlich.

4.4.18. Kreuzung von *A. thaliana*

Für eine manuelle Übertragung von Pollen der einen auf die Narbe der anderen Pflanze werden Infloreszenzen letzterer bis auf 3 noch geschlossene Einzelblüten reduziert und Kelch-, Blüten- sowie Staubblätter mittels Pinzette entfernt. Der Kontakt der Staubblätter dieser Blüte, wenn auch noch nicht maturiert, mit der Narbe muss vermieden werden, um eine Selbstbestäubung auszuschließen. Der Pollendonor-Pflanze wird eine Blüte entfernt, die sich gerade geöffnet hat. Durch leichtes Drücken auf den Kelch spreizt sich die Blüte auf und die Pollensäcke werden frei zugänglich, so dass die manuelle Bestäubung durch Kontakt des Pollensackes mit der Narbe der Empfängerpflanze durchgeführt werden kann. Eine erfolgreiche Übertragung des Pollens wird mittels portabler Stereolupe kontrolliert. Durch umwickeln des Griffels mit Cellofanfolie für 24h wird ein

unbeabsichtigtes Entfernen des Pollens von der Narbe, so wie ungewollte Fremdbestäubung vermieden.

4.5. Proteinchemische Techniken

4.5.1. Protein Rohextrakt aus *A. thaliana*

Modifiziert nach der Methode von (Martínez-García, Monte et al., 1999). Die Konzentration von Bromphenolblau in Puffer Z wird um den Faktor 100 erhöht.

Reagenzien:

- Puffer E (125 mM Tris/ HCl pH 6,8, 10% SDS, 10% Glycerol (v/v), 20 mM DTT)
- Puffer Z (125 mM Tris/ HCl pH 6,8, 12% SDS, 10% (v/v) Glycerol, 22 % β -Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau)

50-100 mg FG Blattmaterial in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen in $N_{2liq.}$ mittels Rotor/Stator aufschließen, 200-300 μ l Puffer E zugeben, homogenisieren und auf Eis vorhalten. Nach Aufarbeitung aller Proben werden diese in RT überführt, um SDS wieder in Lösung zu bringen. Es folgt eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min bei RT. Den Überstand abnehmen, 1/10 Volumen Puffer Z zugeben und 3 min auf 95 °C erhitzen. Volumen bei Bedarf in der *SpeedVac* unter Vakuum reduzieren, bei 14.000 rpm 3 min zentrifugieren und den Überstand auf ein SDS-Gel laden.

4.5.2. Polyacrylamid Gelelektrophorese

Reagenzien:

- SDS (Natriumdodecylsulfat)
- β -Mercaptoethanol
- Acrylamid-Stammlösung (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 (Rotiphorese 30, #3029.1; Roth))
- 3x-Ladepuffer (175 mM Tris/HCl pH 6,6, 15% Glycerol, 5% SDS, 0,25% Bromphenolblau, 5% β -Mercaptoethanol (frisch zugeben))
- 10x-SDS-Laufpuffer (250 mM Tris pH 8,3, 1,9 M Glycin, 1% SDS)

Es wird eine diskontinuierliche Elektrophorese durchgeführt, bei der durch Verwendung eines weitporigen Sammelgels vor dem eigentlichen, engporigen Trenngel eine Fokussierung der Proteinbanden durch den pH-Sprung (6,8 \rightarrow 8,8) am Übergang der beiden Gele erreicht wird (Laemmli, 1970). Das Aufkochen der Proteinproben auf 95°C

vor dem Laden des Gels und die Anwesenheit von SDS im Ladepuffer ermöglicht die Teilentfaltung der Proteine. Protein-Eigenladungen werden maskiert (konstantes Masse/Ladungsverhältnis) und es erfolgt die Trennung im elektrischen Feld allein nach der Größe der Proteine.

Nach Zugabe des Radikalbildners APS und des Vernetzers TEMED (Serva, Deutschland) wird die Trenngellösung in die Biorad Mini-Protean II® Apparatur gegossen und mit 2 ml Isopropanol überschichtet, um eine gerade Front zu erhalten. Nach erfolgter Polymerisation wird der Alkohol entfernt, das Sammelgel eingegossen und die Kämme luftblasenfrei eingesetzt. Die polymerisierten Gele werden entweder sofort verwendet oder gegen Austrocknung geschützt bei 4°C bis zur Verwendung nach maximal 3 Tagen gelagert.

Die Sammel- und Trenngele setzen sich wie folgt zusammen:

Sammelgel 5 %	für 2 Gele	Trenngel 12,5 %	für 2 Gele
Acrylamid	2,6 ml	Acrylamid	16,8 ml
mQ	10,4 ml	mQ	15,2 ml
1 M Tris pH 6,6	1,9 ml	2 M Tris pH 8,8	7,5 ml
10 % (w/v) SDS	150 µl	10 % SDS	400 µl
10 % (w/v) APS	225 µl	10 % APS	400 µl
TEMED	7,5 µl	TEMED	13,3 µl
V _{ges}	15 ml	V _{ges}	40 ml

Abbildung 77: Mengenangaben für SDS-Gele in Mini-Protean II® -Kammern (BioRad, Deutschland). SDS (Natriumdodecylsulfat), APS (Ammoniumpersulfat), TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin).

Das Gel wird bei 130 Volt für ca. 1,5-2 h gefahren.

4.5.3. Western-Blotting

Reagenzien:

- 5x *Blotting*-Puffer (Glycin 57,6 g, Tris/HCl 12 g, in 1 l ddH₂O lösen)

Der Transfer der über die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose für die anschließende Immundekoration erfolgt bei einer Stromstärke von 170 mA ü/N bei 4°C im Tankblot-Verfahren. Dazu wird die Nitrozellulose 10 min in *Blotting*-Puffer äquilibriert und zusammen mit dem luftblasenfrei aufgelegten SDS-Gel in die Blotapparatur eingespannt.

4.5.4. Ponceau S Färbung

Reagenzien:

- Ponceau S Färbelösung (0,4% Ponceau S in 0,6% TCA)

Zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers von Protein auf Nitrozellulose im *Western-Blot* dient die Färbung mit Ponceau S, das reversibel an positiv geladene Seitenketten von Polypeptiden bindet. Die Inkubation der Membran erfolgt für ca. 10 min und der Hintergrund wird durch mehrmaliges Waschen mit ddH₂O entfärbt. Die fotografische Dokumentation erfolgt auf dem Leuchtschirm mittels Kamera. Für die anschließende Immunodetektion wird der Blot durch gründliches Waschen mit ddH₂O vollständig entfärbt.

4.5.5. Immunodetektion

Reagenzien:

- AP-Puffer (100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5)
- NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid-Stammlösung 5% (w/v) in 70% DMF)
- BCIP (5-Bromo-4-Chlor-3-Indoxylphosphat-Stammlösung 5% (w/v) in 100% DMF)
- TBS(-T) (*Tris-buffered Saline*, 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, (500 µl/l Tween))

Die Immunodetektion von auf Nitrozellulose immobilisierten Proteinen erfolgt mittels Alkalischer Phosphatase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist und das Gemisch aus NBT und BCIP zu tief blauem Präzipitat (Indigo/Diazoniumsalz) durch Phosphatabspaltung und gekoppelter Redoxreaktion umsetzt.

Der Blot wird zuerst in 1% BSA in TBS oder 3% Magermilchpulver in TBS abgedeckt für 1 h unter sanftem Schütteln geblockt. Nach 2 Waschschritten in TBS-T wird der primäre Antikörper (in 1% BSA + 0,02% NaN₃ in TBS-T) appliziert. Inkubation für 1 h unter sanftem Schütteln. Es folgen 5 Waschschritten à 5 min mit TBS-T worauf der sekundäre Antikörper (in 1% BSA + 0,02% NaN₃ in TBS-T) appliziert und der Blot ebenfalls für 1 h unter Schütteln inkubiert wird. 5 weitere Waschschritten à 5 min in TBS-T bereiten den Blot auf die Äquilibration mit AP-Puffer für 10 min unter Schütteln vor. Die Reaktionslösung bestehend aus 90 µl NBT und 45 µl BCIP in 15 ml AP-Puffer wird auf den Blot gegeben und dieser abgedunkelt für mindestens 10 min entwickelt. Die Färbereaktion wird durch mehrmaliges Waschen mit ddH₂O gestoppt.

4.5.6. Bradford

Durch die Bindung von Coomassie Brilliant Blau G250 an Proteine unter sauren pH-Bedingungen verschiebt sich die Absorption des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm und

erlaubt damit die Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung. Der Absorptionskoeffizient von Coomassie Brilliant Blau wurde mit Hilfe einer BSA-Konzentrationsreihe zu $0,058 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ermittelt. 5 μl Organellensuspension werden mit 200 μl Coomassie-Brillant Blau G 250 und 795 μl ddH₂O vermischt und in 3 Parallelproben bei 595 nm im HT-Soft 7000 Plus Bioassay Reader (Perkin-Elmer, USA) vermessen.

4.5.7. Markerenzym-Assays

4.5.7.1. Hydroxypyruvat-Reduktase

Die Hydroxypyruvat-Reduktase katalysiert den letzten Schritt innerhalb des Glycolat-Zyklus, die Reduktion von Hydroxypyruvat zu Glycerat unter Verbrauch eines NADH. Die Abnahme des NADH wird photometrisch bei 334 nm bestimmt.

Reagenzien:

- NADH (8 mM), frisch herstellen
- Hydroxypyruvat (2,3 mM), frisch herstellen
- K-Pi-Puffer (0,1 M), pH 6,0
- Triton-X-100 (0,5%)

Folgende Tabelle zeigt das Pipettierschema in einem Gesamtvolumen von 200 μl :

Reagenz	Volumen [μl]	Endkonzentration	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]
K-P _i -Puffer	20	0,01 M	30
Triton-X-100	5	0,0125%	RT
NADH	2,5	0,02 mM	0
Hydroxypyruvat	20	0,23 mM	0
ddH ₂ O	140	-	30
Probe	20	-	0

Abbildung 78: Pipettierschema des Hydroxypyruvat-Reduktase-Assays. K-Pi-Puffer, Kalium-Dihydrogenphosphat/Di-Kalium-Hydrogenphosphat im für den nötigen pH-Wert richtigen Mischungsverhältnis.

Nach obiger Tabelle werden die Reagenzien gemischt, wobei das Aliquot des Organellenpellets (s. Rohorganellen-Pellet aus *A. thaliana* mittels differentieller Zentrifugation) zum Start der Reaktion als Letztes zugegeben wird. Die Messung der NADH-Abnahme erfolgt für 10 min am Plattenreader bei 334 nm (Perkin-Elmer, USA). Zur

Berechnung der Enzymaktivität wird der Parameter „mean slope/min“, d.h. die mittlere Steigung der Kinetik pro Minute herangezogen.

4.5.7.2. *Serin-Glyoxylat-Aminotransferase*

Die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase katalysiert innerhalb der Peroxisomen die Transaminierung von Glyoxylat durch Serin als Aminodonor, wodurch Serin zu Hydroxypyruvat und Glyoxylat zu Glycin metabolisiert werden.

Reagenzien:

- HEPES (250 mM, pH 6,8)
- Serin (200 mM in 50 mM HEPES)
- Pyridoxalphosphat (100 mM in ddH₂O)
- Glyoxylat (5 mM in ddH₂O)
- K₃Fe(CN)₆ (4% w/v)
- HCl (100 mM) + 0,1% Phenylhydrazin
- H₂SO₄ (50%)

Oben beschriebene Reagenzien werden wie in folgender Tabelle dargestellt zum Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 1 ml pipettiert:

Reagenz	Volumen [µl]	Endkonzentration
HEPES pH 6,8	200	50 mM
Serin	100	20 mM
Pyridoxalphosphat [100 µM]	100	10 µM
Organellenpellet	400	-
Glyoxylat	200	1 mM

Abbildung 79: Reaktionsansatz des Serin-Glyoxylat-Aminotransferase-Assays. Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe des Glyoxylats.

Vom Reaktionsansatz werden nach 1, 2, 5 und 10 min Aliquots à 200 µl abgenommen und in 800 µl 100 mM HCl + 0,1% Phenylhydrazin überführt. Inkubation bei 80°C für 5 min, anschließend 10 min auf Eis. Es folgt eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 2 min (Protein und Zellwandreste präzipitieren). Ein 200 µl Aliquot des Überstands wird mit 750 µl 50% H₂SO₄ gemischt und die Zugabe von 50 µl 4% K₃Fe(CN)₆ markiert den

Reaktionsstart. Der Ansatz wird bei 10.000 rpm für 2 min zentrifugiert und die Absorption exakt 8 min nach Zugabe des $K_3Fe(CN)_6$ bei 520 nm vermessen.

Als Kontrollen dienen ein Ansatz ohne Aminodonor Serin zu Beginn des Versuchs, sowie ein Ansatz ohne $K_3Fe(CN)_6$.

4.6. Physiologische Experimente

4.6.1. Fluorometrie

Mittels des portablen Fluorometers PAM-2000 (*Pulse-Amplitude-Modifier*, Walz-Effeltrich, Deutschland) ist es möglich non-invasiv Photosynthese-Parameter auf Basis der Chlorophyll-Fluoreszenz zu bestimmen.

Die photochemische Umwandlung der Anregungsenergie (Excitation) erfolgt in den Reaktionszentren der beiden Photosysteme I und II. In den Anregungszustand gehobene Elektronen haben folgende Möglichkeiten ihre Anregungsenergie wieder abzugeben:

- Übertragung auf ein Plastoquinon in der Elektronen-Transportkette
- Rückfall in den Triplett-Zustand unter Abgabe von Phosphoreszenz
- Rückfall in den Ausgangszustand unter Abgabe von Fluoreszenz und Wärme.

Die abgegebene Fluoreszenz kann mittels PAM-2000 gemessen werden und gibt Aufschluß über die Effizienz des Photosystems II angeregte Elektronen photochemisch, also über den Plastoquinon-pool, umzuwandeln. Störungen dieses Prozesses äußern sich in erhöhter Fluoreszenz- und Wärmeabgabe, wie aus folgender Gleichung abzuleiten ist:

$$\text{Fluoreszenz} + \text{Photochemie} + \text{Energie Dissipation} = 1$$

Die photosynthetische Leistung (*photosynthetic yield*) ist definiert als:

$$Y = (F_m - F_t) / F_m$$

und stellt die wichtigste Meßgröße des PAM-2000 dar. F_m ist die maximale Fluoreszenzleistung eines lichtadaptierten Blattes und F_t die gemessene Fluoreszenz zum Zeitpunkt t .

4.6.2. Metabolomic

4.6.2.1. *Pobenaufarbeitung*

20 mg Pflanzenmaterial werden in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen N₂liq. schockgefroren, mittels Rotor/Stator pulverisiert und in 0,5 ml Metaboliten-Extraktionspuffer (Methanol/Chloroform/Wasser 2,5/1/0,5), der 10 µM ¹³C₆-Sorbitol (ISOTECH, USA) als internen Standard enthält, aufgenommen. Die Proben werden resuspendiert, bei 4°C für 8 min unter Schütteln extrahiert und bei 14.000 rpm für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wird mit 0,5 ml ddH₂O versetzt, 2 min bei 14.000 rpm zur Phasentrennung zentrifugiert und der polare Überstand ü/N bis zur vollständigen Trockene im Vakuum evaporiert.

4.6.2.2. *Chemische Derivatisierung*

Die eingegangenen Metabolitfraktionen werden mit 20 µl einer frisch angesetzten Methoxyaminhydrochloridlösung (40 mg/ml Pyridin) für 90 min bei 30°C unter heftigem Schütteln gelöst, mit 135 µl MSTFA (N-Methyl-N-Trifluoroacetamide, Macherey-Nagel) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die labilen Wasserstoffe polarer Metaboliten werden hierbei durch -Si(CH₃)₃ Gruppen ersetzt. Es entstehen flüchtige, thermostabile Derivate, die vor der Injektion in den Gaschromatographen bei 14.000g für 5 min zentrifugiert und anschließend mit 1 µl Retentionsindex-Markerlösung (n-Alkane C12-C26, je 2 µl/ml in Pyridin) sowie n-Fettsäuremethylester-Standardlösung (C8-C30, je 200 µg/ml in CHCl₃) versetzt werden.

4.6.2.3. *GC-TOF-Massenspektrometrie*

Die Metabolitanalyse erfolgt mit einem HP 6890 Gaschromatographen via Kaltaufgabe-System von Gerstel mit deaktivierten Standard-ALEX-Linern (GERSTEL GmbH & Co. KG), gekoppelt an ein Pegasus IV TOF Massenspektrometer. Durch die *split*-lose Injektion von 1 µl derivatisierter Probe in das Kaltaufgabe-System (60°C, 1 min isotherm, 30°C/min; 280°C, 3 min isotherm) wird eine nahezu diskriminierungsfreie Übertragung der Analyten auf die Säule garantiert. Zur chromatographischen Trennung kommt eine VF-5ms Kapillarsäule (30m lang, 0.25-mm ID, 25 µm Film) und eine 10m EZ-Guard Vorsäule (VARIAN, USA) bei konstantem Fluss von 2 ml/min Helium mit temperaturprogrammierter Verdampfung (80°C, 2 min isotherm; 80-360°C, 15°C/min; 360°C, 5 min isotherm) zum Einsatz. Vor jeder Injektion wird der Liner durch Injektion von 1 µl MSTFA gespült und nach ca. 80 Injektionen manuell gewechselt. Die Datenaquisition erfolgt Softwaregesteuert mittels ChromaTOF™ Software bei einer Scanrate von 20 s⁻¹ in einem

Massenbereich von m/z 71-600 nach Elektronenstoß-Ionisation bei 70 eV. Als Referenzgas für das (Auto)Tuning dient Trisperfluorbutylamin (FC43, PerkinElmer, USA). Zu Beginn und am Ende jedes Probensets wird ein *Quality-Control-Standardmix* (QC-Mix) injiziert. Alle zu einer Probencharge gehörenden Chromatogramme werden mit Hilfe der LECO®ChromaTOF™ Software und der Golmer Spektrenbibliothek [GMD@CSB.DB](#) abgeglichen, wobei die Berechnung des Retentionsindex mit Hilfe von n-Alkanen den genauen Retentionsabgleich mit der Bibliothek erlaubt. Die annotierten *Peaks* werden daraufhin in einem Referenz-Chromatogramm markiert, welches anschließend gegen alle Chromatogramme abgeglichen wird. Für die akkurate relative Quantifizierung der Metaboliten wird jede Fläche mittels Isotopen-markiertem, internem Standard und Bezug auf das Frischgewicht normalisiert. Die von LECO®ChromaTOF™ erzeugten Daten werden mit Hilfe der Software *GC-GC-MS Data Matrix Creator* exportiert und als Matrix zur statistischen Auswertung abgelegt.

4.6.2.4. Metabolitprofil mittels Hauptkomponenten- und Varianzanalyse

Die aus der Metabolitanalyse resultierenden hochdimensionalen Datensätze werden mittels Hauptkomponentenanalyse (*PCA, Principal Component Analysis*) dimensionsreduziert. Nach vorangegangener Transformation ($x = (\text{Wert} - \text{MW}) / \text{Stabw}$) in TIGR MeV, welche auf der Kovarianzmatrix des implementierten PCA-Scriptes basiert, werden mehrdimensionale Merkmale in einen Vektorraum mit einer geringeren Zahl aussagekräftiger Linearkombinationen (den sog. Hauptkomponenten) transformiert. Dadurch wird die Anzahl an Variablen minimiert, d.h. dimensionsreduziert. Eine zweidimensionale Darstellung des Datensatzes wird dadurch ermöglicht.

Die Varianzanalyse der Datensätze erfolgte über T-Test oder ANOVA (*Analysis of Variance*), abhängig von der Anzahl zu vergleichender Datensätze.

Der *Welch T-Test* dient als Signifikanztest zwischen zweier Datensätze unterschiedlicher Varianz. Die zur Verwerfung der Nullhypothese, dass sich die n untersuchten Stichproben nicht unterscheiden, angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeiten p sind den einzelnen Abbildungen zu entnehmen.

Der *Fisher-Verteilungstest* der ANOVA prüft die Signifikanz zwischen mehr als zwei Datensätzen unterschiedlicher Varianz.

Für die Darstellung der Varianz wurde eine farbcodierte Cluster-Analyse relativer Änderungen der Metabolitkonzentrationen verwendet. Diese Cluster-Analyse basiert auf dem in TIGR MeV implementierten Algorithmus zur Transformation der Einzelwerte ($x = (\text{Wert} - \text{Mittelwert}) / \text{Stabw}$) und den Distanzfunktionen K-mean-Algorithmus und Euklidische Distanz zur Bestimmung der Ähnlichkeit von Metabolitgruppen.

4.6.3. IBA Wurzelwachstums-Assay

Die Vorgehensweise erfolgt wie in (Zolman, Yoder et al., 2000) beschrieben. *A. thaliana*-Samen werden auf MS-Agar zur Keimung gebracht und nach 5 Tagen auf MS-Agar transferiert, dem Indol-Buttersäure (IBA) in einer Konzentration von 10 μM in DMSO zugesetzt wurde. Die Wurzellängen wurden nach weiteren 2 Tagen Wachstum bestimmt. Als Kontrolle dienen MS-Agar-Platten mit DMSO.

4.6.4. Glyoxylat-Bestimmung in Blattextrakten

Die Glyoxylatmenge in Blattextrakten wird auf der Methode von Decker und Maitra (1962) basierend durchgeführt (Schneiderei, Häusler et al., 2006). Blattmaterial bestimmten Frischgewichts (max. 1 g) wird in 1 ml 100 mM HCl, 0.1% Phenylhydrazin mittels Mörser und Pistill aufgearbeitet, bei 80°C für 5 min inkubiert, für 10 min auf Eis gekühlt und bei 10.000g für 2 min zentrifugiert, um Protein und Zellwandreste zu pelletieren. Ein Aliquot (200 μl) des Überstands wird mit 750 μl 50% HCl gemischt und die Farbentwicklung, aufgrund der Reduktion des $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, wird durch die Zugabe von 50 μl 4% (w/v) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ gestartet. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 10.000g für 2 min. Exakt 8 min nach Zugabe des $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ wird die Absorption bei 520 nm photometrisch bestimmt. Als Kontrolle wird in einem Ansatz $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ weggelassen. Mittels Glyoxylat wird eine Standardkurve erstellt ($\epsilon_{520}=31.7\text{cm}^2\mu\text{mol}^{-1}$), anhand derer die Glyoxylatmenge im Blattextrakt bestimmt wird.

4.6.5. Rohorganellen-Pellet aus *A. thaliana* mittels differentieller Zentrifugation

Reagenzien:

- Homogenisationspuffer (50 mM HEPES, 250 mM Saccharose, 10 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM Na_2EDTA , 10 mM DTT, pH 7,5).

Geräte:

- Beckmann Zentrifuge, Rotor JA25.50.

Rosettenblätter ernten, FG bestimmen (1-10 g) und mit Pistill durch ein Sieb in eine Mörserschale reiben, in die zuvor 10 ml Homogenisationspuffer gegeben werden. Siebinhalt mit weiteren 5 ml Homogenisationspuffer in die Schale spülen. Homogenat durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem, USA) mittels Trichter in Zentrifugengefäße gießen und wieder mit 5 ml Homogenisationspuffer nachspülen. 1. Zentrifugation: 1.500 rpm (270g), 10 min um Zellwandreste zu pelletieren. Der Überstand wird in frische Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgt eine zweite Zentrifugation bei 9.500 rpm (10.750g)

für 15 min, um die Organellen zu pelletieren. Der Überstand wird als Kontrolle für die folgenden Enzymassays aufgehoben. Das Organellenpellet kann in $N_{2liq.}$ schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt vermessen werden.

Sämtliche Arbeitsschritte werden im Kühlraum bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

4.7. Mikroskopische Techniken

4.7.1. Licht-Mikroskopie

Für die DAB-Färbung der 4 unabhängigen PEX10- Δ Zn-Linien werden mittels Diamantmesser 500 nm dünne Blatt-Sektionen geschnitten, auf gläserne Objektträger transferiert und in Epoxydharz eingebettet.

Zur Bestimmung der Embryoletalität in unreifen Schoten der PEX10-TILLING-Linien werden selbige unter dem Binokular auf doppelseitigem Klebeband längs befestigt und mittels Skalpell entlang der Bauchnaht aufpräpariert. Nach Segregationsanalyse werden die Samen auf einen Objektträger in einige Tropfen Hoyers` Klärungsmedium überführt und nach Verschluss mit einem Deckglas für ca. 10-15 min inkubiert. Die Auflösung der Zellwände ist nun so weit fortgeschritten, dass die Embryonen und ihr Entwicklungsstadium einwandfrei unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung 20x) bestimmt werden können.

4.7.2. Confocale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Für die Aufnahmen am Confocalen Laserscanning-Mikroskop (Fluoview FV 1000, Olympus, Japan) werden folgende Objektive verwendet:

- 10er: UPLFLN 10x/0,3 Arbeitsabstand: 10 mm
- 20er: UPFLN 20x/0,5 Arbeitsabstand: 2,1 mm
- 40er: PLABPO 40x/0,8 Arbeitsabstand: 0,16 mm (Wasser)

Die Anregung des GFP erfolgt mittels 488 nm-Argonlaser (6% Laserstärke und eine Lichtintensität zwischen 390 und 530 hv), 2x Signalverstärkung und Rauschunterdrückung von 20. Die Scanrichtung ist unidirektional. Die Durchlichtstärke wird an die Blattdicke angepasst.

Die Emissionsfilter für GFP-Signal (EGFP) und Eigenfluoreszenz der Chloroplasten (cy 3,5) werden auf 500-530 nm und 610-710 nm gesetzt, um eine saubere Signaltrennung zu erhalten.

15 Tage alte, auf MS-Medium angezogene Keimlinge werden mit einer Präparationsschere in Wurzel, Hypokotyl, Kotyledonen, Primärblätter und Sekundärblätter zerlegt. Die Pflanzenteile werden sofort in 200 μ l MS-Medium zwischen Objektträger und

Deckglas gelegt. Vor der Bildaquisition wird unter Durchlicht ein geeigneter Ausschnitt ausgewählt. *Timelaps*-Aufnahmen umfassen i.d.R. 50 Einzelbilder.

4.7.3. Elektronen-Mikroskopie

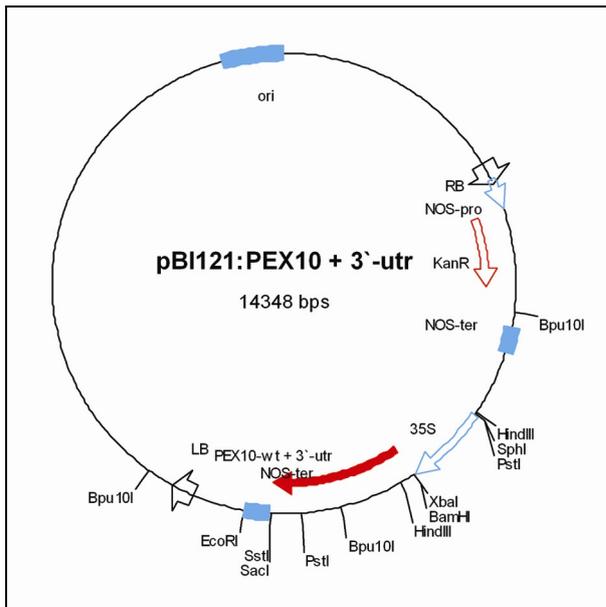
Unter dem Binokular zerkleinerte Blattstücke von 12 Tage alten *A. thaliana* (Kantenlänge ~1 mm) werden in 2,5% Glutaraldehyd in 75 mM Natriumcacodylat/ 2 mM MgCl₂ (pH 7,0) für 1 h bei 25°C fixiert, mehrmals mit Fixativpuffer gespült und für 2 h mit 1% Osmiumtetroxid in Fixativpuffer bei 25°C nachfixiert.

Nach zwei Waschschritten mit ddH₂O werden die Gewebestücke *en bloc* mit 1% Uranylacetat in 20% Aceton für 30 min gefärbt. Die Entwässerung und Einbettung wird in Spurrs` niedrigviskosem Harz durchgeführt. Ultradünnschnitte von 50–70 nm werden mittels Diamantmesser geschnitten und auf unbeschichtete Kupfer-Gitter aufgebracht. Die Schnitte werden in 100 mM Bleicitrat (pH 13) nachgefärbt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen werden an einem EM 912 Elektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Germany), das mit einem integrierten OMEGA Energiefilter ausgestattet ist, im *zero-loss* Modus durchgeführt. Die spezifische Lokalisierung von Katalase erfolgt wie in Wanner et al. (1982) beschrieben.

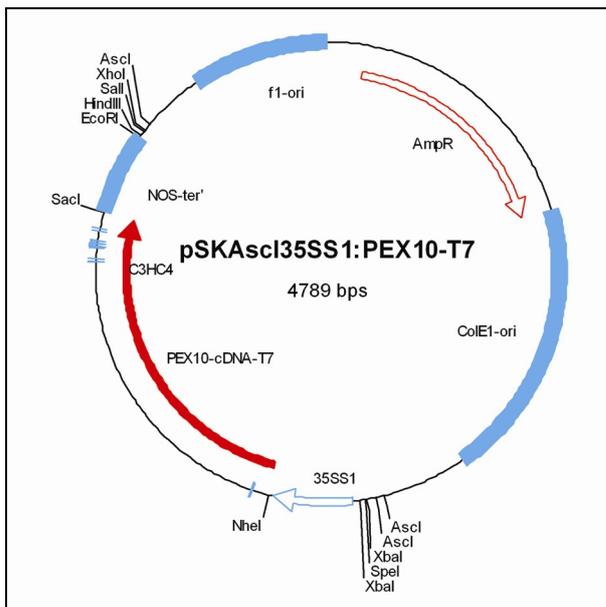
4.8. Klonierungsstrategien

4.8.1. *PEX10-T7*

Die PCR des T7-Taggings wurde auf dem Plasmid pBI121:PEX10 + 3'-utr (Schumann, 2003) unter Verwendung von AtPEX10-T7-se1 (ATATGCTAGCATGGCTTCTATGACTGGAGGACAACAATGGGA(GGATCT)₃ATGAGGCTTAATGGGGATTTCG) und AtPEX10-T7-se2 (ATATGCTAGCATGGCTTCTATG) zusammen mit At-PEX10-T7-as (AGAGCTCCTAAAAATCAGAATGATACAAAC) in äquimolarem Verhältnis durchgeführt.

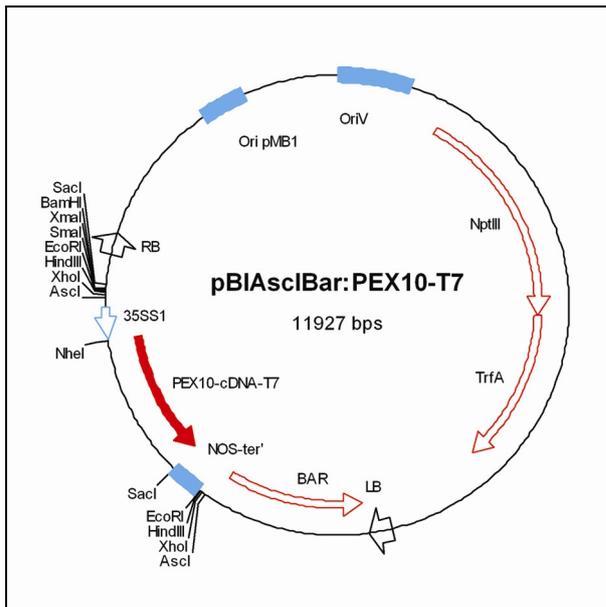


Der T7-tag wurde aus sterischen Gründen N-terminal angehängt, um die Funktion des am C-Terminus befindlichen, cytosolisch orientierten Zink RING-Fingers nicht zu beeinträchtigen und ist kursiv dargestellt, der 3x-Gly-Ser Linker GGATCT ist in Klammern geschrieben.



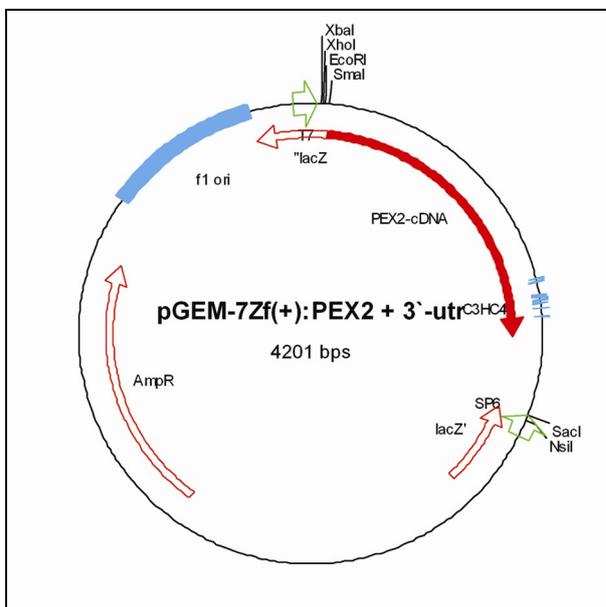
Die weitere Subklonierung findet über *NheI* und *SacI* (unterstrichen) in pSKAscI35SS1GFP (Hoffmann, 2002) statt, um 35SS1-Promotor- und NOS-Terminator-Sequenzen zu erhalten.

Die T7-getaggten cDNAs werden via *Ascl* (*Sgsl*) in pBIAscIBar (Kan^R , Thomas Hoffman) kloniert und in *A. tumefaciens* (Stamm C58 pGV3101 (Van Larebeke, Engler et al., 1974) mit Ti-Plasmid pMP90 (Rif^R , Gent^R , (Koncz and Schell, 1986) (Ferrando, Farràs et al., 2000)) elektrotransformiert.



4.8.2. PEX2-T7

Die PEX2 cDNA (AY064063, RAFL09-26-B11 Riken, die Annotation des Genlokus lautet AT1G79810.2 (TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* – www.arabidopsis.org)) wird mittels At-PEX2-pBI-sense (ATCCCCGGG ATGACGCCGTCTACGCCTGCAGACG) und AtPEX2-pBI-antisense (TTGAGCTC TTCATTCAACAATGGTAGGTTCTCAAC) via *SmaI/SacI* (unterstrichen) in pGEM®-7Zf+ (Promega) kloniert.

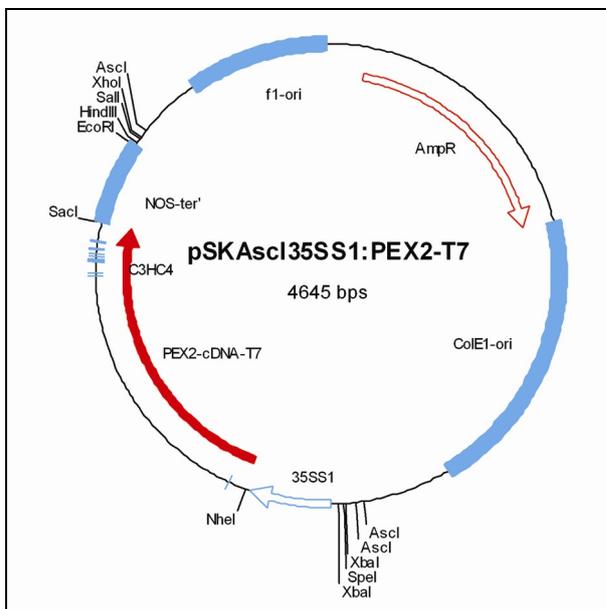


Die *site*-gerichtete Mutagenese des Zink RING-Fingers erfolgt durch *Splicing by Overlap Extension* PCR (Horton, Hunt et al., 1989) analog zu *PEX10* unter Verwendung von At- Δ Zn2-sense (GGTCAGGCTCAGGTACGGTTACTACGGCATAAGGACCCGCTGCGC) und At- Δ Zn2-antisense

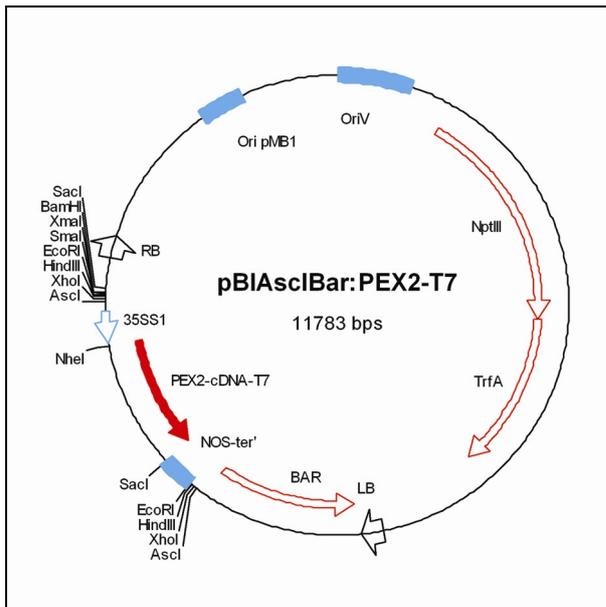
(GCCGTAGTAACCGTACCTGAGCTGACCAGGCAGAGCTATAAACGG),

Punktmutationen in Fettdruck, *Bpu*10I-Restriktionsschnittstelle (unterstrichen), um Wildtyp- und Δ Zn-cDNA-Versionen zu unterscheiden. Das N-terminale T7-Tagging erfolgt durch PCR unter Verwendung der Primer At-PEX2-T7-se1 (ATAGCTAGCATGGCTTCTATGACTGGAGGACAACAAATGGGA(GGATCT)₃ATGACGCCGTCTACGCCTGC) und At-PEX2-T7-se2 (ATAGCTAGCATGGCTTCTATG) mit At-PEX2-as (AGAGCTCTCATTGCCACTTGAAACACC) in äquimolarem Verhältnis (T7-tag kursiv, 3x-Gly-Ser Linker (GGATCT) zwischen tag und Startcodon des Peroxins in Klammern).

Die weitere Subklonierung findet analog PEX10 (s.o.) über *Nhe*I und *Sac*I (unterstrichen) in pSKAscl35SS1GFP (Thomas Hoffman) statt, um 35SS1-Promotor- und NOS-Terminator-Sequenzen zu erhalten.



Die T7-getaggten cDNAs werden via *Ascl* (*Sgs*I) in pBIAsclBar (Kan^R , Thomas Hoffman) kloniert und in *A. tumefaciens* (Stamm C58 pGV3101 (Van Larebeke, Engler et al., 1974) mit Ti-Plasmid pMP90 (Rif^R , Gent^R , (Koncz and Schell, 1986), (Ferrando, Farràs et al., 2000)) elektrotransformiert.

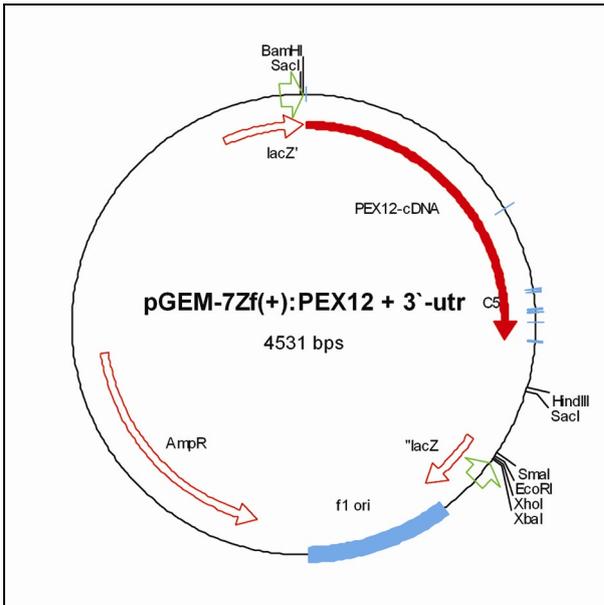


4.8.3. PEX12-T7

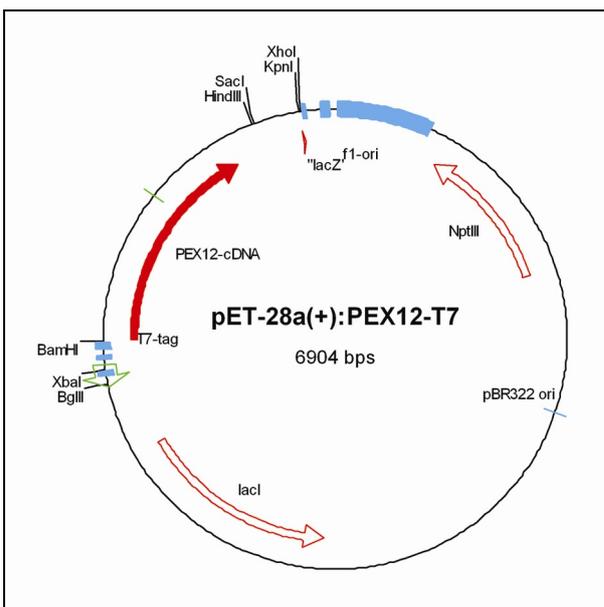
Die *PEX12* Wildtyp-cDNA ist über INRA (*Institut National de la Recherche Agronomique*, Toulouse) unter der Zugangsnummer *BX824646* erhältlich und die Annotation des Genlokus lautet *AT3G04460.1* (*TAIR* (The *Arabidopsis* Information Resource – www.arabidopsis.org)).

Dem cDNA-Klon *BX824646* (INRA) fehlt ein Adenin nach Cytosin 746 bp nach dem Start-Codon, was zu einer nur 792 Nukleotide kurzen Teillängen-cDNA führt, die durch ein 359 bp langes *PfoI/NcoI*-Fragment des cDNA-Klons *AK117651* (Riken) repariert wird.

Die resultierende Vollängen-cDNA wird unter Verwendung der Primer At-*PEX12*-pBI-sense AAGGATCCATGTTGTTTCAGGTGGGAGGTG und At-*PEX12*-pBI-antisense CACCCGGGATAAATTTGATCAGTATATAAATTTT via *Bam*HI/*Sma*I (unterstrichen) in pGEM®-7Zf+ (Promega) kloniert.

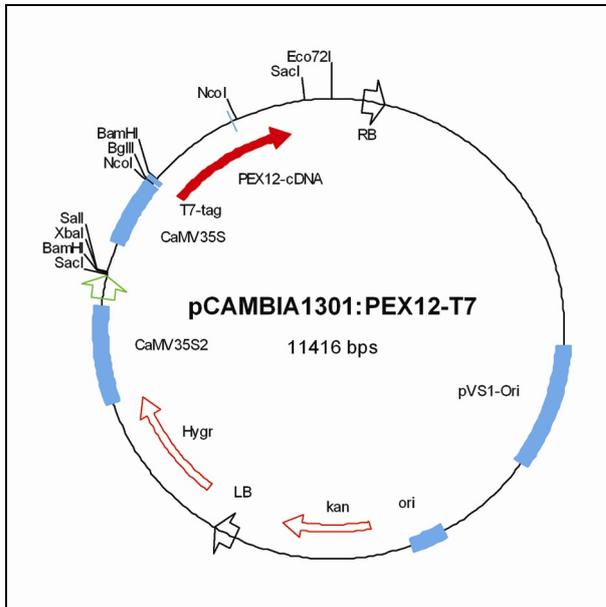


Die *site*-gerichtete Mutagenese des Zink RING-Fingers geschieht analog zu *PEX2* mittels *At-dZn12-se-Kpn2I* (GGATTTGTTTT**CGGCTATTCGGAGT** ATTAAGTATGTTTCAAAGTACAAGCG) und *At-dZn12-as-Kpn2I* (ATACTTAAATACT**CCGGA**ATAGCCGAAAACAAATCCAGAGACAGTGAC), (Punktmutationen in Fettdruck, *Kpn2I* Restriktions-Site, um Wildtyp- und Δ Zn-cDNA-Versionen unterscheiden zu können (unterstrichen)) zusammen mit *At-PEX12-pBI-sense* (AAGGATCCATGTTGTTTCAGGTGGGAGGTG) und *At-PEX12-pBI-antisense* (CACCCGGGATAAATTTGATCAGTATATAAATTTT), (*Bam*HI- and *Sma*I-site unterstrichen). Das N-terminale T7-Tagging wird durch Subklonierung in pET28a(+) (Novagen, Kan^R) via *Bam*HI/ *Xho*I erreicht.



Mangels geeigneter Schnittstellen werden die cDNAs durch *At-PEX12-Bg*III (TTTAGATCTAATGGCTAGCATGACTGGT) und *At-PEX12-Eco*72I

(TTTCACGTGCCGGGATAAATTTGATCA) PCR-amplifiziert (*Bgl*II- und *Eco*72I-Restriktions-Sites unterstrichen) und in den binären Vektor pCAMBIA1301 (Kan^R , Hyg^R , Cambia) kloniert.



Die Transformation in *A. tumefaciens* verläuft wie für *PEX2*.

5. Anhang

5.1. DNA-Konstrukte und Glycerin-Stammkulturen

In folgender Tabelle sind die in dieser Arbeit erzeugten DNA-Konstrukte aufgelistet. Sie sind als Glycerin-Stammkulturen im *E. coli*-Stamm DH5 α bei -80°C gelagert.

Konstrukt	Glycerin-Stammkultur
pGEM7: <i>PEX10</i> - Δ Zn-T7	DH5 α , EC
pSKAscl35S: <i>PEX10</i> - Δ Zn-T7	DH5 α , EC
pSKAscl35S: <i>PEX10</i> -Wt-T7	DH5 α , EC
pBIAsclBar: <i>PEX10</i> - Δ Zn-T7	DH5 α , EC
pBIAsclBar: <i>PEX10</i> -Wt-T7	DH5 α , EC
λ FLC-1-G: <i>PEX2</i>	DH5 α , EC
pGEM7: <i>PEX2</i> -Wt	DH5 α , EC
pGEM7: <i>PEX2</i> - Δ Zn	DH5 α , EC
pSKAscl35S: <i>PEX2</i> - Δ Zn-T7	DH5 α , EC
pSKAscl35S: <i>PEX2</i> -Wt-T7	DH5 α , EC
pBIAsclBar: <i>PEX2</i> - Δ Zn-T7	DH5 α , EC
pBIAsclBar: <i>PEX2</i> -Wt-T7	DH5 α , EC
pCMV-Sport6: <i>PEX12</i>	DH5 α , EC
λ FLC-1-G: <i>PEX12</i>	DH5 α , EC
pGEM7: <i>PEX12</i> - Δ Zn	DH5 α , EC
pGEM7: <i>PEX12</i> -Wt	DH5 α , EC
pET28a: <i>PEX12</i> - Δ Zn-T7	DH5 α , EC
pET28a: <i>PEX12</i> -Wt-T7	DH5 α , EC
pCambia1301: <i>PEX12</i> - Δ Zn-T7	DH5 α , EC
pCambia1301: <i>PEX12</i> -Wt-T7	DH5 α , EC

6. Literaturverzeichnis

- Adhikari, A. and Chen, Z. J. (2009). "Diversity of Polyubiquitin Chains." Developmental Cell **16**(4): 485-486.
- Agne, B., Meindl, N. M., Niederhoff, K., Einwächter, H., Rehling, P., Sickmann, A., Meyer, H. E., Girzalsky, W. and Kunau, W.-H. (2003). "Pex8p: An Intraperoxisomal Organizer of the Peroxisomal Import Machinery." Molecular Cell **11**(3): 635-646.
- Antonenkov, V. D., Sormunen, R. T. and Hiltunen, J. K. (2004). "The rat liver peroxisomal membrane forms a permeability barrier for cofactors but not for small metabolites in vitro." J Cell Sci **117**(Pt 23): 5633-42.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004). "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction." Annual Review of Plant Biology **55**(1): 373-399.
- Asada, K. (1999). "The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **50**(1): 601-639.
- Asada, K. (2006). "Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions." Plant Physiol. **141**(2): 391-396.
- Asada, K., Kiso, K. and Yoshikawa, K. (1974). "Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination." J Biol Chem **249**: 2175-2181.
- Bachmair, A., Novatchkova, M., Potuschak, T. and Eisenhaber, F. (2001). "Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification." Trends Plant Sci **6**(10): 463-70.
- Baker, A. and Sparkes, I. A. (2005). "Peroxisome protein import: some answers, more questions." Current Opinion in Plant Biology **8**(6): 640-647.
- Barlow, P. N., Luisi, B., Milner, A., Elliott, M. and Everett, R. (1994). "Structure of the C3HC4 domain by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc-finger." J Mol Biol **237**(2): 201-11.
- Beevers, H. (1979). "Microbodies in Higher Plants." Annual Review of Plant Physiology **30**(1): 159-193.
- Boldt, R., Edner, C., Kolukisaoglu, U., Hagemann, M., Weckwerth, W., Wienkoop, S., Morgenthal, K. and Bauwe, H. (2005). "D-Glycerate 3-kinase, the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in Arabidopsis, belongs to a novel kinase family." Plant Cell **17**(8): 2413-20.
- Bonekamp, N. A., Völkl, A., Fahimi, H. D. and Schrader, M. (2009). "Reactive oxygen species and peroxisomes: Struggling for balance." BioFactors **9999**(9999): NA.
- Borden, K. L. (2000). "RING domains: master builders of molecular scaffolds?" J Mol Biol **295**(5): 1103-12.
- Breidenbach, R. W., Kahn, A. and Beevers, H. (1968). "Characterization of Glyoxysomes From Castor Bean Endosperm." Plant Physiol **43**(5): 705-713.
- Brooks, A. and Farquhar, G. D. (1985). "Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light." Planta **165**(3): 397-406.
- Brown, L.-A. and Baker, A. (2008). "Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix (Review)." Molecular Membrane Biology **25**(5): 363 - 375.
- Campbell, W. J. and Ogren, W. L. (1990). "Glyoxylate inhibition of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation in intact, lysed, and reconstituted chloroplasts." Photosynthesis Research **23**(3): 257-268.
- Carvalho, A. F., Grou, C. P., Pinto, M. P., Alencastre, I. S., Costa-Rodrigues, J., Fransen, M., Sa-Miranda, C. and Azevedo, J. E. (2007). "Functional characterization of two missense mutations in Pex5p - C11S and N526K." Biochim Biophys Acta **1773**(7): 1141-8.

- Carvalho, A. F., Pinto, M. P., Grou, C. P., Alencastre, I. S., Fransen, M., Sa-Miranda, C. and Azevedo, J. E. (2007). "Ubiquitination of mammalian Pex5p, the peroxisomal import receptor." J Biol Chem **282**(43): 31267-72.
- Chang, C. C., Warren, D. S., Sacksteder, K. A. and Gould, S. J. (1999). "PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import." J Cell Biol **147**(4): 761-74.
- Chow, W. S., Lee, H.-Y., Park, Y.-I., Park, Y.-M., Hong, Y.-N. and Anderson, J. M. (2002). "The Role of Inactive Photosystem-II-Mediated Quenching in a Last-Ditch Community Defence against High Light Stress in vivo." Philosophical Transactions: Biological Sciences **357**(1426): 1441-1450.
- Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998). "Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana." The Plant Journal **16**(6): 735-743.
- Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998). "Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana." Plant J **16**(6): 735-43.
- Collins, C. S., Kalish, J. E., Morrell, J. C., McCaffery, J. M. and Gould, S. J. (2000). "The peroxisome biogenesis factors pex4p, pex22p, pex1p, and pex6p act in the terminal steps of peroxisomal matrix protein import." Mol Cell Biol **20**(20): 7516-26.
- Cook, C. M., Spellman, M., Tolbert, N. E., Stringer, C. D. and Hartman, F. C. (1985). "Characterization of an active-site peptide modified by glyoxylate and pyridoxal phosphate from spinach ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase." Archives of Biochemistry and Biophysics **240**(1): 402-412.
- Cooper, T. G. and Beevers, H. (1969). "Beta oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm." J Biol Chem **244**(13): 3514-20.
- Cooper, T. G. and Beevers, H. (1969). "Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity." J Biol Chem **244**(13): 3507-13.
- Cox, P. M., Betts, R. A., Jones, C. D., Spall, S. A. and Totterdell, I. J. (2000). "Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model." Nature **408**(6809): 184-187.
- Dalla Serra, M. and Menestrina, G. (2003). "Liposomes in the study of pore-forming toxins." Methods Enzymol **372**: 99-124.
- Dammai, V. and Subramani, S. (2001). "The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol." Cell **105**(2): 187-96.
- Day, D. A. and Wiskich, J. T. (1980). "Glycine transport by pea leaf mitochondria." FEBS Letters **112**(2): 191-194.
- De Bellis, L. and Nishimura, M. (1991). "Development of Enzymes of the Glyoxylate Cycle during Senescence of Pumpkin Cotyledons." Plant Cell Physiol. **32**(4): 555-561.
- de Bellis, L., Tsugeki, R. and Nishimura, M. (1991). "Glyoxylate Cycle Enzymes in Peroxisomes Isolated from Petals of Pumpkin (Cucurbita sp.) during Senescence." Plant Cell Physiol. **32**(8): 1227-1235.
- De Duve, C. and Baudhuin, P. (1966). "Peroxisomes (microbodies and related particles)." Physiol Rev **46**(2): 323-57.
- Distel, B. (1996). "A Unified Nomenclature for Peroxisome Biogenesis Factors." The Journal of Cell Biology **135**(1): 1-3.
- Dotz, G. and Gould, S. J. (1996). "Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor." J Cell Biol **135**(6 Pt 2): 1763-74.
- Eastmond, P. J., Germain, V., Lange, P. R., Bryce, J. H., Smith, S. M. and Graham, I. A. (2000). "Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5669-74.
- Eckert, J. H. and Erdmann, R. (2003). "Peroxisome biogenesis." Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology **147**(1): 75-121.

- Eckert, J. H. and Johnsson, N. (2003). "Pex10p links the ubiquitin conjugating enzyme Pex4p to the protein import machinery of the peroxisome." J Cell Sci **116**(Pt 17): 3623-34.
- Elgersma, Y., Kwast, L., van den Berg, M., Snyder, W. B., Distel, B., Subramani, S. and Tabak, H. F. (1997). "Overexpression of Pex15p, a phosphorylated peroxisomal integral membrane protein required for peroxisome assembly in *S.cerevisiae*, causes proliferation of the endoplasmic reticulum membrane." Embo J **16**(24): 7326-41.
- Emanuelsson, O., Elofsson, A., von Heijne, G. and Cristobal, S. (2003). "In silico prediction of the peroxisomal proteome in fungi, plants and animals." J Mol Biol **330**(2): 443-56.
- Fagarasanu, A., Fagarasanu, M. and Rachubinski, R. A. (2007). "Maintaining peroxisome populations: a story of division and inheritance." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 321-44.
- Fan, J., Quan, S., Orth, T., Awai, C., Chory, J. and Hu, J. (2005). "The Arabidopsis PEX12 gene is required for peroxisome biogenesis and is essential for development." Plant Physiol **139**(1): 231-9.
- Ferrando, A., Farràs, R., Jásik, J., Schell, J. and Koncz, C. (2000). "Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in Agrobacterium-transformed plant cells." The Plant Journal **22**(6): 553-560.
- Flügge, U. I., Freisl, M. and Heldt, H. W. (1980). "The mechanism of the control of carbon fixation by the pH in the chloroplast stroma." Planta **149**(1): 48-51.
- Flynn, C. R., Heinze, M., Schumann, U., Gietl, C. and Trelease, R. N. (2005). "Compartmentalization of the plant peroxin, AtPex10p, within subdomain(s) of ER." Plant Science **168**(3): 635-652.
- Frederick, S. E. and Newcomb, E. H. (1969). "Microbody-Like Organelles in Leaf Cells." Science **163**(3873): 1353-1355.
- Freemont, P. S., Hanson, I. M. and Trowsdale, J. (1991). "A novel cysteine-rich sequence motif." Cell **64**(3): 483-4.
- Galan, J. M. and Haguenaer-Tsapis, R. (1997). "Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein." Embo J **16**(19): 5847-54.
- Gamas, P., Niebel Fde, C., Lescure, N. and Cullimore, J. (1996). "Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development." Mol Plant Microbe Interact **9**(4): 233-42.
- Gandre-Babbe, S. and van der Blik, A. M. (2008). "The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells." Mol Biol Cell **19**(6): 2402-12.
- Gatto, G. J., Jr., Geisbrecht, B. V., Gould, S. J. and Berg, J. M. (2000). "Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5." Nat Struct Biol **7**(12): 1091-5.
- Ghaedi, K., Honsho, M., Shimosawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N. and Fujiki, Y. (2000). "PEX3 is the causal gene responsible for peroxisome membrane assembly-defective Zellweger syndrome of complementation group G." Am J Hum Genet **67**(4): 976-81.
- Ghaedi, K., Tamura, S., Okumoto, K., Matsuzono, Y. and Fujiki, Y. (2000). "The peroxin pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis." Mol Biol Cell **11**(6): 2085-102.
- Gietl, C. (1990). "Glyoxysomal malate dehydrogenase from watermelon is synthesized with an amino-terminal transit peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5773-7.
- Gietl, C. (1992). "Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles." Biochim Biophys Acta **1100**(3): 217-34.
- Gietl, C., Faber, K. N., van der Klei, I. J. and Veenhuis, M. (1994). "Mutational analysis of the N-terminal topogenic signal of watermelon glyoxysomal malate dehydrogenase

- using the heterologous host *Hansenula polymorpha*." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3151-5.
- Gietl, C., Lehnerer, M. and Olsen, O. (1990). "Mitochondrial malate dehydrogenase from watermelon: sequence of cDNA clones and primary structure of the higher-plant precursor protein." Plant Molecular Biology **14**(6): 1019-1030.
- Glover, J. R., Andrews, D. W. and Rachubinski, R. A. (1994). "Saccharomyces cerevisiae peroxisomal thiolase is imported as a dimer." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10541-5.
- Gouaux, E. (1997). "Channel-forming toxins: tales of transformation." Curr Opin Struct Biol **7**(4): 566-73.
- Gouveia, A. M., Reguenga, C., Oliveira, M. E., Sa-Miranda, C. and Azevedo, J. E. (2000). "Characterization of peroxisomal Pex5p from rat liver. Pex5p in the Pex5p-Pex14p membrane complex is a transmembrane protein." J Biol Chem **275**(42): 32444-51.
- Grou, C. P., Carvalho, A. F., Pinto, M. P., Wiese, S., Piechura, H., Meyer, H. E., Warscheid, B., Sa-Miranda, C. and Azevedo, J. E. (2008). "Members of the E2D (UbcH5) family mediate the ubiquitination of the conserved cysteine of Pex5p, the peroxisomal import receptor." J Biol Chem **283**(21): 14190-7.
- Grubb, C. D. and Abel, S. (2006). "Glucosinolate metabolism and its control." Trends Plant Sci **11**(2): 89-100.
- Halkier, B. A. and Gershenzon, J. (2006). "Biology and biochemistry of glucosinolates." Annu Rev Plant Biol **57**: 303-33.
- Halliwell, B. (2006). "Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life." Plant Physiol **141**(2): 312-322.
- Hattori, M. and Sakaki, Y. (1986). "Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates." Anal Biochem **152**(2): 232-8.
- Häusler, R. E., Bailey, K. J., Lea, P. J. and Leegood, R. C. (1996). "Control of photosynthesis in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase and glutamate synthase." Planta **200**(4): 388-396.
- Hawkins, J. and Boden, M. (2006). "Detecting and sorting targeting peptides with neural networks and support vector machines." J Bioinform Comput Biol **4**(1): 1-18.
- Hayashi, M., Nito, K., Toriyama-Kato, K., Kondo, M., Yamaya, T. and Nishimura, M. (2000). "AtPex14p maintains peroxisomal functions by determining protein targeting to three kinds of plant peroxisomes." Embo J **19**(21): 5701-10.
- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., Kato, A., Mano, S., De Bellis, L., Hayashi-Ishimaru, Y., Yamaguchi, K., Hayashi, H. and Nishimura, M. (2000). "Functional transformation of plant peroxisomes." Cell Biochem Biophys **32** Spring: 295-304.
- Hayashi, M., Yagi, M., Nito, K., Kamada, T. and Nishimura, M. (2005). "Differential contribution of two peroxisomal protein receptors to the maintenance of peroxisomal functions in Arabidopsis." J Biol Chem **280**(15): 14829-35.
- Hazra, P. P., Suriapranata, I., Snyder, W. B. and Subramani, S. (2002). "Peroxisome remnants in pex3delta cells and the requirement of Pex3p for interactions between the peroxisomal docking and translocation subcomplexes." Traffic **3**(8): 560-74.
- Helm, M. (2006). Proteasen in pflanzlichen Organellen: Funktionelle Charakterisierung und Strukturanalyse der Cystein-Endopeptidase in Ricinosomen und Reinigung einer Processing Peptidase aus Glyoxysomen. Lehrstuhl für Botanik, Technische Universität München.
- Helm, M., Lück, C., Prestele, J., Hierl, G., Huesgen, P. F., Frohlich, T., Arnold, G. J., Adamska, I., Gorg, A., Lottspeich, F. and Gietl, C. (2007). "Dual specificities of the glyoxysomal/peroxisomal processing protease Deg15 in higher plants." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(27): 11501-6.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-79.
- Hettema, E. H., Girzalsky, W., van Den Berg, M., Erdmann, R. and Distel, B. (2000). "Saccharomyces cerevisiae pex3p and pex19p are required for proper localization and stability of peroxisomal membrane proteins." Embo J **19**(2): 223-33.

- Heupel, R. and Heldt, H. W. (1994). "Protein organization in the matrix of leaf peroxisomes." European Journal of Biochemistry **220**(1): 165-172.
- Heupel, R., Markgraf, T., Robinson, D. G. and Heldt, H. W. (1991). "Compartmentation Studies on Spinach Leaf Peroxisomes : Evidence for Channeling of Photorespiratory Metabolites in Peroxisomes Devoid of Intact Boundary Membrane." Plant Physiol. **96**(3): 971-979.
- Hicke, L., Schubert, H. L. and Hill, C. P. (2005). "Ubiquitin-binding domains." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(8): 610-21.
- Hirsch, C., Gauss, R., Horn, S. C., Neuber, O. and Sommer, T. (2009). "The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum." Nature **458**(7237): 453-60.
- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." **419**(6903): 135-141.
- Hoepfner, D., Berg, M. v. d., Philippsen, P., Tabak, H. F. and Hettema, E. H. (2001). "A Role for Vps1p, Actin, and the Myo2p Motor in Peroxisome Abundance and Inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*." The Journal of Cell Biology **155**(6): 979-990.
- Hoffmann, T. (2002). Signaltransduktion von Abscisinsäure in *Arabidopsis thaliana*: Transiente Expression in Protoplasten als Modellsystem. Lehrstuhl für Botanik, Technische Universität München.
- Holroyd, C. and Erdmann, R. (2001). "Protein translocation machineries of peroxisomes." FEBS Lett **501**(1): 6-10.
- Honsho, M., Hiroshige, T. and Fujiki, Y. (2002). "The membrane biogenesis peroxin Pex16p. Topogenesis and functional roles in peroxisomal membrane assembly." J Biol Chem **277**(46): 44513-24.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989). "Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension." Gene **77**(1): 61-68.
- Howitz, K. T. and McCarty, R. E. (1991). "Solubilization, Partial Purification, and Reconstitution of the Glycolate/Glycerate Transporter from Chloroplast Inner Envelope Membranes." Plant Physiol **96**(4): 1060-1069.
- Howitz, K. T. and McCarty, R. E. (1991). "Solubilization, Partial Purification, and Reconstitution of the Glycolate/Glycerate Transporter from Chloroplast Inner Envelope Membranes." Plant Physiol. **96**(4): 1060-1069.
- Hu, J., Aguirre, M., Peto, C., Alonso, J., Ecker, J. and Chory, J. (2002). "A role for peroxisomes in photomorphogenesis and development of *Arabidopsis*." Science **297**(5580): 405-9.
- Huang, A. H. C. (1992). "Oil Bodies and Oleosins in Seeds." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **43**(1): 177-200.
- Huhse, B., Rehling, P., Albertini, M., Blank, L., Meller, K. and Kunau, W. H. (1998). "Pex17p of *Saccharomyces cerevisiae* is a novel peroxin and component of the peroxisomal protein translocation machinery." J Cell Biol **140**(1): 49-60.
- Igarashi, D., Miwa, T., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. and Ohsumi, C. (2003). "Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in *Arabidopsis*." Plant J **33**(6): 975-87.
- Imanaka, T., Small, G. M. and Lazarow, P. B. (1987). "Translocation of Acyl-CoA oxidase into Peroxisomes requires ATP hydrolysis but not a membrane potential." The Journal of Cell Biology **105**(6): 2915-2922.
- Jentsch, S. (1992). "The ubiquitin-conjugation system." Annu Rev Genet **26**: 179-207.
- Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Leverson, J. D., Hunter, T. and Liu, Y. C. (1999). "The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase." Science **286**(5438): 309-12.
- Kamada, T., Nito, K., Hayashi, H., Mano, S., Hayashi, M. and Nishimura, M. (2003). "Functional differentiation of peroxisomes revealed by expression profiles of peroxisomal genes in *Arabidopsis thaliana*." Plant Cell Physiol **44**(12): 1275-89.

- Karnik, S. K. and Trelease, R. N. (2005). "Arabidopsis Peroxin 16 Coexists at Steady State in Peroxisomes and Endoplasmic Reticulum." Plant Physiol. **138**(4): 1967-1981.
- Kerssen, D., Hambruch, E., Klaas, W., Platta, H. W., de Kruijff, B., Erdmann, R., Kunau, W.-H. and Schliebs, W. (2006). "Membrane Association of the Cycling Peroxisome Import Receptor Pex5p." J. Biol. Chem. **281**(37): 27003-27015.
- Kiel, J. A., Emrich, K., Meyer, H. E. and Kunau, W. H. (2005). "Ubiquitination of the peroxisomal targeting signal type 1 receptor, Pex5p, suggests the presence of a quality control mechanism during peroxisomal matrix protein import." J Biol Chem **280**(3): 1921-30.
- Kiel, J. A., Veenhuis, M. and van der Klei, I. J. (2006). "PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant." Traffic **7**(10): 1291-1303.
- Klein, A. T., van den Berg, M., Bottger, G., Tabak, H. F. and Distel, B. (2002). "Saccharomyces cerevisiae acyl-CoA oxidase follows a novel, non-PTS1, import pathway into peroxisomes that is dependent on Pex5p." J Biol Chem **277**(28): 25011-9.
- Kliebenstein, D. J., Kroymann, J. and Mitchell-Olds, T. (2005). "The glucosinolate-myrosinase system in an ecological and evolutionary context." Curr Opin Plant Biol **8**(3): 264-71.
- Kobayashi, S., Tanaka, A. and Fujiki, Y. (2007). "Fis1, DLP1, and Pex11p coordinately regulate peroxisome morphogenesis." Exp Cell Res **313**(8): 1675-86.
- Koh, S., André, A., Edwards, H., Ehrhardt, D. and Somerville, S. C. (2005). "Arabidopsis thaliana subcellular responses to compatible Erysiphe cichoracearum infections." The Plant Journal **44**(3): 516-529.
- Kohler, R. H., Cao, J., Zipfel, W. R., Webb, W. W. and Hanson, M. R. (1997). "Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids." Science **276**(5321): 2039-42.
- Koller, A., Snyder, W. B., Faber, K. N., Wenzel, T. J., Rangell, L., Keller, G. A. and Subramani, S. (1999). "Pex22p of Pichia pastoris, essential for peroxisomal matrix protein import, anchors the ubiquitin-conjugating enzyme, Pex4p, on the peroxisomal membrane." J Cell Biol **146**(1): 99-112.
- Koncz, C. and Schell, J. (1986). "The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector." Molecular and General Genetics MGG **204**(3): 383-396.
- Kornberg, H. L. and Beevers, H. (1957). "The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor beans." Biochim Biophys Acta **26**(3): 531-7.
- Kosarev, P., Mayer, K. F. and Hardtke, C. S. (2002). "Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the Arabidopsis genome." Genome Biol **3**(4): research0016.1-research0016.12.
- Kozaki, A. and Takeba, G. (1996). "Photorespiration protects C3 plants from photooxidation." Nature **384**(6609): 557-560.
- Kragt, A., Voorn-Brouwer, T., van den Berg, M. and Distel, B. (2005). "The Saccharomyces cerevisiae peroxisomal import receptor Pex5p is monoubiquitinated in wild type cells." J Biol Chem **280**(9): 7867-74.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lazarow, P. B. and Fujiki, Y. (1985). "Biogenesis of Peroxisomes." Annual Review of Cell Biology **1**(1): 489-530.
- Leon, S., Zhang, L., McDonald, W. H., Yates, J., Cregg, J. M. and Subramani, S. (2006). "Dynamics of the peroxisomal import cycle of PpPex20p: ubiquitin-dependent localization and regulation." J Cell Biol **172**(1): 67-78.
- Liepmann, A. H. and Olsen, L. J. (2001). "Peroxisomal alanine : glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in Arabidopsis thaliana." Plant J **25**(5): 487-98.

- Liepman, A. H. and Olsen, L. J. (2003). "Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of Arabidopsis." Plant Physiol **131**(1): 215-27.
- Lin, Y., Sun, L., Nguyen, L. V., Rachubinski, R. A. and Goodman, H. M. (1999). "The Pex16p homolog SSE1 and storage organelle formation in Arabidopsis seeds." Science **284**(5412): 328-30.
- Lingard, M. J., Gidda, S. K., Bingham, S., Rothstein, S. J., Mullen, R. T. and Trelease, R. N. (2008). "Arabidopsis PEROXIN11c-e, FISSION1b, and DYNAMIN-RELATED PROTEIN3A cooperate in cell cycle-associated replication of peroxisomes." Plant Cell **20**(6): 1567-85.
- Lingard, M. J. and Trelease, R. N. (2006). "Five Arabidopsis peroxin 11 homologs individually promote peroxisome elongation, duplication or aggregation." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1961-72.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S. and Schulze-Lefert, P. (2005). "Pre- and Postinvasion Defenses Both Contribute to Nonhost Resistance in Arabidopsis." Science **310**(5751): 1180-1183.
- Liu, Y. G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. and Whittier, R. F. (1995). "Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR." Plant J **8**(3): 457-63.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S. and Weissman, A. M. (1999). "RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11364-9.
- Lorimer, G. H. (1983). "Carbon dioxide and carbamate formation: the makings of a biochemical control system." Trends in Biochemical Sciences **8**(2): 65-68.
- Lovering, R., Hanson, I. M., Borden, K. L., Martin, S., O'Reilly, N. J., Evan, G. I., Rahman, D., Pappin, D. J., Trowsdale, J. and Freemont, P. S. (1993). "Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2112-6.
- Mano, S., Nakamori, C., Hayashi, M., Kato, A., Kondo, M. and Nishimura, M. (2002). "Distribution and characterization of peroxisomes in Arabidopsis by visualization with GFP: dynamic morphology and actin-dependent movement." Plant Cell Physiol **43**(3): 331-41.
- Mano, S., Nakamori, C., Kondo, M., Hayashi, H. and Nishimura, M. (2004). "An Arabidopsis dynamin-related protein, DRP3A, controls both peroxisomal and mitochondrial division." The Plant Journal **38**(3): 487-498.
- Mano, S., Nakamori, C., Nito, K., Kondo, M. and Nishimura, M. (2006). "The Arabidopsis pex12 and pex13 mutants are defective in both PTS1- and PTS2-dependent protein transport to peroxisomes." Plant J **47**(4): 604-18.
- Martínez-García, J. F., Monte, E. and Quail, P. H. (1999). "A simple, rapid and quantitative method for preparing Arabidopsis protein extracts for immunoblot analysis." The Plant Journal **20**(2): 251-257.
- Marzioch, M., Erdmann, R., Veenhuis, M. and Kunau, W. H. (1994). "PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes." Embo J **13**(20): 4908-18.
- Matsumura, T., Otera, H. and Fujiki, Y. (2000). "Disruption of the interaction of the longer isoform of Pex5p, Pex5pL, with Pex7p abolishes peroxisome targeting signal type 2 protein import in mammals. Study with a novel Pex5-impaired Chinese hamster ovary cell mutant." J Biol Chem **275**(28): 21715-21.
- Matsuzono, Y., Kinoshita, N., Tamura, S., Shimozawa, N., Hamasaki, M., Ghaedi, K., Wanders, R. J., Suzuki, Y., Kondo, N. and Fujiki, Y. (1999). "Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2116-21.

- McNew, J. A. and Goodman, J. M. (1994). "An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo." J Cell Biol **127**(5): 1245-57.
- Medrano, H. and Primo-Millo, E. (1985). "Selection of *Nicotiana tabacum* Haploids of High Photosynthetic Efficiency." Plant Physiol **79**(2): 505-508.
- Mehler, A. H. (1951). "Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents." Arch Biochem **33**(1): 65-77.
- Michels, P. A., Bringaud, F., Herman, M. and Hannaert, V. (2006). "Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids." Biochim Biophys Acta **1763**(12): 1463-77.
- Miyata, N. and Fujiki, Y. (2005). "Shuttling mechanism of peroxisome targeting signal type 1 receptor Pex5: ATP-independent import and ATP-dependent export." Mol Cell Biol **25**(24): 10822-32.
- Miyata, N., Hosoi, K., Mukai, S. and Fujiki, Y. (2009). "In vitro import of peroxisome-targeting signal type 2 (PTS2) receptor Pex7p into peroxisomes." Biochim Biophys Acta **1793**(5): 860-70.
- Mollenhauer, H. H. and Morre, D. J. (1966). "Tubular connections between dictyosomes and forming secretory vesicles in plant Golgi apparatus." J Cell Biol **29**(2): 373-6.
- Moscicka, K. B., Klomp maker, S. H., Wang, D., van der Klei, I. J. and Boekema, E. J. (2007). "The *Hansenula polymorpha* peroxisomal targeting signal 1 receptor, Pex5p, functions as a tetramer." FEBS Lett **581**(9): 1758-62.
- Mullen, R. T., Flynn, C. R. and Trelease, R. N. (2001). "How are peroxisomes formed? The role of the endoplasmic reticulum and peroxins." Trends in Plant Science **6**(6): 256-261.
- Mullen, R. T., Lisenbee, C. S., Miernyk, J. A. and Trelease, R. N. (1999). "Peroxisomal Membrane Ascorbate Peroxidase Is Sorted to a Membranous Network That Resembles a Subdomain of the Endoplasmic Reticulum." Plant Cell **11**(11): 2167-2186.
- Mullen, R. T. and Trelease, R. N. (2006). "The ER-peroxisome connection in plants: Development of the "ER semi-autonomous peroxisome maturation and replication" model for plant peroxisome biogenesis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1763**(12): 1655-1668.
- Murphy, D. J. and Vance, J. (1999). "Mechanisms of lipid-body formation." Trends Biochem Sci **24**(3): 109-15.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980). "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA." Nucleic Acids Res **8**(19): 4321-5.
- Nair, D. M., Purdue, P. E. and Lazarow, P. B. (2004). "Pex7p translocates in and out of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol **167**(4): 599-604.
- Natesan, S. K., Sullivan, J. A. and Gray, J. C. (2005). "Stromules: a characteristic cell-specific feature of plastid morphology." J Exp Bot **56**(413): 787-97.
- Nishimura, M., Takeuchi, Y., De Bellis, L. and Hara-Nishimura, I. (1993). "Leaf peroxisomes are directly transformed to glyoxysomes during senescence of pumpkin cotyledons." Protoplasma **175**(3): 131-137.
- Nishimura, M., Yamaguchi, J., Mori, H., Akazawa, T. and Yokota, S. (1986). "Immunocytochemical Analysis Shows that Glyoxysomes Are Directly Transformed to Leaf Peroxisomes during Greening of Pumpkin Cotyledons." Plant Physiol **81**(1): 313-316.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I. and Murata, N. (2005). "Inhibition of the repair of photosystem II by oxidative stress in cyanobacteria." Photosynth Res **84**(1-3): 1-7.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I. and Murata, N. (2006). "A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II." Biochim Biophys Acta **1757**(7): 742-9.
- Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev, S. I., Inaba, M., Yokota, A. and Murata, N. (2001). "Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery." Embo J **20**(20): 5587-94.

- Nito, K., Hayashi, M. and Nishimura, M. (2002). "Direct interaction and determination of binding domains among peroxisomal import factors in *Arabidopsis thaliana*." Plant Cell Physiol **43**(4): 355-66.
- Nito, K., Kamigaki, A., Kondo, M., Hayashi, M. and Nishimura, M. (2007). "Functional classification of *Arabidopsis* peroxisome biogenesis factors proposed from analyses of knockdown mutants." Plant Cell Physiol **48**(6): 763-74.
- Noctor, G., Arisi, A., Jouanin, L. and Foyer, C. (1999). "Photorespiratory glycine enhances glutathione accumulation in both the chloroplastic and cytosolic compartments." J. Exp. Bot. **50**(336): 1157-1167.
- Noctor, G. and Foyer, C. H. (1998). "Ascorbate and Glutathione: Keeping active oxygen under control." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **49**(1): 249-279.
- Notredame, C., Higgins, D. G. and Heringa, J. (2000). "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." J Mol Biol **302**(1): 205-17.
- Ogren, W. L. (1984). "Photorespiration: Pathways, Regulation, and Modification." Annual Review of Plant Physiology **35**(1): 415-442.
- Okumoto, K., Abe, I. and Fujiki, Y. (2000). "Molecular anatomy of the peroxin Pex12p: ring finger domain is essential for Pex12p function and interacts with the peroxisome-targeting signal type 1-receptor Pex5p and a ring peroxin, Pex10p." J Biol Chem **275**(33): 25700-10.
- Oliveira, M. E., Gouveia, A. M., Pinto, R. A., Sa-Miranda, C. and Azevedo, J. E. (2003). "The energetics of Pex5p-mediated peroxisomal protein import." J Biol Chem **278**(41): 39483-8.
- Olsen, L. J. (1998). "The surprising complexity of peroxisome biogenesis." Plant Molecular Biology **38**(1): 163-189.
- Orth, T., Reumann, S., Zhang, X., Fan, J., Wenzel, D., Quan, S. and Hu, J. (2007). "The PEROXIN11 protein family controls peroxisome proliferation in *Arabidopsis*." Plant Cell **19**(1): 333-50.
- Osmond, B., Badger, M., Maxwell, K., Björkman, O. and Leegood, R. (1997). "Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation." Trends in Plant Science **2**(4): 119-121.
- Otera, H., Harano, T., Honsho, M., Ghaedi, K., Mukai, S., Tanaka, A., Kawai, A., Shimizu, N. and Fujiki, Y. (2000). "The mammalian peroxin Pex5pL, the longer isoform of the mobile peroxisome targeting signal (PTS) type 1 transporter, translocates the Pex7p.PTS2 protein complex into peroxisomes via its initial docking site, Pex14p." J Biol Chem **275**(28): 21703-14.
- Otera, H., Setoguchi, K., Hamasaki, M., Kumashiro, T., Shimizu, N. and Fujiki, Y. (2002). "Peroxisomal targeting signal receptor Pex5p interacts with cargoes and import machinery components in a spatiotemporally differentiated manner: conserved Pex5p WXXXF/Y motifs are critical for matrix protein import." Mol Cell Biol **22**(6): 1639-55.
- Otzen, M., Wang, D., Lunenborg, M. G. and van der Klei, I. J. (2005). "Hansenula polymorpha Pex20p is an oligomer that binds the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2)." J Cell Sci **118**(Pt 15): 3409-18.
- Park, S., Isaacson, R., Kim, H. T., Silver, P. A. and Wagner, G. (2005). "Ufd1 exhibits the AAA-ATPase fold with two distinct ubiquitin interaction sites." Structure **13**(7): 995-1005.
- Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A. C., Madgwick, P. J. and Keys, A. J. (2003). "Manipulation of RuBisCO: the amount, activity, function and regulation." J. Exp. Bot. **54**(386): 1321-1333.
- Pause, B., Diestelkötter, P., Heid, H. and Just, W. W. (1997). "Cytosolic factors mediate protein insertion into the peroxisomal membrane." FEBS Lett **414**(1): 95-8.
- Piekarska, K., Hardy, G., Mol, E., van den Burg, J., Strijbis, K., van Roermund, C., van den Berg, M. and Distel, B. (2008). "The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional {beta}-oxidation

- pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane." *Microbiology* **154**(10): 3061-3072.
- Pires, J. R., Hong, X., Brockmann, C., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., Oschkinat, H. and Erdmann, R. (2003). "The ScPex13p SH3 domain exposes two distinct binding sites for Pex5p and Pex14p." *J Mol Biol* **326**(5): 1427-35.
- Platta, H. W., El Magraoui, F., Schlee, D., Grunau, S., Girzalsky, W. and Erdmann, R. (2007). "Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling." *J Cell Biol* **177**(2): 197-204.
- Platta, H. W., Girzalsky, W. and Erdmann, R. (2004). "Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p." *Biochem J* **384**(Pt 1): 37-45.
- Platta, H. W., Grunau, S., Rosenkranz, K., Girzalsky, W. and Erdmann, R. (2005). "Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol." *Nat Cell Biol* **7**(8): 817-22.
- Purdue, P. E. and Lazarow, P. B. (2001). "Peroxisome biogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 701-52.
- Purdue, P. E., Yang, X. and Lazarow, P. B. (1998). "Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway." *J Cell Biol* **143**(7): 1859-69.
- Rachmilevitch, S., Cousins, A. B. and Bloom, A. J. (2004). "Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(31): 11506-11510.
- Reguenga, C., Oliveira, M. E. M., Gouveia, A. M. M., Sa-Miranda, C. and Azevedo, J. E. (2001). "Characterization of the Mammalian Peroxisomal Import Machinery. Pex2p, Pex5p, Pex12p, and Pex14p are subunits of the same protein assembly." *J. Biol. Chem.* **276**(32): 29935-29942.
- Rehling, P., Skaletz-Rorowski, A., Girzalsky, W., Voorn-Brouwer, T., Franse, M. M., Distel, B., Veenhuis, M., Kunau, W. H. and Erdmann, R. (2000). "Pex8p, an intraperoxisomal peroxin of *Saccharomyces cerevisiae* required for protein transport into peroxisomes binds the PTS1 receptor pex5p." *J Biol Chem* **275**(5): 3593-602.
- Reumann, S. (2004). "Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses." *Plant Physiol* **135**(2): 783-800.
- Reumann, S., Babujee, L., Ma, C., Wienkoop, S., Siemsen, T., Antonicelli, G. E., Rasche, N., Luder, F., Weckwerth, W. and Jahn, O. (2007). "Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms." *Plant Cell* **19**(10): 3170-93.
- Reumann, S., Ma, C., Lemke, S. and Babujee, L. (2004). "AraPerox. A Database of Putative Arabidopsis Proteins from Plant Peroxisomes." *Plant Physiol.* **136**(1): 2587-2608.
- Reumann, S., Maier, E., Benz, R. and Heldt, H. W. (1995). "The membrane of leaf peroxisomes contains a porin-like channel." *J Biol Chem* **270**(29): 17559-65.
- Reumann, S., Maier, E., Heldt, H. W. and Benz, R. (1998). "Permeability properties of the porin of spinach leaf peroxisomes." *Eur J Biochem* **251**(1-2): 359-66.
- Reumann, S. and Weber, A. P. (2006). "Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled--others remain." *Biochim Biophys Acta* **1763**(12): 1496-510.
- Rhee, S. G., Kang, S. W., Jeong, W., Chang, T.-S., Yang, K.-S. and Woo, H. A. (2005). "Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins." *Current Opinion in Cell Biology* **17**(2): 183-189.
- Sacksteder, K. A., Jones, J. M., South, S. T., Li, X., Liu, Y. and Gould, S. J. (2000). "PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis." *J Cell Biol* **148**(5): 931-44.
- Saidowsky, J., Dodt, G., Kirchberg, K., Wegner, A., Nastainczyk, W., Kunau, W. H. and Schliebs, W. (2001). "The di-aromatic pentapeptide repeats of the human

- peroxisome import receptor PEX5 are separate high affinity binding sites for the peroxisomal membrane protein PEX14." J Biol Chem **276**(37): 34524-9.
- Salomons, F. A., van der Klei, I. J., Kram, A. M., Harder, W. and Veenhuis, M. (1997). "Brefeldin A interferes with peroxisomal protein sorting in the yeast *Hansenula polymorpha*." FEBS Letters **411**(1): 133-139.
- Sautter, C. (1986). "Microbody transition in greening watermelon cotyledons Double immunocytochemical labeling of isocitrate lyase and hydroxypyruvate reductase." Planta **167**(4): 491-503.
- Schafer, A., Kerssen, D., Veenhuis, M., Kunau, W. H. and Schliebs, W. (2004). "Functional similarity between the peroxisomal PTS2 receptor binding protein Pex18p and the N-terminal half of the PTS1 receptor Pex5p." Mol Cell Biol **24**(20): 8895-906.
- Schneidereit, J., Häusler, R. E., Fiene, G., Kaiser, W. M. and Weber, A. P. M. (2006). "Antisense repression reveals a crucial role of the plastidic 2-oxoglutarate/malate translocator DiT1 at the interface between carbon and nitrogen metabolism." The Plant Journal **45**(2): 206-224.
- Schneider, R., Brugger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M., Athenstaedt, K., Hrastnik, C., Eder, S., Daum, G., Paltauf, F., Wieland, F. T. and Kohlwein, S. D. (1999). "Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane." J Cell Biol **146**(4): 741-54.
- Schnell, D. J. and Hebert, D. N. (2003). "Protein Translocons: Multifunctional Mediators of Protein Translocation across Membranes." Cell **112**(4): 491-505.
- Schultz, C. J. and Coruzzi, G. M. (1995). "The aspartate aminotransferase gene family of *Arabidopsis* encodes isoenzymes localized to three distinct subcellular compartments." Plant J **7**(1): 61-75.
- Schumann, U. (2003). Funktionelle Charakterisierung des peroxisomalen Membranproteins Pex10p aus *Arabidopsis thaliana*. Lehrstuhl für Botanik, Technische Universität München.
- Schumann, U., Gietl, C. and Schmid, M. (1999). "The Electronic Plant Gene Register." Plant Physiol **120**(1): 339-340.
- Schumann, U., Prestele, J., O'Geen, H., Brueggeman, R., Wanner, G. and Gietl, C. (2007). "Requirement of the C3HC4 zinc RING finger of the *Arabidopsis* PEX10 for photorespiration and leaf peroxisome contact with chloroplasts." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 1069-74.
- Schumann, U., Wanner, G., Veenhuis, M., Schmid, M. and Gietl, C. (2003). "AthPEX10, a nuclear gene essential for peroxisome and storage organelle formation during *Arabidopsis* embryogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9626-31.
- Scott, I., Sparkes, I. A. and Logan, D. C. (2007). "The missing link: inter-organellar connections in mitochondria and peroxisomes?" Trends Plant Sci **12**(9): 380-1; author reply 381-3.
- Sharkey, T. D. (1988). "Estimating the rate of photorespiration in leaves." Physiologia Plantarum **73**(1): 147-152.
- Shimomura, O. and Johnson, F. H. (1975). "Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **72**(4): 1546-1549.
- Shiozawa, K., Maita, N., Tomii, K., Seto, A., Goda, N., Akiyama, Y., Shimizu, T., Shirakawa, M. and Hiroaki, H. (2004). "Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase. Characterization of a putative adaptor-binding domain." J Biol Chem **279**(48): 50060-8.
- Sichting, M., Schell-Steven, A., Prokisch, H., Erdmann, R. and Rottensteiner, H. (2003). "Pex7p and Pex20p of *Neurospora crassa* function together in PTS2-dependent protein import into peroxisomes." Mol Biol Cell **14**(2): 810-21.

- Singh, T., Hayashi, M., Mano, S., Arai, Y., Goto, S. and Nishimura, M. (2009). "Molecular components required for the targeting of PEX7 to peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*." Plant J.
- Somerville, C. R. (2001). "An early *Arabidopsis* demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration." Plant Physiol **125**(1): 20-4.
- Somerville, C. R. and Ogren, W. L. (1979). "A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of *Arabidopsis*." Nature **280**(5725): 833-836.
- Somerville, C. R. and Ogren, W. L. (1980). "Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity." Nature **286**(5770): 257-259.
- Somerville, C. R. and Ogren, W. L. (1980). "Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(5): 2684-2687.
- Somerville, C. R. and Ogren, W. L. (1981). "Photorespiration-deficient Mutants of *Arabidopsis thaliana* Lacking Mitochondrial Serine Transhydroxymethylase Activity." Plant Physiol **67**(4): 666-671.
- Somerville, C. R. and Ogren, W. L. (1982). "Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity." Biochem J **202**(2): 373-80.
- Somerville, C. R., Portis, A. R. and Ogren, W. L. (1982). "A mutant of *Arabidopsis thaliana* which lacks activation of RuBP carboxylase in vivo." Plant Physiol **70**(2): 381-387.
- Somerville, S. C. and Ogren, W. L. (1983). "An *Arabidopsis thaliana* mutant defective in chloroplast dicarboxylate transport." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(5): 1290-1294.
- Soundararajan, S., Jedd, G., Li, X., Ramos-Pamplona, M., Chua, N. H. and Naqvi, N. I. (2004). "Woronin Body function in *Magnaporthe grisea* is essential for efficient pathogenesis and for survival during Nitrogen starvation stress." Plant Cell **16**(6): 1564-1574.
- Sparkes, I. A., Brandizzi, F., Slocombe, S. P., El-Shami, M., Hawes, C. and Baker, A. (2003). "An *Arabidopsis* pex10 null mutant is embryo lethal, implicating peroxisomes in an essential role during plant embryogenesis." Plant Physiol **133**(4): 1809-19.
- Stahl, R., Horvath, H., Van Fleet, J., Voetz, M., von Wettstein, D. and Wolf, N. (2002). "T-DNA integration into the barley genome from single and double cassette vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2146-51.
- Stanley, W. A., Filipp, F. V., Kursula, P., Schuller, N., Erdmann, R., Schliebs, W., Sattler, M. and Wilmanns, M. (2006). "Recognition of a functional peroxisome type 1 target by the dynamic import receptor pex5p." Mol Cell **24**(5): 653-63.
- Stein, K., Schell-Steven, A., Erdmann, R. and Rottensteiner, H. (2002). "Interactions of Pex7p and Pex18p/Pex21p with the peroxisomal docking machinery: implications for the first steps in PTS2 protein import." Mol Cell Biol **22**(17): 6056-69.
- Stone, S. L., Hauksdottir, H., Troy, A., Herschleb, J., Kraft, E. and Callis, J. (2005). "Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*." Plant Physiol **137**(1): 13-30.
- Tabak, H. F., Braakman, I. and Distel, B. (1999). "Peroxisomes: simple in function but complex in maintenance." Trends Cell Biol **9**(11): 447-53.
- Takahashi, S., Bauwe, H. and Badger, M. (2007). "Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage processes in *Arabidopsis*." Plant Physiol. **144**(1): 487-494.
- Takahashi, S. and Murata, N. (2006). "Glycerate-3-phosphate, produced by CO₂ fixation in the Calvin cycle, is critical for the synthesis of the D1 protein of photosystem II." Biochim Biophys Acta **1757**(3): 198-205.
- Timm, S., Nunes-Nesi, A., Parnik, T., Morgenthal, K., Wienkoop, S., Keerberg, O., Weckwerth, W., Kleczkowski, L. A., Fernie, A. R. and Bauwe, H. (2008). "A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in *Arabidopsis*." Plant Cell **20**(10): 2848-59.

- Titorenko, V. I. and Rachubinski, R. A. (2001). "Dynamics of peroxisome assembly and function." Trends in Cell Biology **11**(1): 22-29.
- Titus, D. and Becker, W. (1985). "Investigation of the glyoxysome-peroxisome transition in germinating cucumber cotyledons using double-label immunoelectron microscopy." J. Cell Biol. **101**(4): 1288-1299.
- Tolbert, N. E. (1997). "The C2 Oxidative Photosynthetic Carbon Cycle." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **48**: 1-25.
- Tolbert, N. E., Oeser, A., Kasaki, T., Hageman, R. H. and Yamazaki, R. K. (1968). "Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism." J Biol Chem **243**(19): 5179-84.
- Tolbert, N. E., Yamazaki, R. K. and Oeser, A. (1970). "Localization and properties of hydroxypyruvate and glyoxylate reductases in spinach leaf particles." J Biol Chem **245**(19): 5129-36.
- Trelease, R. N. (1984). "Biogenesis of Glyoxysomes." Annual Review of Plant Physiology **35**(1): 321-347.
- Urquhart, A. J., Kennedy, D., Gould, S. J. and Crane, D. I. (2000). "Interaction of Pex5p, the type 1 peroxisome targeting signal receptor, with the peroxisomal membrane proteins Pex14p and Pex13p." J Biol Chem **275**(6): 4127-36.
- van den Bosch, H., Schutgens, R. B. H., Wanders, R. J. A. and Tager, J. M. (1992). "Biochemistry of Peroxisomes." Annual Review of Biochemistry **61**(1): 157-197.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoord, R. A. and Schell, J. (1974). "Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability." Nature **252**(5479): 169-70.
- van Roermund, C. W., Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, R. J. and Tabak, H. F. (1995). "The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions." Embo J **14**(14): 3480-6.
- Veenhuis, M. (1992). "Peroxisome biogenesis and function in *Hansenula polymorpha*." Cell Biochemistry and Function **10**(3): 175-184.
- Wagner, D., Przybyla, D., op den Camp, R., Kim, C., Landgraf, F., Lee, K. P., Wursch, M., Laloi, C., Nater, M., Hideg, E. and Apel, K. (2004). "The Genetic Basis of Singlet Oxygen-Induced Stress Responses of *Arabidopsis thaliana*." Science **306**(5699): 1183-1185.
- Wallsgrave, R. M., Turner, J. C., Hall, N. P., Kendall, A. C. and Bright, S. W. (1987). "Barley Mutants Lacking Chloroplast Glutamine Synthetase-Biochemical and Genetic Analysis." Plant Physiol **83**(1): 155-158.
- Wanner, G. and Theimer, R. R. (1982). "Two types of microbodies in *Neurospora crassa*." Ann N Y Acad Sci **386**: 269-84.
- Weller, S., Gould, S. J. and Valle, D. (2003). "Peroxisome biogenesis disorders." Annu Rev Genomics Hum Genet **4**: 165-211.
- White, S. R. and Lauring, B. (2007). "AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery." Traffic **8**(12): 1657-67.
- Wiebel, F. F. and Kunau, W. H. (1992). "The Pas2 protein essential for peroxisome biogenesis is related to ubiquitin-conjugating enzymes." Nature **359**(6390): 73-6.
- Williams, C., van den Berg, M., Geers, E. and Distel, B. (2008). "Pex10p functions as an E3 ligase for the Ubc4p-dependent ubiquitination of Pex5p." Biochemical and Biophysical Research Communications **374**(4): 620-624.
- Williams, C., van den Berg, M., Sprenger, R. R. and Distel, B. (2007). "A conserved cysteine is essential for Pex4p-dependent ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p." J Biol Chem **282**(31): 22534-43.
- Wingler, A., Lea, P. J., Quick, W. P. and Leegood, R. C. (2000). "Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **355**(1402): 1517-29.
- Woodrow, I. E. and Berry, J. A. (1988). "Enzymatic Regulation of Photosynthetic CO₂ Fixation in C₃ Plants." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **39**(1): 533-594.

- Woodward, A. W. and Bartel, B. (2005). "The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5." Mol Biol Cell **16**(2): 573-83.
- Yoon, Y., Krueger, E. W., Oswald, B. J. and McNiven, M. A. (2003). "The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1." Mol Cell Biol **23**(15): 5409-20.
- Yu, C., Claybrook, D. L. and Huang, A. H. (1983). "Transport of glycine, serine, and proline into spinach leaf mitochondria." Arch Biochem Biophys **227**(1): 180-7.
- Yuasa, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T. and Shinozaki, K. (2001). "Oxidative stress activates ATMPK6, an Arabidopsis homologue of MAP Kinase." Plant Cell Physiol. **42**(9): 1012-1016.
- Zhang, J. W. and Hu, J. (2009). "Two small protein families, DYNAMIN-RELATED PROTEIN3 and FISSION1, are required for peroxisome fission in Arabidopsis." The Plant Journal **57**(1): 146-159.
- Zhang, J. W. and Lazarow, P. B. (1995). "PEB1 (PAS7) in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a hydrophilic, intra-peroxisomal protein that is a member of the WD repeat family and is essential for the import of thiolase into peroxisomes." J Cell Biol **129**(1): 65-80.
- Zhang, L., Leon, S. and Subramani, S. (2006). "Two independent pathways traffic the intraperoxisomal peroxin PpPex8p into peroxisomes: mechanism and evolutionary implications." Mol Biol Cell **17**(2): 690-9.
- Zolman, B. K. and Bartel, B. (2004). "An Arabidopsis indole-3-butyric acid-response mutant defective in PEROXIN6, an apparent ATPase implicated in peroxisomal function." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(6): 1786-91.
- Zolman, B. K., Monroe-Augustus, M., Silva, I. D. and Bartel, B. (2005). "Identification and functional characterization of Arabidopsis PEROXIN4 and the interacting protein PEROXIN22." Plant Cell **17**(12): 3422-35.
- Zolman, B. K., Yoder, A. and Bartel, B. (2000). "Genetic Analysis of Indole-3-butyric Acid Responses in Arabidopsis thaliana Reveals Four Mutant Classes." Genetics **156**(3): 1323-1337.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christine Gietl für die Überlassung des „womöglich interessantesten Projektes am Lehrstuhl“ (Zitat Michael Meinhard), für Ihre großartige Unterstützung während der letzten vier Jahre, daß Sie für Ihre Doktoranden alles tut, was dem Projekt nur irgendwie dienlich ist und vor allem, daß die „Gietl-Truppe“ immer geschlossen auftreten konnte. Über die ausnahmslos fruchtbaren und zielorientierten Diskussionen über das Projekt bin ich nachhaltig dankbar und begeistert. Auch außerhalb des Labors auf zahlreichen Meetings und Unternehmungen, die Sie uns zugutekommen ließ, kam neben Fachlichem die Gaudi nie zu kurz, sei es als harter Kern in Leuvens Nachtleben, sei es bei Gesangseinlagen beim Heurigen in Wien.

Großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Diter H. von Wettstein, den ich über Frau Prof. Dr. Christine Gietl in Washington D.C. kennenlernen durfte und der über viele Jahre hinweg dem Projekt wertvolle Anregungen gegeben hat und mich gemeinsam mit Prof. Dr. Birger Lindberg-Möller mit nur einem Satz davon überzeugen konnte in Nordschweden meinen ersten Post-doc zu machen: „Wie? Du willst nach Schweden? Dann mußt nach Umea!“ Seine Korrekturen unserer englischsprachigen Manuskripte waren einzigartig und das von ihm verfasste Empfehlungsschreiben für meine Bewerbung in Umea entlockte einem Leser: „To be honest, I've never read such a good reference!“ Danke Diter.

Dem Ordinarius des Lehrstuhls für Botanik der TU-München Herrn Prof. Dr. Erwin Grill möchte ich für die Infrastruktur am Lehrstuhl, für die EMS-Mutagenese der PEX10- Δ Zn1-Population, sowie für die zahlreichen Diskussionsbeiträge im Mittwochs-Seminar danken. Für seine Rückendeckung bei den gewagten Betriebsausflügen in die Schluchten Berchtesgadens und auf den Inn in der Imster Schlucht, sowie für seine Begeisterung für Spanferkel-Feste und kleine Bauvorhaben vor dem Gebäude (Grill) bin ich ihm ebenso dankbar.

Herrn Prof. Dr. Klaus Lenzian bin ich dankbar, daß er sich um die vielen im Hintergrund des täglichen Geschehens anfallenden „Kleinigkeiten“ und Unannehmlichkeiten gekümmert hat, die sonst niemand gemacht hätte und für so manches konspirative Gespräch beim nachmittäglichen Tee.

Mein Dank gilt auch den folgenden Mitarbeitern am Lehrstuhl für Botanik:

- Herrn Prof. Dr. Kay Schneitz für das Verfassen meines zweiten Empfehlungsschreibens für Umea...hab ich nie zu Gesicht bekommen, aber kann gar nicht schlecht gewesen sein. Danke Kay.
- Frau Dr. Farhah Assaad für die Korrektur des einen oder anderen Manuskripts in englischer Sprache, für die wertvollen Diskussionsbeiträge im Mittwochsseminar und dafür, daß meine Frau Mona ihren Garten in Gestalt bringen durfte.
- Herrn Dr. Alexander Christmann für die vielen hilfreichen Tips und für sein immer offenes Ohr für die Probleme von Doktoranden.
- Christian Kornbauer und Christoph Heidersberger für Bestellungen von Chemikalien, Behebung von Computerproblemen und das Organisieren so manchen Freezers.
- Frau Johanna Berger für ein perfekt organisiertes Materiallager und ihr „versonntes“ Wesen, das bei Tee und Kuchen für so manches Schmunzeln sorgte.
- Caroline Klaus, Lisa Held und Michael Schmidt für Ihre Gärtnerarbeiten, unzählige Erdschalen und Millionen von Samen, sowie die Bekämpfung hartneckigen Schädlingsbefalls, der durch unbekümmerte Doktoranden ein ubiquitärer Begleiter des Laboralltags war und ist.
- Herrn Josef Reischenbeck für handwerkliche Meisterstücke, die immer besser waren als die Originale.

- Den guten Geistern des Lehrstuhls Frau Beate Seliger und Frau Ulrike Schubert für stetige Hilfsbereitschaft sogar bei nicht dienstlichen Angelegenheiten wie Formularen für Erziehungsgeld etc...

Meinem Vorgänger Dr. Uwe Schumann bin ich für die Grundsteinlegung des Δ Zn-Projekts und das frühe Wecken der Begeisterung für das Thema bereits im GP2 sehr dankbar.

Dr. Michael Helm prägte maßgeblich meinen Arbeitsstil, rannte allerdings offene Türen ein beim Versuch mir klar zu machen, daß man Labor nur heil übersteht, wenn die Motivation stimmt...was hatten wir für einen Spaß...

Dem harten Kern des Doktorandenteams bestehend aus Dr. Jana Wünschmann, Dr. Ralph Blum, Dr. Danièle Moes, bald-Dr. Arthur Korte, Dr. Lynette Fulton, bald-Dr. Sebastian „Wastecraft“ Grünwald und Georg „G-Ork“ Hierl danke ich für ein phantastisches Arbeitsklima, das auch außerhalb des Labors Fortsetzung fand.

Meinen beiden Laborkollegen Esther Dolze und Georg Hierl für ihren Beitrag zur „Gietl-Truppe“, letzterem vor allem dafür, daß er auch abends um 20.30 Uhr noch zu richtig guten Diskussionen fähig und Willens war, daß er eigene Probleme hinten an stellte, um mit helfender Hand zur Seite zu stehen, daß er mit seinem einzigartigen Kindskopf-Humor dazu beigetragen hat, daß ich mich fast jeden Morgen auf das Labor gefreut habe. Gott, was haben wir gebrüllt Schosch, merßn! Zusammen mit dem dritten der Messerfraktion, Sebastian Grünwald, warst Du, ward ihr beiden nicht nur wegen unseres gemeinsamen Brotzeit-Kränzchens und zusammengezählt vieler Tage abendlicher Zockrunden der Lichtblick im grauen Laboralltag. Ohne Eich wards echt fahd worn!

Herrn Stefan Hetkamp gilt Dank für die Klonierung der PEX12-Konstrukte und der Beteiligung an der Aufklärung der Funktion von PEX10 und PEX2 im Rahmen seiner Diplomarbeit. Er ließ sich nicht überreden eine Dr.-Arbeit zu machen und verdient jetzt stattdessen in der Schweiz Geld... a ned verkehrt.

Für die phänomenalen licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen bin ich Prof. Dr. Gerhard Wanner und seinen Mitarbeiterinnen Conny Niemann und Silvia Dobler sehr dankbar; die vielen Diskussionen und Vorschläge sowie die familiäre Atmosphäre in Deiner Arbeitsgruppe bleiben mir in guter Erinnerung; Danke Gerhard.

Prof. Dr. Wolfram Weckwerth und seinem Mitarbeiter Dr. Christian Scherling am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm für die sofortige Integration in die Arbeitsgruppe und das Anfertigen der Metabolom-Analysen dieser Arbeit gebührt ebenso großer Dank wie Prof. Dr. Hans Schnyder und seinen Mitarbeitern der Grünlandlehre der TU-München Dr. Rudi Schäufele und v.a. Herrn Feneis für die Bereitstellung der CO₂-Kammern und technischen Beistand.

Allen anderen, die hier nicht explizit erwähnt wurden, möchte ich für ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit ebenfalls danken.

Meinem Bruder Martin und Jana Wünschmann danke ich sehr für Ihre Hilfe beim Korrekturlesen, der Formatierung meiner Dr.-Arbeit, den Inline-Skate-Runden durchs Ampertal, Jana besonders dafür, daß Sie mir das Klonieren beigebracht hat und beiden für ihre „Onkel- und Tanten-Dienste“.

Meinen Eltern und Schwiegereltern danke ich für zahlreiche Großeltern-Dienste und für finanzielle Unterstützungen, die unserer Kleinfamilie den Rücken frei hielten.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Mona, die über weite Strecken alleinerziehende Mutter war, neben Haushalt, ihrer eigenen Diplomarbeit und seit Sommer 2006 ihres eigenen Berufes als Landschaftsarchitektin, mit Ihrer Liebe und Zuversicht eine große Stütze war und mir den Rücken frei hielt, wann immer es Ihr möglich war. Unseren Umzug nach Schweden hat auch Sie in den drei Monaten des Zusammenschreibens meiner Dr.-Arbeit alleine organisiert. Unsere Tochter Anna-Maria war mit Ihrem sonnigen Wesen der Treibstoff für diese Unternehmung; Anna, durch Dich macht das Ganze erst richtig Sinn.