Identifizierung und Charakterisierung von Signaltransduktionselementen der 2-Cys-Peroxiredoxin A Regulation in *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Heiko Hiltscher
aus Hanau

Düsseldorf, November 2011

Für diejenigen, die mich mögen und mochten.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1. EINLEITUNG		1
1.1	Biotischer und abiotischer Stress	1
1.2	Oxidativer Stress	1
1.3	Antioxidatives Schutzsystem	2
	1.3.1 Niedermolekulare Antioxidantien	2
	1.3.2 Enzymatische Systeme der ROS Degradierung	5
	1.3.2.1 Ascorbat abhängiger „*Water-Water-Cycle*“	7
	1.3.2.2 Ascorbat unabhängiger „*Water-Water-Cycle*“	8
	1.3.2.3 Thioredoxine und Glutaredoxine	9
1.4	Chloroplasten-Zellkern Signaltransduktion und *2-Cys-Prx A* Genexpression	11
	1.4.1 Magnesium-Protoporphyrin IX Signaltransduktion	12
	1.4.2 Signaltransduktion durch Intersystemsignale	12
	1.4.3 Akzeptorverfügbarkeit an Photosystem I	13
	1.4.4 Signaltransduktion durch reaktive Sauerstoffspezies	13
	1.4.5 Signaltransduktion über niedermolekulare Antioxidantien	14
	1.4.6 Signaltransduktion über Metabolite	14
1.5	Die *rimb*-Mutanten	15
1.6	Zielsetzung der Arbeit	16
2. MATERIAL und METHODEN		17
2.1	Samen- und Pflanzenmaterial	17
	2.1.1 T-DNA Insertionslinien	17
	2.1.2 Kreuzung der Pflanzen	17
2.2	Anzucht der Pflanzen	17
	2.2.1 Erdsubstrate	17
	2.2.1.1 Nährstoffarmes Substrat	18
	2.2.1.2 Nährstoffreiches Substrat	18
	2.2.1.3 Variation des Nährstoffgehalts in Erdkulturen	19
	2.2.2 Sterile Substrate	20
	2.2.2.1 Desinfektion von Samen für sterile Anzuchten	20
	2.2.2.2 Selektive Variation der Nährstoffe in sterilen Kulturen	21
2.3	Segregationsanalyse	21

2.4 Messung der Luciferaseaktivität 21
2.5 Kartierung der Mutation 22
2.5.1 Isolation von DNA 22
2.5.2 Polymerasekettenreaktion zur Kartierung 23
2.5.3 Genspezifische Polymerasekettenreaktion 23
2.5.4 Agarose Gelelektrophorese 24
2.5.5 Reinigung von PCR-Fragmenten ohne Nebenprodukte 25
2.5.6 Reinigung von PCR-Fragmenten mit Nebenprodukten 25
2.5.7 Klonierungen 25
2.5.8 Kolonie-PCR 26
2.5.9 Anzucht der Bakterien 26
2.5.10 Isolation von Plasmiden 27
2.5.11 Isolation von Plasmiden für Sequenzierungen 27
2.5.12 Sequenzierungen 28
2.5.13 Detektion von Heteroduplex DNA durch TILLING 28
2.5.14 Isolation der gesamten Ribonukleinsäure aus *A. thaliana* 28
2.5.15 Überprüfung der RNA 29
2.5.16 Isolation der gesamten RNA aus *A. thaliana* für die qPCR 29
2.5.17 Synthese der komplementären DNA aus RNA 29
2.5.18 Quantitative Real-time-PCR 30
2.6 Physiologische Untersuchungen 31
2.6.1 Jasmonsäure-Wachstumstest 31
2.6.2 Salicylsäure-Wachstumstest 31
2.6.3 Analyse des Rosettendurchmessers 31
2.6.4 Analyse der Wurzelstrukturen 31
2.6.5 Bestimmung des Chlorophyllgehalts 32
2.6.6 Reaktion auf Paraquat 32
2.7 Mikroskopie 32
2.7.1 Rasterelektronenmikroskopie 32
2.7.1.1 Kritische Punkt-Trocknung 32
2.7.1.2 Rasterelektronenmikroskopie 33
2.7.1.3 Auswertung mittels ImageJ 33
2.7.2 Lichtmikroskopie 33
2.7.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie 33

2.8 Bioinformatische Methoden 34

3. ERGEBNISSE 35

3.1 Morphologie und Phänotyp 35

3.1.1 Analyse des Rosettendurchmessers 36

3.1.2 Analyse der Wurzelstrukturen 37

3.1.3 Bestimmung des Chlorophyllgehalts 38

3.2 Die Mutante *rimb1* 39

3.2.1 Kartierung der Mutante *rimb1* 39

3.2.1.1 Sequenzierungen 40

3.2.1.2 Analyse der T-DNA Linie 41

3.2.2 Physiologische Untersuchungen 43

3.2.2.1 Jasmonsäure 43

3.2.2.2 Reaktion auf Paraquat 43

3.2.2.3 Quantitative Real-time-PCR-Analyse der 2-CPA, CEO1 und Rap2.4a Transkriptspiegel 45

3.2.3 Morphologisch-anatomische Analysen 46

3.2.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Auswertungen 46

3.2.3.1.1 Trichome und Mittelrippe 47

3.2.3.1.2 Epidermaler Aufbau 49

3.3 Die Mutante *rimb6* 51

3.3.1 Kartierung der Mutante *rimb6* 51

3.3.1.1 Segregationsanalyse 51

3.3.1.2 Kartierung der Mutante *rimb6* 51

3.3.1.3 Analyse der T-DNA Linien 53

3.3.1.4 Ergebnisse des TILLING 53

3.3.1.5 Sequenzierungen 53

3.3.2 Physiologische Untersuchungen 54

3.3.2.1 Jasmonsäure-Wachstumstest 54

3.3.2.2 Salicylsäure-Wachstumstest 55

3.3.2.3 Variation des Nährstoffgehalts in Erdkulturen 55

3.3.2.4 Selektive Variationen der Nährstoffe in sterilen Kulturen 58

3.3.2.5 Quantitative Real-time-PCR-Analyse der 2-CPA, CEO1 und Rap2.4a Transkriptspiegel 60

3.3.3 Morphologisch-anatomische Analysen 61
3.3.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Auswertungen 61
3.3.3.1.1 Trichome und Mittelrippe 62
3.3.3.1.2 Epidermale Strukturen 64
3.3.3.2 Lichtmikroskopische und konfokalmikroskopische Auswertungen 65

4. DISKUSSION 66

4.1 Die Mutanten *rimb1* und *rimb6* 66
4.2 Die Mutante *rimb1* 66
4.2.1 Ergebnis der Kartierung 66
4.2.1.1 Sequenzierung 66
4.2.1.2 Untersuchung der T-DNA 67
4.2.2 Phänotypisch-physiologische Untersuchungen 67
4.2.2.1 Analysen der Rosettendurchmesser 67
4.2.2.2 Analysen der Wurzelstrukturen 68
4.2.2.3 Reaktion auf Jasmonsäure 68
4.2.2.4 Reaktion auf Paraquat 68
4.2.2.5 Quantitative Real-time-PCR-Analysen 69
4.2.3 Morphologisch-anatomische Untersuchungen 70
4.2.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen 70
4.2.4 Zusammenfassung *rimb1* 71
4.3 Die Mutante *rimb6* 72
4.3.1 Ergebnisse der Kartierung 72
4.3.1.1 Sequenzierungen 72
4.3.1.2 T-DNA Linien 73
4.3.2 Phänotypisch-physiologische Untersuchungen 74
4.3.2.1 Analyse des Rosettendurchmessers 74
4.3.2.2 Analyse der Wurzelstrukturen 74
4.3.2.3 Chlorophyllgehalt 75
4.3.2.4 Reaktion auf Jasmonsäure 76
4.3.2.5 Reaktion auf Salicylsäure 76
4.3.2.6 Variation des Nährstoffgehalts 76
4.3.2.7 Quantitative Real-time-PCR-Analysen 79
4.3.3 Mikroskopische Untersuchungen 79

4.3.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen 79
4.3.3.2 Lichtmikroskopische und konfokalmikroskopische Untersuchungen 80
4.3.4 Zusammenfassung *rimb6* 80
4.4 Ausblick 81

5. ZUSAMMENFASSUNG 82

5.1 Zusammenfassung 82
5.2 Summary 83

6. ANHANG 84

6.1 Verwendete Chemikalien 84
6.2 Oligonukleotid-Primer 87
6.3 Plasmide 95
6.4 T-DNA Linien 97
6.5 Literaturverzeichnis 99
6.6 Elektronische Quellen 113
6.7 Danksagung 114
6.8 Lebenslauf 115
6.9 Erklärung 116

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APX	Ascorbatperoxidase
As.	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Künstliches Bakterienchromosom
bp	Basenpaar(e)
2-Cys-Prx A; 2-CPA	2-Cys-Peroxiredoxin A [At3g11630]
CEO1	*Clone Eighty One1* (= RCD1) [At1g32230]
cm	Zentimeter
Col	*Arabidopsis thaliana* , Ökotyp Columbia
deion.	deionisiert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpi	Punkte pro 2,54 cm (*Dots per inch)*
g	Erdbeschleunigung [m/sek^2]
Gpx	Glutathionperoxidase
Grx	Glutaredoxin
h	Stunde(n)
k	kilo
k.o.	*knock out*, ausgeschaltet
L	Liter
L*er*	*Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Landesberg *erecta*
m	Meter
max.	maximal
Mg-Proto IX	Magnesium-Protoporphyrin IX
min	Minute(n)
mind.	mindestens
mL	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde(n)
µE	µmol Photonen · m^{-2} · s^{-1}
n	Probenanzahl (pro Ansatz)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

ng	Nanogramm [10^{-9} g]
nm	Nanometer [10^{-9} m]
PCR	Polymerasekettenreaktion
Prx	Peroxiredoxin
PS I; -II	Photosystem I; -II
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RCD1	*Radical-Induced Cell Death1* (= CEO1) [At1g32230]
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (***r**eactive **o**xygen **s**pecies*)
rpm	Umdrehungen pro Minute (***r**evolutions **p**er **m**inute*)
s	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TAQ	*Thermus aquaticus* DNA-Polymerase
T_m	Schmelztemperatur
Trx	Thioredoxin
u.a.	unter anderem
v/v	Volumen pro Volumen (***v**olume per **v**olume*)
w/v	Gewicht pro Volumen (***w**eight per **v**olume*)
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Aminosäuren wurden entsprechend den IUPAC-IUB Empfehlungen als Drei-Buchstaben-Code oder als Ein-Buchstaben-Code abgekürzt. Die Nukleinsäuren wurden ebenfalls nach den IUPAC-IUB Empfehlungen abgekürzt.

aus dem Institut für Botanik
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. M. Baier
Koreferent: Prof. Dr. J. Zeier

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2012

1. EINLEITUNG

1.1 Biotischer und abiotischer Stress

Aufgrund ihrer meist sessilen Lebensweise sind Pflanzen ungünstigen Bedingungen und Lebensräumen ausgesetzt, ohne diesen entkommen zu können. Einige dieser Faktoren sind biotischen Ursprungs wie z.B. Pathogene und Parasiten; andere haben abiotische Ursachen wie die Verfügbarkeit von Nährstoffen, die Wasserverfügbarkeit oder auch die Intensität des Lichts (siehe Abb. 1.1).

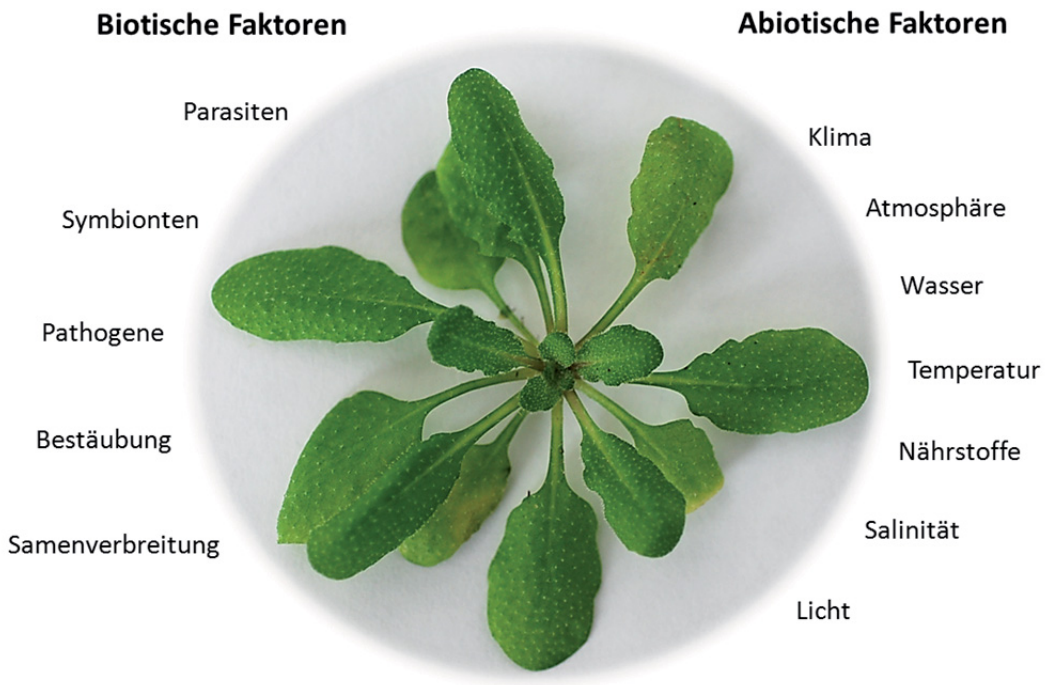


Abb. 1.1: Biotische und abiotische Faktoren, die Effekte auf Pflanzen haben.

Für fast alle diese Probleme haben Pflanzen im Laufe der Evolution ein breites Spektrum unterschiedlicher Mechanismen entwickelt, diese negativen Faktoren und Bedingungen zu kompensieren oder zu minimieren. Die negativen Auswirkungen von oxidativem Stress durch zu viel Energie in Form von Licht (Photonen) und die damit verbundenen Kompensationsmechanismen, insbesondere in den Chloroplasten, sind Gegenstand intensiver Untersuchungen.

1.2 Oxidativer Stress

Durch einen Überschuss an Photonen entstehen in den Chloroplasten während der Photosynthese verstärkt reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) wie das Hydroxylradikal [$OH^{\bullet}$], Singulettsauerstoff [$^1O_2$], Superoxid [$O_2^{\bullet -}$] und Wasserstoffperoxid [H_2O_2] (Apel & Hirt 2004), welche aufgrund ihrer starken Reaktivität und dem damit einhergehenden Oxidationspotential Schäden an DNA, Proteinen und Lipiden bewirken können (Halliwell & Gutteridge

1990). Superoxid wird hierbei durch verschiedene Superoxid-Dismutasen (SODs) in das weniger reaktive Wasserstoffperoxid umgewandelt (Fridovich 1974, Grene Alscher et al. 2002), welches aufgrund seiner Eigenschaft als ROS in nachgeschalteten Stoffwechselwegen entgiftet werden muss (Foyer & Noctor 2009). In hohen Konzentrationen kann H_2O_2 eine letale Wirkung auf die Zelle haben (Bethke & Jones 2001), wird aber auch bei Befall durch Pathogene oder Parasiten gezielt induziert, um diese zu bekämpfen und befallene Zellareale mittels regulierten Zelltods zu eliminieren (Levine et al. 1994). Auch wird H_2O_2 als Signalagens gebildet, u.a. als Reaktion auf Verwundung, Hitze, Ozon und ultraviolette Bestrahlung (Bolwell 1999, Orozco-Cárdenas et al. 2001, Rao & Davis 2001). Dieses gebildete H_2O_2 muss aber, wie das während der Photosynthese gebildete Wasserstoffperoxid, in eine unschädliche Form metabolisiert werden.

1.3 Antioxidatives Schutzsystem

Pflanzen haben mehrere Möglichkeiten, das potentiell schädliche H_2O_2 zu entgiften. Am bekanntesten ist die enzymatische Entgiftung über Katalasen und Peroxidasen. Neben diesen enzymatisch katalysierten Reaktionen treten weitere Mechanismen auf: einerseits durch unspezifische niedermolekulare Antioxidantien wie Glutathion, Ascorbat, α-Tocopherol und Carotinoide (Xanthophyll-Zyklus), aber auch andere enzymatische Stoffwechselwege, insbesondere über den Ascorbat abhängigen „*Water-Water-Cycle*“ (Asada 1992) und über den Ascorbat unabhängigen „*Water-Water-Cycle*“ mittels Peroxiredoxinen und Glutathionperoxidasen (König et al. 2002, Dietz et al. 2002).

1.3.1 Niedermolekulare Antioxidantien

Das wasserlösliche Reduktionsmittel Ascorbat hat entscheidende Funktionen in Kombination mit anderen Antioxidantien wie α-Tocopherol und Zeaxanthin, für deren Regeneration es verantwortlich ist (Smirnoff 2000). Auch ist es im Ascorbat abhängigen „*Water-Water-Cycle*“ bei der Degradation von ROS durch Ascorbatperoxidasen (APX) entscheidender Co-Faktor (Asada 1999). Ascorbat kann ROS degradieren, indem sich die Endiol Struktur (Abb. 1.3.1.I, rot markiert) zu einem Diketon umlagert und dabei Elektronen auf ROS überträgt (Conklin et al. 1996, Frei et al. 1989, Buettner 1993). Es entsteht Monodehydroascorbat, welches durch die Monodehydroascorbatreduktase (Leterrier et al. 2005), unter Verbrauch von NADPH, b-Typ Cytochrom oder

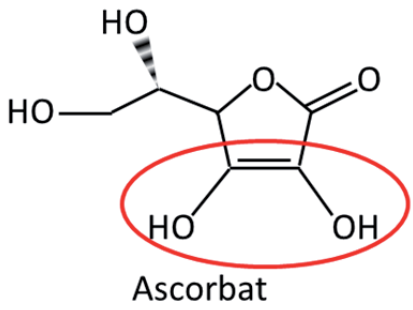


Abb. 1.3.1.I: Strukturformel des Ascorbat, mit rot markierter reaktiver Seitengruppe

reduziertem Ferredoxin, zu Ascorbat regeneriert wird (Noctor & Foyer 1998). Entstehendes Dehydroascorbat, welches aus Monodehydroascorbat entstehen kann, wird durch die Dehydroascorbatreduktase, unter Verbrauch von Glutathion, zu Ascorbat regeneriert (Foyer & Halliwell 1976).

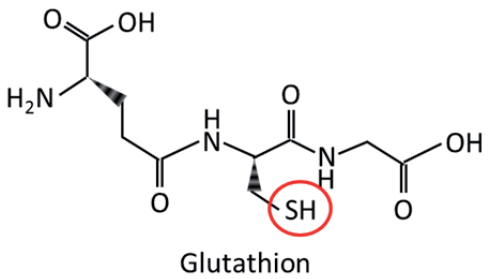


Abb. 1.3.1.II: Strukturformel des Glutathion, welches mit der rot markierten G-SH Seitengruppe reagiert.

Glutathion [G-SH] wirkt als Antioxidans über seine Thiol Seitengruppe (Abb. 1.3.1.II, rot markiert), welche sich durch Oxidation mit einer weiteren Glutathion-SH-Gruppe zu einem Disulfid verbindet [G-S-S-G] (Sies 1999). Im Metabolismus wird es aus verschiedenen Aminosäuren gebildet und kommt in fast allen tierischen und pflanzlichen Zellen vor (Hopkins 1921, Noctor et al. 1998). Eine besondere Bedeutung hat Glutathion im Ascorbat abhängigen *„Water-Water-Cycle“*, da dort Dehydroascorbat durch die Dehydroascorbatreduktase, unter Umsetzung von reduziertem Glutathion zu oxidiertem Glutathion, zu Ascorbat reduziert wird (Foyer & Halliwell 1976, Noctor & Foyer 1998). Oxidiertes Glutathion wird durch die Glutathionreduktase, unter Verbrauch von NADPH, wieder reduziert (Foyer & Halliwell 1976). Weiterhin kommt es als Reduktionsmittel im „Glutathion-Peroxidase Zyklus“ zum Einsatz (Drotar et al. 1985, Beeor-Tzahar et al. 1995, Apel & Hirt 2004). Ascorbat und Glutathion bilden im pflanzlichen Metabolismus die wichtigsten und höchst konzentrierten niedermolekularen Antioxidantien.

α-Tocopherol ist die Hauptkomponente des in der Chloroplastenhülle, sowie in der Thylakoidmembran vorkommenden, antioxidativ wirkenden, lipophilen Vitamin E Komplexes (Munné-Bosch 2005, Abb. 1.3.1.III) und deaktiviert insbesondere die reaktiven Sauerstoffspezies Superoxid und Singulettsauerstoff, welche bevorzugt Lipide peroxidieren und weitere oxidative Schäden verursachen (Sattler et al. 2004). Insbesondere Singulettsauerstoff wird mittels α-Tocopherol durch Resonanzenergietransfer gequencht (Fahrenholzt et al. 1974), resultierend in einer finalen Inaktivierung durch Bildung von α-Tocopherol-Quinonen (Fragata & Bellemare 1980, Munné-Bosch 2005). Lipidperoxylradikale werden von α-Tocopherol zu Lipidhydroperoxiden unter Bildung eines Tocopheroxyl-Radikals deaktiviert, welches wiederum unter Verbrauch reduzierten Ascorbats via α-Tocopherol-Hydrochinon zu α-Tocopherol regeneriert wird. Die protektive Wirkung von α-Tocopherol gegen ROS ist meist im Zusammenspiel mit weiteren antioxidativen Mechanismen festzustellen (Kanwischer et al. 2005).

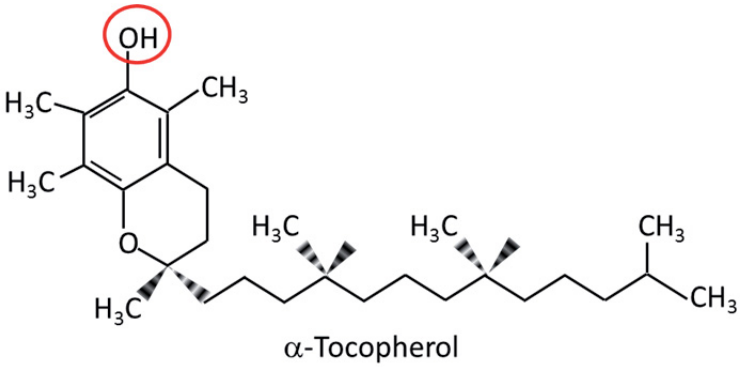


Abb.1.3.1.III: Strukturformel des α-Tocopherol mit rot markierter reaktiver R-OH Seitengruppe.

Im Xanthophyll-Zyklus wird Violaxanthin über Antheraxanthin zu Zeaxanthin deepoxidiert (Demmig-Adams & Adams 1996, Yamamoto 1979), indem sich die markierten Doppelbindungen von einem Epoxidring unter Verbrauch von Protonen und reduziertem Ascorbat bilden (Abb. 1.3.1.IV). Dieser photoprotektive Reaktionsmechanismus dient u.a. dazu, Singulettsauerstoff zu quenchen, um insbesondere Schäden an den Membranen durch Lipidperoxidationen zu vermeiden. Diese führen häufig zum Absterben der betroffenen Zellen (Sarry et al. 1994, Havaux & Niyogi 1999).

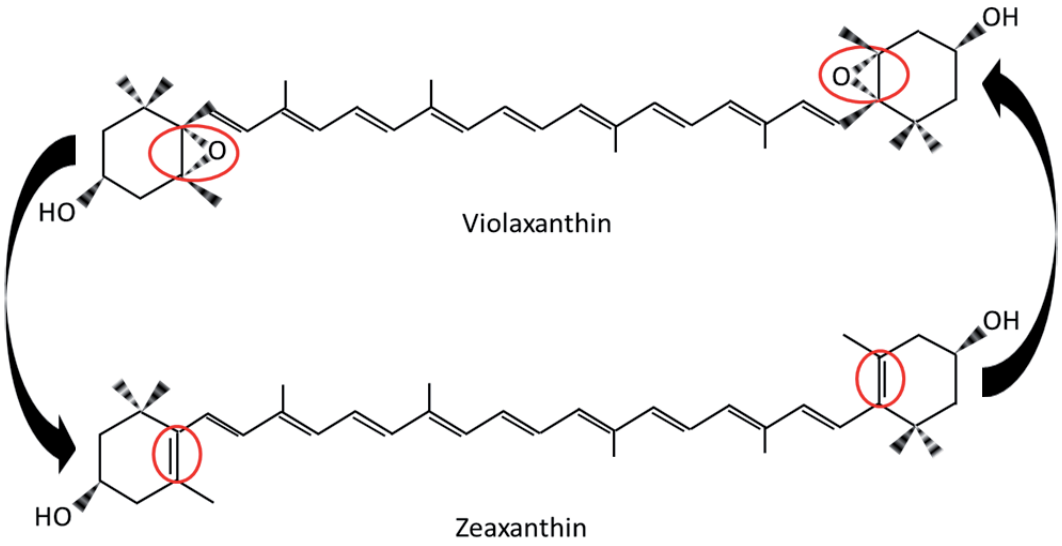


Abb. 1.3.1.IV: Violaxanthin-Zeaxanthin-Zyklus mit rot markierten reaktiven Gruppen.

Die niedermolekularen Antioxidantien in tierischen als auch pflanzlichen Zellen nehmen eine wichtige Funktion in der Stabilisierung des Redoxgleichgewichts ein und besitzen bedeutende Kapazitäten zum Puffern von Redoxungleichgewichten, wie sie durch das Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies ausgelöst werden können. Auch im Zusammenspiel mit den enzymatischen Systemen zur Degradierung von ROS (mit Ausnahme der Peroxiredoxine) kommt ihnen eine wesentliche Aufgabe zu.

1.3.2 Enzymatische Systeme der ROS Degradierung

Die enzymatischen Systeme der ROS Degradierung sind vielfältig und teilweise redundant. Sie gliedern sich in mehrere grundlegende Reaktionsmechanismen, welche vor allem durch die Enzyme, die damit verbundenen Co-Faktoren und die Lokalisation der Enzymreaktion charakterisiert sind. Die wichtigsten enzymatischen Reaktionswege laufen in den Chloroplasten über Ascorbatperoxidasen (APX) (Nakano & Asada 1981) und Peroxiredoxine (Prx) (Horling et al. 2002). Thioredoxine (Trx) (Gelhaye et al. 2005) und Glutaredoxine (Grx) (Morell et al. 1995) regenerieren als Oxidoreduktasen oxidierte Peroxiredoxine in nachgeschalteten katalytischen Reaktionen (König et al. 2002, Rouhier et al. 2002, Tanaka et al. 2002). Über Katalasen erfolgt die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser meist in den Peroxisomen (Frederick & Newcomb 1969); Katalasen benötigen im Gegensatz zu Peroxidasen keine Reduktionsmittel. Glutathionperoxidasen reduzieren H_2O_2, Lipidhydroperoxide und organische Hydroperoxide zum korrespondierenden Alkohol unter Glutathionverbrauch, welcher als Elektronendonor dient (Ursini et al. 1995) und verhindern so oxidative Schäden (Flohé et al. 1976). Da sich diese Arbeit auf die retrograde Kommunikation zwischen Chloroplasten und Nukleus unter oxidativem Stress fokussiert, werden aufgrund der Lokalisation in den Chloroplasten insbesondere der Ascorbat abhängige „*Water-Water-Cycle*“ und der Ascorbat unabhängige „*Water-Water-Cycle*“ beschrieben, da die weiteren enzymatischen Systeme der ROS Degradierung vor allem in anderen Zellkompartimenten lokalisiert sind (siehe Abb. 1.3.2).

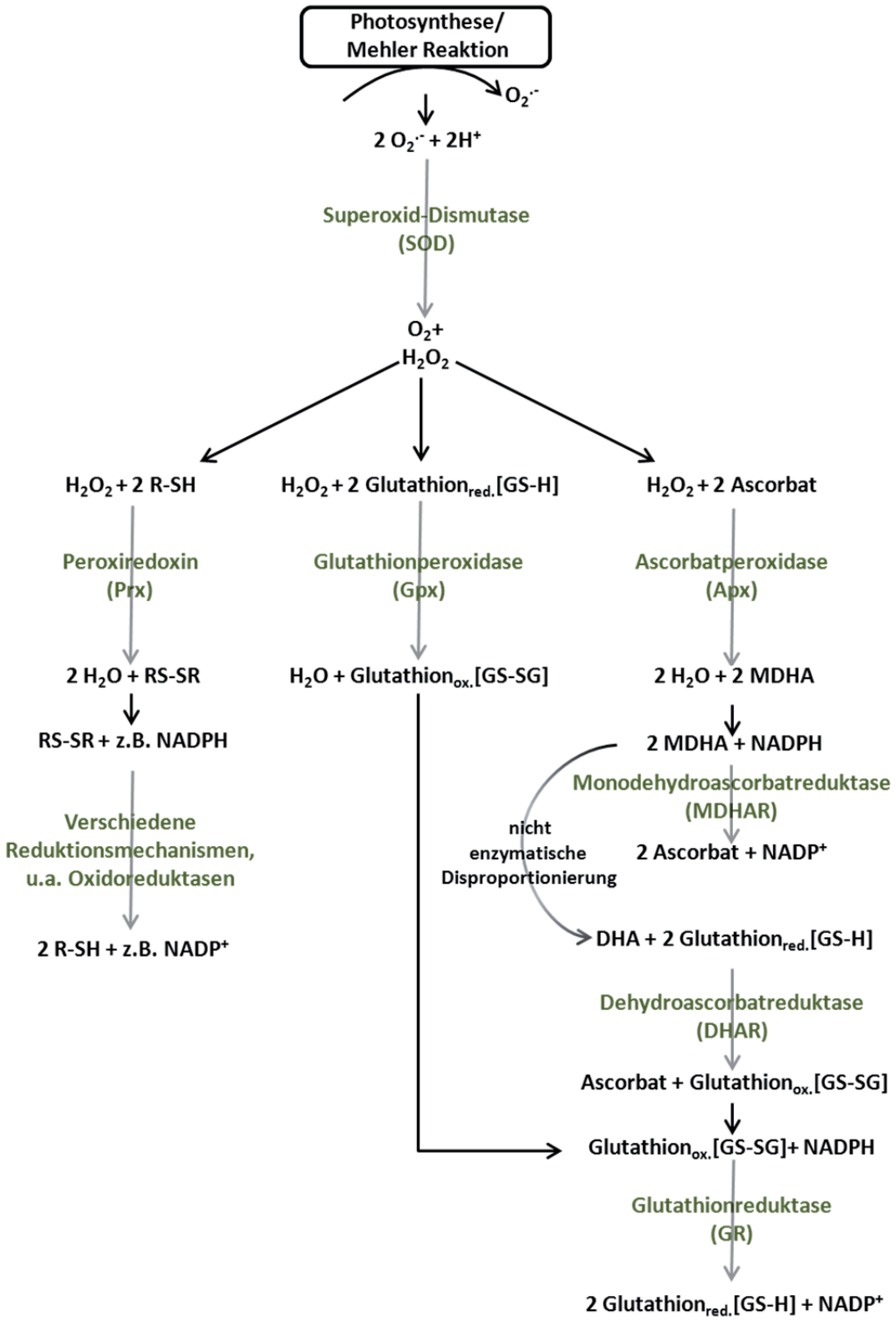


Abb. 1.3.2: Die wichtigsten Reaktionswege zum Abbau reaktiver Sauerstoffspezies, welche u.a. in der Mehler-Reaktion während der Photosynthese entstehen können. Die Superoxid-Dismutase setzt Superoxidanionen [$O_2^{\cdot -}$] zu Wasserstoffperoxid [H_2O_2] um, welches im Ascorbat unabhängigen *„Water-Water-Cycle“* über Peroxiredoxine, durch Glutathionperoxidasen oder im Ascorbat abhängigen *„Water-Water-Cycle“* zu Wasser unter Oxidation von NADPH umgesetzt wird. MDHA - Monodehydroascorbat; DHA - Dehydroascorbat.

1.3.2.1 Ascorbat abhängiger „*Water-Water-Cycle*“

Die während der Photosynthese in der „Mehler-Reaktion“ (Mehler 1951) entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies werden in den Chloroplasten insbesondere durch den Ascorbat abhängigen „*Water-Water-Cycle*“ unter Verbrauch von Ascorbat und NADPH zu Wasser und $NADP^+$ umgesetzt. Die hierbei hervortretenden Enzyme sind die Ascorbatperoxidase (APX) und die zur Regenerierung des Ascorbats nötige, nachgeschaltete Monodehydroascorbatreduktase (MDHAR) (Asada 2006). Im „*Water-Water-Cycle*“ wird somit Wasser an PS II als Elektronendonor zu reaktiven Sauerstoffspezies umgesetzt, welche durch Elektronenübertragung aus Ascorbat wieder Wasser bilden (Asada 1999).

Mehler stellte fest, dass Sauerstoff im nicht zyklischen Elektronentransport als Elektronenakzeptor dient und dadurch Superoxid entstehen kann, welches hoch reaktiv ist (Mehler 1951, Asada et al. 1974). Dieses wird durch die Superoxiddismutase (SOD) in Wasserstoffperoxid umgesetzt (McCord & Fridovich 1969) und das Superoxid somit in eine weniger reaktive Form der ROS metabolisiert. Da das entstehende H_2O_2 ebenso zu den ROS zählt, muss dieses weiter degradiert werden. Dies geschieht in den Chlorplasten vor allem durch den „Ascorbat abhängigen Wasser-Wasser Zyklus“ (*ascorbate dependent water-water-cycle*) (Asada 1999), welcher auch als „*Halliwell-Asada-Cycle*“ bezeichnet wird. Durch die Ascorbatperoxidase wird H_2O_2 unter Verbrauch von Ascorbat, welches als Reduktionsäquivalent dient, zu Wasser und Monodehydroascorbat (MDHA) umgesetzt (Kelly & Latzko 1979). Um das MDHA in den reduzierten Zustand zurück zu versetzen, wird es von der Monodehydroascorbatreduktase (Hossain et al. 1984) unter Verbrauch von NADPH regeneriert. Durch die spontane, nicht enzymatische Disproportionierung des chemisch instabilen MDHA bildet sich Ascorbat und Dehydroascorbat (DHA), welches die vollständig oxidierte Form des Ascorbat darstellt. Das DHA muss reduziert und zu Ascorbat regeneriert werden; diese Reaktion wird von der Dehydroascorbatreduktase (DHAR) unter Verbrauch von reduziertem Glutathion katalysiert (Hossain & Asada 1984). Um das nun oxidierte Glutathion wieder zu regenerieren, ist erneut eine enzymatische Katalyse durch die Glutathionreduktase (GR) nötig: unter Verbrauch von NADPH wird das oxidierte Glutathion reduziert (Foyer & Halliwell 1976, Schaedle & Bassham 1977).

Zusammenfassend bedeutet dies, dass Superoxid unter Verbrauch des Reduktionsäquivalents NADPH über Wasserstoffperoxid zu Wasser umgesetzt wird, allerdings unter Umsetzung der essentiellen Co-Faktoren Ascorbat und Glutathion. Diese Co-Faktoren werden in nachgeschalteten Enzymreaktionen regeneriert, um im reduzierten Zustand erneut als Elektronendonoren zur Verfügung zu stehen.

1.3.2.2 Ascorbat unabhängiger „*Water-Water-Cycle*“

Im Ascorbat unabhängigen Wasser-Wasser-Zyklus (*ascorbate independent water-water-cycle*) erfolgt die Umsetzung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid wie im „*Halliwell-Asada-Cycle*“ durch die Superoxid-Dismutase (McCord & Fridovich 1969). Das entstehende H_2O_2 wird in diesem metabolischen Weg durch Peroxiredoxine (Prx) zu Wasser und oxidiertem Thiol umgesetzt (Baier & Dietz 1997, Baier & Dietz 1999), welches in einer nachgeschalteten Reaktion, meist durch Oxidoreduktasen wie Thioredoxine, wieder reduziert werden muss (König et al. 2002).

Peroxiredoxine kommen sowohl in Tieren als auch in Pflanzen und Mikroorganismen vor (Hofmann et al. 2002) und zeigen eine breite Substratspezifität (Lim et al. 1993, König et al. 2002). In *Arabidopsis thaliana* sind zehn „*open reading frames*“ für Peroxiredoxine annotiert, welche sich in vier Subklassen gliedern: 1-Cys-Prx lokalisiert im Nukleus; 2-Cys-Prx sind in den Chloroplasten lokalisiert; PrxQ lokalisiert in den Chloroplasten und Typ II-Peroxiredoxine sind in Cytosol, Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert (Horling et al. 2002, Dietz 2003). Alle Peroxiredoxine sind im Zellkern kodiert, aber in Chloroplasten, Mitochondrien oder Cytosol lokalisiert (Emanuelsson et al. 2000, *TAIR*). Das 2-Cys-Prx A ist, u.a. aufgrund seiner hohen Homologie zum bakteriellen *ahpC* aus *Salmonella typhimurium* (Poole & Ellis 1996, siehe Abb. 1.3.2.2.I), das am besten untersuchte 2-Cys-Peroxiredoxin. Pflanzliche Homologe wurden zunächst in *Hordeum vulgare*, *Spinacia oleracea* (Baier & Dietz 1996), *Arabidopsis thaliana* (Baier & Dietz 1997) und *Secale cereale* (Berberich et al. 1998) als *bas1* cDNA nachgewiesen und untersucht.

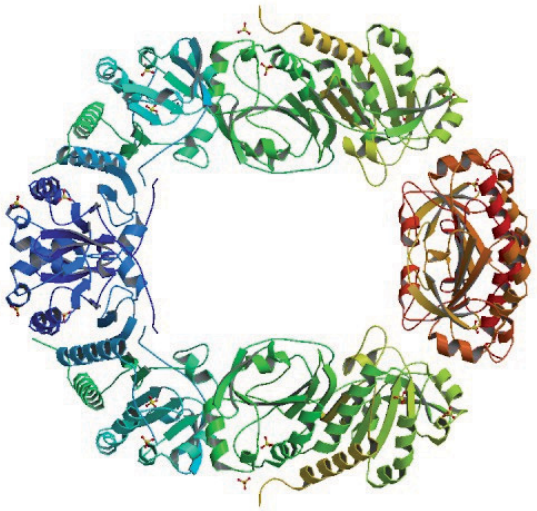


Abb. 1.3.2.2.I: Quartärstruktur des zu 2-Cys-Prx A aus *Arabidopsis thaliana* mehr als 75% homologen 2-Cys-Prx AhpC aus *Salmonella typhimurium* [1YEP; *RCSB-Protein Data Bank*] (Parsonage et al. 2005). Die Proteinstruktur wird von Dimeren gebildet, welche sich redoxabhängig zu einer dekameren Quartärstruktur verbinden (Schröder et al. 2000, König et al. 2003). An der degradierenden Reaktion von R-OOH zum korrespondierenden Alkohol R-OH + H_2O sind zwei Cysteine beteiligt, welche nach Abspaltung des Wassermoleküls in oxidierter Form als Disulfid vorliegen (Baier & Dietz 1997, Dietz et al. 2002).

Die H_2O_2 degradierende Reaktion von 2-Cys-Prx A wird in *Arabidopsis thaliana* mittels der Cysteine 119 und 241 katalysiert, welche die folgende Reaktion katalysieren:

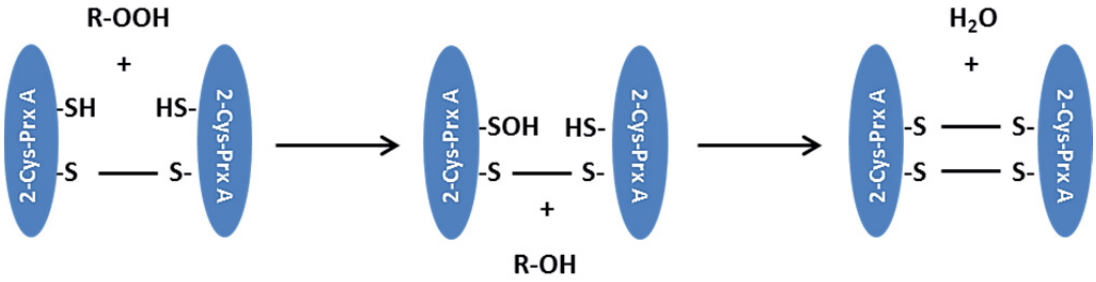


Abb. 1.3.2.2.II: Von 2-Cys-Prx A katalysierte Reaktion. R-OOH: H_2O_2 oder (Alkyl)hydroperoxid, -SH: reaktives Thiol der Cysteine; es entsteht der korrespondierende Alkohol unter Übertragung des Sauerstoffatoms auf die Thiolgruppe des Enzyms. Unter Abspaltung von Wasser bildet sich eine Dithiolbindung, welche intra- oder intermolekular sein kann (Seo et al. 2000, Dietz 2003, Baier & Dietz 1996, Baier & Dietz 1997).

Das oxidierte Dithiol muss in einer anschließenden Reaktion wieder reduziert werden. Diese Reaktion kann durch Oxidoreduktasen, meistens Thioredoxine oder Glutaredoxine, katalysiert werden und versetzt das Peroxiredoxin durch Protonierung und Elektronenübertragung in den Ausgangszustand (König et al. 2002, Rouhier et al. 2002, Dietz 2003).

1.3.2.3 Thioredoxine und Glutaredoxine

Thioredoxine (Trx) und Glutaredoxine (Grx) sind Oxidoreduktasen, welche katalytisch als Protonen- und Elektronendonoren oxidierte Peroxiredoxine wieder in einen reduzierten Zustand versetzen (Rouhier et al. 2002), dabei aber selbst oxidiert werden und eine intramolekulare Disulfidbindung bilden.

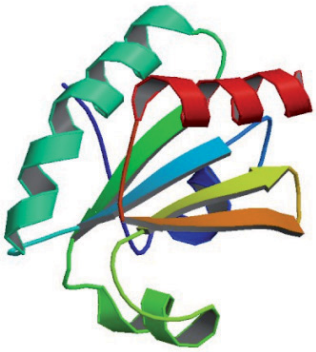


Abb. 1.3.2.3.I (linke Abb.): Thioredoxin Kristallstruktur aus *Spinacia oleracea* Chloroplasten (reduzierte Form) [1FB0] (Capitani et al. 2000). Zu erkennen ist der *„thioredoxin fold“* aus vier antiparallelen β-Faltblättern und drei α-Helices. Die Bindung des Substrats erfolgt im Spalt zwischen grüner α-Helix und grünem β-Faltblatt.

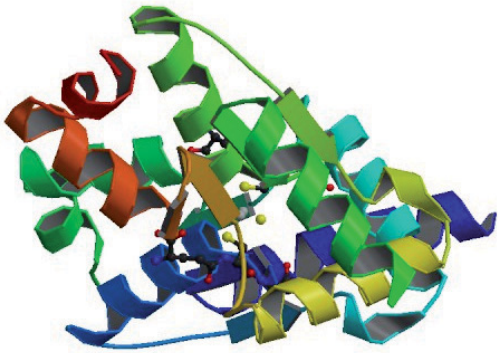


Abb. 1.3.2.3.II (rechte Abb.): Holoenzymatische Kristallstruktur des Glutaredoxin C5 aus *Arabidopsis thaliana* [3RHC] (Couturier et al. 2011). Gezeigt ist die Quartärstruktur mit dem Co-Faktor Glutathion in Verbindung zweier Glutaredoxin C5 Moleküle.

Das Thioredoxin-System, welches die nachgeschaltete enzymatische Reduktion und Regeneration der durch Elektronenabgabe an H_2O_2 oder R-OOH oxidierten Peroxiredoxine katalysieren kann, setzt sich aus Thioredoxin, NADPH + H^+ und der Thioredoxin-Reduktase zusammen (Holmgren 1989, Buchanan et al. 1994). Thioredoxine sind kleine Proteine von ca. 12 kDa Größe mit zwei aktiven Cysteinen, die im reduzierten Zustand als R-SH Gruppen vorliegen und u.a. folgende Reaktion katalysieren:

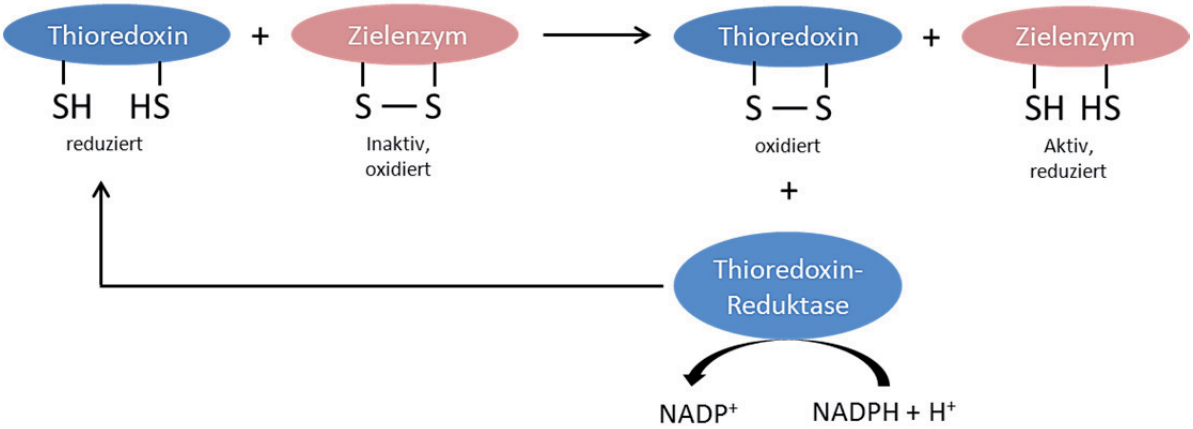


Abb. 1.3.2.3.III: Vereinfachtes Thioredoxin-System. Vereinfachtes Schema der Reduktion oxidierter Enzyme wie Peroxiredoxine durch das Thioredoxin-System, bestehend aus Thioredoxin, der Thioredoxin-Reduktase und NADPH + H^+.

Das reduzierte Thioredoxin ist Donor für Reduktionsäquivalente an das Zielenzym (z.B. 2-Cys-Prx A) und wird dabei selbst oxidiert; das Zielenzym liegt nach der Reaktion wieder in aktiver, reduzierter Form vor. Das oxidierte Thioredoxin wird in einer nachfolgenden Reaktion von der Thioredoxin-Reduktase unter Verbrauch von NADPH wieder in den reduzierten Ausgangszustand versetzt (Buchanan et al. 1994, Holmgren 1989). Thioredoxine kommen auch im Ferredoxin/Thioredoxin-System zum Einsatz, welches in die lichtgesteuerte Enzymregulation der oxygenen Photosynthese eingreift (Droux et al. 1987, Scheibe 1994).

Das Glutaredoxin-System setzt sich aus Glutathion, Glutaredoxin, Glutathion-Reduktase und NADPH + H^+ zusammen. Glutaredoxine sind ca. 10-15 kDa große Enzyme, welche ähnlich den Thioredoxinen die Reduktion oxidierter Peroxiredoxine katalysieren (Rouhier et al. 2001, Bréhélin et al. 2003) und in *Arabidopsis thaliana* mit 31 Genen vertreten sind. Die Reaktion wird dabei mittels der charakteristischen Aminosäuresequenz R-C-x-x-C-R katalysiert, wobei die Cysteine Protonen als Reduktionsäquivalente an oxidierte Peroxiredoxine übertragen und dabei analog zu den Thioredoxinen ein intramolekulares Dithiol bilden, welches durch Glutathion wieder gespalten wird (Rouhier et al. 2008). Das Glutathion wiederum wird durch die Glutathion-Reduktase unter Verbrauch von NADPH + H^+ regeneriert (siehe Abb. 1.3.2.3.IV).

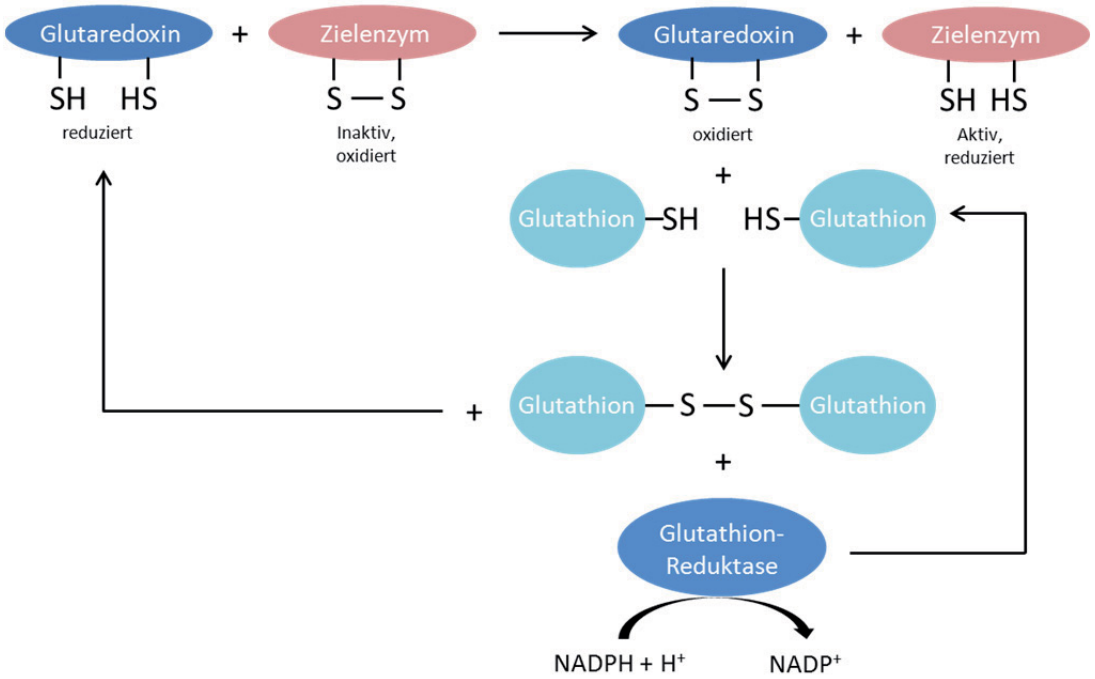


Abb. 1.3.2.3.IV: Vereinfachtes Glutaredoxin-System. Besonderheiten der Katalyse, wie Glutaredoxine mit nur einem aktiven Cystein, werden der Übersichtlichkeit halber nicht gezeigt.

Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse ist bisher ungeklärt, inwieweit sich Thioredoxin- und Glutaredoxin-Systeme beeinflussen (Rouhier et al. 2004, Trotter & Grant 2003, Kanzok et al. 2001); beide Systeme sind in der Lage, oxidierte Peroxiredoxine zu regenerieren und so zur Aufrechterhaltung des intrazellularen Redoxgleichgewichts einen bedeutenden Beitrag zu leisten.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass aufgrund der starken Kongruenz der verschiedenen Systeme zur Detoxifikation und Degradation von reaktiven Sauerstoffspezies eine Überlagerung und teilweise Kompensation der einzelnen Mechanismen vorliegt. Dies unterstreicht die Bedeutung eines ausgeglichenen Redoxstatus für Zelle und Kompartimente, insbesondere für die Chloroplasten.

1.4 Chloroplasten-Zellkern Signaltransduktion und *2-Cys-Prx A* Genexpression

Eine retrograde Chloroplasten-Zellkern-Kommunikation muss stattfinden, da alle antioxidativ wirkenden Enzyme im Zellkern kodiert sind, die Hauptquelle der ROS Entstehung aber in den Chloroplasten zu finden ist (Baier & Dietz 2005). In oxidativem Stress ausgesetzten Mitochondrien menschlicher Zellen konnte phosphorylierte „Protein Kinase D“ als Signalmolekül der retrograden Mitochondrien-Nukleus-Kommunikation identifiziert werden (Storz et al. 2005). Für Magnesium-Protoporhyrin IX, reaktive Sauerstoffspezies, den Redoxzustand des Plastoquinons und den Redoxstatus niedermolekularer Antioxidantien sind Signalwege der retrograden Chlo-

roplasten-Nukleus-Kommunikation postuliert (Pfannschmidt et al. 2001, Foyer und Noctor 2005, Apel und Hirt 2004). Für die retrograde Chloroplasten-Nukleus-Signaltransduktion unter oxidativem Stress dagegen ist bisher wenig bekannt (Pfannschmidt et al. 2003, Pesaresi et al. 2007); für die Peroxiredoxine konnte der Transkriptionsfaktor Rap2.4a (At1g36060) identifiziert werden, der induzierend an den *2-Cys-Prx A* Promotor (At3g11630) bindet und für den eine Einbindung in einen retrograden Signaltransduktionsweg postuliert wird (Shaikhali 2006, Shaikhali et al. 2008).

1.4.1 Magnesium-Protoporphyrin IX Signaltransduktion

Wichtige Gene der Chloroplasten-Zellkern Kommunikation konnten mit den *gun*-Mutanten (***g**enomes **un**coupled*) identifiziert werden, für die eine retrograde Signaltransduktion postuliert ist. Vor ein GUS-Reportergen (β–Glucuronidase) wurde der *CAB3*-Promotor (*chlorophyll a/b binding protein*) kloniert und die Pflanzen mittels Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS) mutagenisiert. Anschließend wurden die Pflanzen auf Norflurazon, welches die Entwicklung der Chloroplasten durch Störung der Carotinoid Biosynthese hemmt, angezogen und auf einen GUS-Phänotyp selektiert (Susek et al. 1993). Es konnten mehrere Gene, die in die Magnesium-Protoporphyrin IX Synthese (Mg-Proto IX) eingebundenen sind, identifiziert werden (Strand et al. 2003). Dem wurde von Mochizuki et al. (2008) und Moulin et al. (2008) widersprochen, so dass unklar ist, ob Mg-ProtoIX wirklich in die retrograde Signaltransduktion involviert ist. Inzwischen wurde festgestellt, dass das „*Plastidensignaling*“ entwicklungsabhängig reguliert ist (Kakizaki et al. 2010). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das Alter der verwendeten Pflanzen einen bedeutenden Einfluss auf die Messergebnisse hat. Da die Messungen der Reportergenaktivität mit Keimlingen erfolgte (Susek et al. 1993), kann davon ausgegangen werden, dass Mg-Proto IX insbesondere in jüngeren Pflanzen ein Signal der retrograden Kommunikation ist.

1.4.2 Signaltransduktion durch Intersystemsignale

Plastoquinone dienen in der Photosynthese dem Elektronentransport von Photosystem II zu Photosystem I und sind durch die Aufnahme und Abgabe von Elektronen einem permanenten Reduktions- und Oxidationszyklus unterworfen (Heldt 2003). Der Oxidationsstatus des Plastoquinonpools (PQ) reguliert die Transkriptspiegel der Ascorbatperoxidasen und der *LHCB* (*Light harvesting complex of PS II*) als Redoxsensor (Karpinski et al. 1997). Mittels Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch eine Kinase wird die Expression der *CAB*-Gene in *Dunaliella tertiolecta* reguliert (Escoubas et al. 1995); Ascorbatperoxidasen werden unter reduzierenden Bedingungen hoch-, die *LHCB*-Gene herunterreguliert (Karpinski et al. 1997), wie mit den Elekt-

ronentransport entkoppelnden Chemikalien Hydroxilamin, DCMU, Methylamin/CCPC und DBMIB gezeigt werden konnte. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der am Elektronentransport der Photosynthese beteiligte Plastoquinonpool vor allem über die Transkriptionskontrolle der Ascorbatperoxidasen oxidativen Schäden durch zu viel Licht („*excess light*“) und der damit verbundenen Entstehung von H_2O_2 entgegenwirkt (Karpinski et al. 1997).

Mittels der Kinasen STN7 und STN8 (Pesaresi et al. 2011) konnte gezeigt werden, dass die Akklimation zwischen den Photosystemen durch Phosphorylierung reguliert wird und einen direkten Einfluss auf die Transkriptspiegel photosynthetisch aktiver Enzyme wie *LHCB2.1* hat (Bonardi et al. 2005).

1.4.3 Akzeptorverfügbarkeit an Photosystem I

Während der Photosynthese werden durch Lichteinstrahlung Elektronen von Photosystem II via Plastoquinon und Cyt b_6f zu Photosystem I transportiert, via Ferredoxin auf $NADP^+$ übertragen und so Reduktionsäquivalente in Form von NADPH geschaffen (Heldt 2003). Da die Anregung der Photosysteme durch unterschiedliche Wellenlängen und Absorptionsmaxima erfolgt und der Elektronentransport von den einzelnen Komponenten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit katalysiert wird, kann es zu Ungleichgewichten im Elektronenfluss zwischen den Photosystemen kommen, die zur Bildung von ROS führen können (Halliwell 1987). Die Akzeptorverfügbarkeit des NADPH/$NADP^+$ Systems am Photosystem I ist daher ein weiterer Signaltransduktionsmechanismus, da bei ungenügend vorhandenem $NADP^+$ ein „Elektronenstau“ entstehen kann, dem die Pflanze entgegenwirken muss. Dies geschieht mittels der Ferredoxin:Thioredoxin Reduktase (FTR), die u.a. die Bildung von NADPH durch Reduktion des Ferredoxin katalysiert und das photosynthetische Elektronentransportsignal des Photosystem I in ein Thiolsignal umwandelt. Das Thioredoxin greift u.a. in die Aktivität der NADP-abhängigen Malatdehydrogenase ein und reguliert so den Calvin-Zyklus (Schürmann & Jacquot 2000).

1.4.4 Signaltransduktion durch reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies können als Nebenprodukte der Photosynthese oxidative Schäden verursachen aber auch als Signalmoleküle dienen. Bisher wurden zwei antagonistische Signaltransduktionswege identifiziert: der eine läuft über H_2O_2, der andere über $^1O_2$, wie anhand der *flu*-Mutante gezeigt werden konnte (Laloi et al. 2007). Da Singulettsauerstoff aufgrund seiner sehr kurzen Halbwertszeit und hohen Reaktivität den Chloroplasten nicht verlassen kann, erfolgt die Signaltransduktion über die Chloroplastenproteine EXEKUTER1 und EXEKUTER2 (Lee et al. 2007) und involviert den Blaulicht-Photorezeptor CRY1 als negativen Regulator der *LHCB*

(Danon et al. 2006). Die Signaltransduktion via $^1O_2$ induziert meist den Zelltod (Danon et al. 2006). Wasserstoffperoxid hat eine bedeutend längere Halbwertszeit als Singulettsauerstoff, ist weniger reaktiv und kann daher durch die Chloroplastenmembran diffundieren (Galvez-Valdivieso & Mullineaux 2010). H_2O_2 induziert, vermutlich unter Mitwirkung von Abscisinsäure (ABA), als Signalagens die Ascorbatperoxidase 2 (APX2), welche den Abbau des Wasserstoffperoxids katalysiert (Fryer et al. 2003). Somit ist eine direkte Signaltransduktion durch ROS möglich, allerdings konnte bisher nicht geklärt werden, wie eine spezifische Reaktion der Zelle auf das unspezifische H_2O_2-Signal möglich ist (Galvez-Valdivieso & Mullineaux 2010).

1.4.5 Signaltransduktion über niedermolekulare Antioxidantien

Glutathion ist via Thioredoxine und Glutaredoxine an den Oxidationszustand antioxidativ wirkender Enzyme gekoppelt, daher dient der Redoxstatus von Glutathion indirekt als Redoxsensor (siehe Kapitel 1.3.2.3; Meyer 2008, Fey et al. 2005). Mittels der Mutante *rax1* konnte gezeigt werden, dass die Transkriptspiegel mehrerer antioxidativ wirkender Enzyme wie APX2, DHAR1 und APX1 vom Oxidationszustand des Glutathion reguliert werden (Ball et al. 2004).

1.4.6 Signaltransduktion über Metabolite und Hormone

Wie mit der Mutante *sun6* gezeigt werden konnte, erfolgt eine retrograde Signaltransduktion über Hexosen wie Saccharose, die eine Repression oder Induktion der in die Photosynthese involvierten Gene *CAB2* und *petE* auslösen und invers mit dem Zuckerspiegel korreliert sind (Oswald et al. 2000). Als Glucosesensor konnte HEXOKINASE1 (HXK1) identifiziert werden. HXK1 interagiert im Nukleus zuckerabhängig mit mehreren Proteinen und induziert Glucose regulierte Gene (Cho et al. 2006). Die Zugabe des Elektronentransportinhibitors DCMU verhindert die Transkription der photosynthetisch aktiven Gene *CAB* und *RBCS* trotz Fehlens von Zucker, so dass davon ausgegangen werden muss, dass ein zusätzliches „Plastidensignal“ vorhanden ist, d.h. dass das „Zuckersignal“ von anderen Signaltransduktionselementen moduliert wird (Oswald et al. 2000, Bossi et al. 2009). Der Transkriptionsfaktor *abi4* ist als Abscisinsäure insensitiv beschrieben und ein Allel zu *sun6* (Finkelstein et al. 1998, Huijser et al. 2000); ABI4 bindet im Nukleus induzierend an den *RBCS*-Promotor und reguliert so die Transkription photosynthetisch assoziierter Proteine (Acevedo-Hernández et al. 2005). Durch die Identität einer Zucker regulierten Mutante (*sun6*) mit einer Abscisinsäure insensitiven Mutante (*abi4*) ergibt sich, dass die Signaltransduktion über Zuckermetabolite wie Saccharose und Trehalose-6-phosphat (T6P) mit der Wirkung von Phytohormonen interagiert (Rolland et al. 2006).

1.5 Die *rimb*-Mutanten

Mit den im Redoxgleichgewicht gestörten *rimb*-Mutanten (***redox imb**alanced*) (Heiber 2007, Heiber et al. 2007) sollen Signaltransduktionselemente identifiziert werden, die die Expression von *2-Cys-Prx A* induzieren. Diese bieten einen Ansatz zur Identifikation bisher unbekannter Elemente der retrograden Chloroplasten-Zellkern Signaltransduktion unter oxidativem Stress, da die Kommunikation der *rimb*-Mutanten unabhängig von den zuvor genannten Signaltransduktionswegen verläuft. Bisher konnte für die antioxidativ wirkende APX2 ein Signaltransduktionsweg geklärt werden (Karpinski et al. 1997), ein weiteres Elemente der Signaltransduktion unter oxidativem Stress der Peroxiredoxine wurde mit dem Transkriptionsfaktors Rap2.4a identifiziert (Shaikhali 2006). Zur Identifikation der Signaltransduktionswege des redoxsensitiven 2-Cys-Prx A wurde der Promotor des *2-Cys-Prx A* vor ein Luciferase Reportergen kloniert (Heiber et al. 2007) und *Arabidopsis thaliana* mit dem Vektor transformiert, diese Maternallinie bildet die Basis für alle Untersuchungen und trägt die Bezeichnung T19-2 (Heiber 2007). Mittels Ethyl-methan-sulfonat Mutagenese wurden im T19-2 Genom ungezielt Gene mutiert und inaktiviert. Bei Genen, die in den *2-Cys-Prx A* Promotor induzierende Signaltransduktionswege eingebunden sind, kann die Luciferase nur schwächer induziert werden und ist daher im Vergleich zu T19-2 niedrig exprimiert (siehe Abb. 1.5, Heiber 2007). Der Promotor des *2-Cys-Prx A* gliedert sich in einen Minimalpromotor, welcher u.a. in die Blattentwicklung eingreift und eine davor liegende „Redox-Box“, welche für die Redoxregulation des *2-Cys-Prx A* Gens verantwortlich ist (Heiber et al. 2007, Shaikhali 2006).

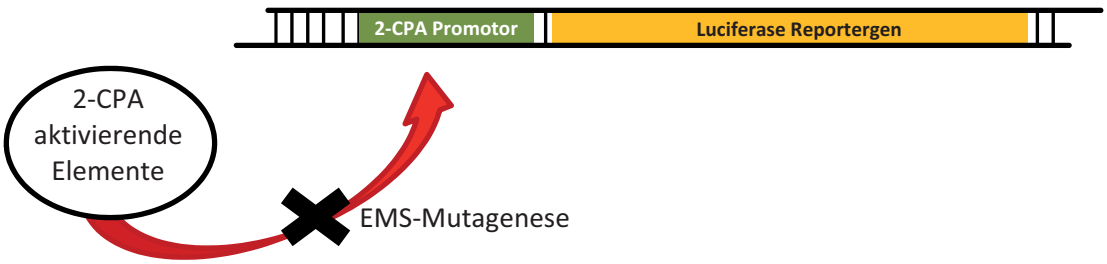


Abb. 1.5: Aufbau des Reportergenkonstrukts und der durch EMS-Mutagenese ausgeschalteten, an den *2-CPA* Promotor angreifenden, Signalelemente.

Die EMS-Mutanten sind in ihrem Redoxgleichgewicht aufgrund der fehlenden *2-Cys-Prx A* Induktion gestört („*redox imbalanced*“), für die weiteren Untersuchungen wurden *rimb1*, *rimb2*, *rimb3*, *rimb5*, *rimb6* und *rimb7* ausgewählt und biochemisch beschrieben (Heiber et al. 2007). Im Sämlingsalter sind die *rimb*-Mutanten nicht vom Wildtyp zu unterscheiden, in späteren Entwicklungsstadien zeigen insbesondere *rimb1* und *rimb6* deutliche Blattphänotypen, in *rimb6* akkumulieren Stärke und Anthocyane (Heiber et al. 2007). Es sind keine Unterschiede im

Bereich der Katalase Expression sowie der Abscisinsäure (ABA) Signaltransduktion zu beobachten; die Ascorbatspiegel sind in *rimb1*, *-3*, *-5*, *-6* und *-7* erhöht, der Glutathionspiegel ist in *rimb1* erniedrigt (Heiber et al. 2007). Die Unabhängigkeit der *rimb*-Mutanten typischen Signaltransduktionswege von den Signaltransduktionswegen der reaktiven Sauerstoffspezies konnte anhand der Expressionsspiegel der Gene *CAT2*, *LOX2*, *BAP1* und *FER1* gezeigt werden, welche durch ROS-Signale reguliert werden (Kiddle et al. 2003, op den Camp 2003, Heiber et al. 2007). Die Mutanten zeigen, mit Ausnahme der *rimb4*, keine Störung im Elektronentransport zwischen den Photosystemen und der Akzeptorverfügbarkeit an Photosystem I (Heiber et al. 2007, Piñas-Fernández & Strand 2008). Die Mutanten *rimb1*, *-2*, *-3*, *-5* und *-7* weisen eine Störung der Signaltransduktion in der über die „Redox-Box“ induzierten Expression des *2-Cys-Prx A* auf. Die Mutante *rimb6* weicht von den anderen *rimb*-Mutanten ab: es ist kein „Redox-Box Effekt“ zu beobachten, die nukleäre Expression der im Chloroplasten wirkenden Gene ist jedoch gestört. Es ist daher davon auszugehen, dass die Störung in *rimb6*, welche über den Minimalpromotor wirkt, in einem weiteren Signaltransduktionsweg vorliegt, der unabhängig von der „Redox-Box“ *2-Cys-Prx A* induziert (Heiber et al. 2007).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, retrograde Chloroplasten-Nukleus Signaltransduktionselemente zu identifizieren, welche die *2-Cys-Peroxiredoxin A* (*2-CPA*) Genexpression induzieren und regulieren, um reaktive Sauerstoffspezies wie Peroxide in den Chloroplasten zu entgiften. Da 2-CPA als eine Art „Schleusentor“ für ein niedriges Niveau der Peroxide verantwortlich ist (Baier & Dietz 2005), ist die Regulation dieses zentralen Enzyms des Ascorbat unabhängigen „*Water-Water-Cycle*“ von besonderem Interesse, da so die Zelle vor oxidativen Schäden geschützt wird.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1 Samen- und Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial für alle Experimente wurden die *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Columbia und Landsberg *erecta* verwendet. In den Ökotypen Columbia wurde mittels *Agrobakterium* ein Reportergenkonstrukt eingebracht, welches den Promotor von *2-CPA* vor einem Luciferase Reportergen trägt. Diese Pflanzenlinie trägt den Namen T19-2 (Heiber et al. 2007). Die Analyse retrograder Signaltransduktionswege, welche zur Expression von *2-CPA* führen, erfolgte durch Ausschalten der Signalweg kodierenden Gene mittels milder EMS-Mutagenese und wurde mit dem Reportergenkonstrukt nachgewiesen (Heiber et al. 2007). Für die weitere Analyse der Mutanten wurden die redox gestörten Mutanten *rimb1* und *rimb6* aufgrund des starken Blattphänotyps ausgewählt (Heiber et al. 2007).

2.1.1 T-DNA Insertionslinien

Um die Mutanten anhand ihres Phänotyps nach Einengung des Genomabschnitts durch ihren Phänotyp zu identifizieren, wurden SALK, SAIL, FLAG und GABI-Kat T-DNA Insertionslinien vom „Nottingham Arabidopsis Stock Centre“ und „Institut National de la Recherche Agronomique“ bezogen. Die Auswahl der T-DNA Linien erfolgte mit „T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool“ (*http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress*). Die Überprüfung der Insertionslokalisation und auf Homo- oder Heterozygotie von phänotypisch den Mutanten ähnlichen Linien erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).

2.1.2 Kreuzung der Pflanzen

Zum Kreuzen wurden kurz vor Beginn der Blütenöffnung die Petalen, Sepalen und Stamina der Maternalpflanze mit Pinzetten unter dem Stereomikroskop entfernt, um eine Selbstbefruchtung zu verhindern. Danach wurde Pollen der Vaterpflanze Landsberg *erecta* auf die Narbe aufgetragen. Das so behandelte Fruchtblatt wurde mit einem Papiertütchen umschlossen, bis die Samenbildung abgeschlossen war.

2.2 Anzucht der Pflanzen

2.2.1 Erdsubstrate

Für unsterile Anzuchten der gekreuzten Pflanzen, der Mutanten sowie der Maternallinie T19-2 wurden Erdsubstrate mit unterschiedlichem Nährstoffgehalt verwendet. Die Substrate wurden vor Verwendung bei 121°C, 20 min autoklaviert; eventuell zugegebenes „Axoris™ Insektenfrei“ wurde gemörsert nach dem Autoklavieren untergemischt.

2.2.1.1 Nährstoffarmes Substrat

33 % Fruhstorfer Erde mit Vulkanton aus dem Vogelsberg, Typ: P
Weißtorf fein, Rindenhumus, mit Spurenelementen und Aquaflow

Nährstoffe:
124 - 185 [mg/L] Stickstoff
120 - 179 [mg/L] P_2O_5
190 - 284 [mg/L] K_2O
0,8 - 1,4 [g/L] Salzgehalt
pH-Wert: 5,7 - 6,3

33 % Vermiculite, Körnung 2 - 3

33 % Perlite

0,5 [g/L] Axoris™ Insekten-frei
0,006 [g/L] Thiamethoxan gegen Thripse, Zikaden, Blattwanzen;
Nährstoffe: Stickstoff/Phosphor/Kalium/Magnesium: 6+3+4,5+1,5

2.2.1.2 Nährstoffreiches Substrat

50 % Topferde
12 Volumenäquivalente Kompost aus dem botanischen Garten
3 Volumenäquivalente Toresa® Holzfasern
3 Volumenäquivalente Floraton 1
Weißtorf mittlere Struktur mit feinstverteilter Tonschlämme, niedriger Nährstoffgehalt mit Spurenelementen

Nährstoffe:
140 [mg/L] Stickstoff
80 [mg/L] P_2O_5
190 [mg/L] K_2O
0,9 [g/L] Salzgehalt
pH-Wert: 5,4 - 6,2

50 % Toresa® Holzfasern

1,5 [g/L] Osmocote® exact® standard
Nährstoffe: Stickstoff/Phosphor/Kalium /Magnesium: 16+11+11+3
+Spurenelemente

0,5 [g/L] Dolomitkalk
Nährstoffe: 70 % $CaCO_3$, 30 % $MgCO_3$

0,5 [g/L] Axoris™ Insekten-frei
0,006 g/L Thiamethoxan gegen Thripse, Zikaden, Blattwanzen;
Nährstoffe: Stickstoff/Phosphor/Kalium/Magnesium: 6+3+4,5+1,5

Tab. 2.2.1: Komponenten der Erdsubstrate.

Substrat	Hersteller
Fruhstorfer Erde mit Vulkanton, Typ: P	Industrie-Erdenwerk Archut-GmbH & Co. KG, Lauterbach, Deutschland
Vermiculite, Körnung 2 - 3	Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH, Sprockhövel, Deutschland
Perlite	KNAUF PERLITE GmbH, Dortmund, Deutschland
Axoris™ Insekten-frei	COMPO GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Floraton 1	Floragard Vertriebs GmbH , Oldenburg, Deutschland
Toresa® Holzfasern	Franz Kranzinger GmbH, Straßwalchen, Österreich
Osmocote® exact® standard	Scotts Celaflor GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland
Dolomitkalk	Deutsche Raiffeisen-Warenzentrale GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in der Klimakammer (Viessmann Kältetechnik AG, Hof/Saale) bei 80 - 120 µE unter „Osram 18 W/840 Lumilux Cool White“ und „Philips 36 W/840 Master TL-D“ Lampen in einem 10 h/14 h Tag/Nacht Rhythmus und 80 - 90 % Luftfeuchte. Die Samen wurden zuvor mindestens über Nacht zur besseren Keimung bei 6°C kältestratifiziert oder für 3 h mit hellrotem Licht (650 - 680 nm) in der „flora LEDs, Model 201V11, CLF Plant Climatics GmbH, Emersacker“ Kammer behandelt. Die Kältestratifikation erfolgte bei 6°C aufgrund der Kühlgerätehersteller bedingten tiefst möglichen Temperatur.

2.2.1.3 Variation des Nährstoffgehalts in Erdkulturen

Es wurden Erdsubstrate mit verschiedenen Nährstoffkonzentrationen getestet sowie die Licht-bedingungen variiert. Dem nährstoffarmen Substrat wurden verschiedene Mengen Dünger in pelletierter Form (0, 5, 10, 15, 20, 30 Kügelchen Osmocote® exact® standard entsprechend ca. 0 mg, 130 mg, 260 mg, 390 mg, 520 mg, 780 mg Dünger pro 150 mL Substrat) zugegeben. Die Pflanzen wurden in der Klimakammer 9 Wochen angezogen und der *rimb6* Phänotyp mit der Kontrolle T19-2 verglichen.

2.2.2 Sterile Substrate

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf autoklaviertem Murashige und Skoog-Medium (MS-Medium) mit Saccharose (Murashige & Skoog 1962).

Tab.2.2.2: Zusammensetzung des MS-Mediums.

Substanz	Zusammensetzung
MS basale Salzmischung ohne Vitamine [1 x]	0,43 % (w/v)
MES-Puffer	5 mM
Phytagel	0,4 % (w/v)
Saccharose	0,5 % oder 1 % (w/v)
$Wasser_{deion.}$	ad 1000 mL

Der pH-Wert wurde mit Kaliumhydroxidlösung auf pH 5,7 eingestellt und mit $Wasser_{deion.}$ auf 1000 mL aufgefüllt. Für die verschiedenen Experimente wurden MS-Medium Konzentration, Saccharose Konzentration, Nährstoffe und Phytohormone variiert und sind in den Experimentbeschreibungen mit den Anzuchtbedingungen aufgeführt. Für Messungen der Luciferaseaktivität wurden je 100 µL 1 x MS-Medium mit 1 % Saccharose in jede Vertiefung der „96-Well Mikrotestplatten, transparent, U-Form“ eingebracht. Nach Gelierung des Mediums wurden die Samen wie in „2.2.2.1 Desinfektion von Samen für sterile Anzuchten“ beschrieben behandelt und mittels Pipette einzeln auf das MS-Medium aufgebracht. Bei allen Arbeiten wurde steril gearbeitet. Die Platten wurden für 2 Tage bei 4°C stratifiziert und im Klimaschrank bei 40 µE Dauerlicht, 18°C - 21°C, 11 Tage angezogen.

2.2.2.1 Desinfektion von Samen für sterile Anzuchten

Die Samen wurden in einem 1,5 mL Plastikreaktionsgefäß für eine Minute mit 200 µL 70 - 80 % Ethanol gewaschen, welches verworfen wurde. Darauf wurde für 8 - 10 min mit 200 µL 20 % „Glorix, Unilever Nederland B.V., Rotterdam, Niederlande“ Haushaltsbleiche, basierend auf Natriumhypochlorit, desinfiziert. Nach Verwerfen der Desinfektionslösung wurde mindestens fünfmal mit sterilem Wasser gewaschen. Falls es schwer möglich war, Desinfektionsmittel und Wasser zu entfernen, wurden die Samen max. 15 s mit der Tischzentrifuge bei max. Geschwindigkeit sedimentiert.

2.2.2.2 Selektive Variation der Nährstoffe in sterilen Kulturen

Das in der Tabelle aufgeführte Basismedium mit 0,5 % Saccharose wurde für die minimale Nährstoffversorgung verwendet. Als Ausgangskontrolle für die optimale Nährstoffversorgung wurde 1 x MS-Medium verwendet.

Tab. 2.2.2.2: Grundkomponenten der Medien.

Medium	Zusammensetzung
MS basale Salzmischung ohne Vitamine [0,5 x]	0,215 % (w/v)
Saccharose	0,5 % (w/v)
MES-Puffer	5 mM
Phytagel	0,5 % (w/v)
Kaliumhydroxid (KOH)	ad pH 5,7
$Wasser_{deion.}$	ad 1000 mL

Die weiteren Medien mit selektiven Nährstoffen enthielten zusätzlich zu den Grundkomponenten jeweils 60 µM Zinksulfat-Heptahydrat ($ZnSO_4$ x 7 H_2O) [2,5 x], 20 mM Kaliumnitrat (KNO_3) [1,5 x], 1,5 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4$ x 7 H_2O) [1,5 x], 1,25 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) [1,5 x], 3 mM Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2$ x 2 H_2O) [1,5 x], 20 mM Ammoniumnitrat (NH_4NO_3) [1,5 x]. Alle Medien wurden autoklaviert und steril in 12 cm x 12 cm Petrischalen gegossen. Desinfizierte Samen wurden unter der Sicherheitswerkbank auf das Medium aufgebracht und für 3 Tage bei 6°C stratifiziert. Die Anzucht erfolgte in Klimaschränken bei 120 µE in einem 10 h/14 h Licht/Dunkel, 20°C/18°C Rhythmus. Nach 8 Wochen wurde der Phänotyp der Mutante mit dem der Maternalpflanze T19-2 verglichen.

2.3 Segregationsanalyse

T19-2 Pflanzen wurden vor Messung der Luciferase-Aktivität für 3 h - 3,5 h abgedunkelt, um zu testen, ob das *2-CPA* Promotor-Luciferase-Konstrukt schaltet. Pflanzen, welche weniger als 25 % der Luciferaseaktivität abgedunkelter T19-2 Pflanzen zeigten, wurden als homozygot definiert. Um das Segregationsverhalten zu überprüfen (Blattphänotyp und niedrige Luciferaseaktivität), wurden aufgrund des Blattphänotyps homozygot kartierte Mutanten mit T19-2 bezüglich der Luciferaseaktivität verglichen.

2.4 Messung der Luciferaseaktivität

Die 10 Tage alten, steril angezogenen Pflanzen wurden gleichmäßig mit in Wasser gelöstem und mit einem Tropfen Natronlauge alkalisiertem 1 mM Luciferin mit 0,01 % (v/v) Triton X-100 besprüht und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Penetration des Luciferins zu

ermöglichen. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte im „Fluoroscan Ascent FL, Thermo Electron GmbH, Dreieich“ als Mehrpunktmessung, bei der pro Vertiefung ein Mittelwert aus fünf Messwerten gebildet wurde. Die Integrationszeit betrug 20 ms, die „*PMT voltage*“ lag bei 830. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels „Microsoft Excel XP“, gerundet auf 5 Nachkommastellen.

2.5 Kartierung der Mutation

2.5.1 Isolation von DNA

DNA wurde aus frischem Blattgewebe mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert.

Tab. 2.5.1: Puffer und Lösungen für die DNA Isolation.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
REB-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
	25 mM EDTA
	250 mM NaCl
	0,5 % (w/v) SDS
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol [25:24:1]	50 % (v/v) Phenol, TE-Puffer gesättigt
	48 % (v/v) Chloroform
	2 % (v/v) Isoamylalkohol
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA

In 200 µL REB-Puffer wurde ein *Arabidopsis* Blatt mit einem Mikropistill in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß zerrieben. Dies wurde mit 200 µL Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol [25:24:1] gemischt und drei Minuten bei max. Geschwindigkeit mit der „Centrifuge 5424, Eppendorf AG, Hamburg“ zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µL Isopropanol gemischt. Die DNA wurde anschließend für mindestens 10 min bei -20°C gefällt. Darauf folgte die Sedimentation der DNA mit einer Zentrifugation bei max. Geschwindigkeit für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und das Reaktionsgefäß für 30 s erneut zentrifugiert und der restliche Überstand verworfen. Bevor die DNA in 100 µL sterilem, deionisiertem Wasser gelöst wurde, erfolgte eine Trocknung in der Vakuumzentrifuge für 3 - 5 min bei Raumtemperatur. Zur Scherung wurde die gelöste DNA bei -20°C eingefroren.

2.5.2 Polymerasekettenreaktion zur Kartierung

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Genkartierung wurde für SSLP- (***S**imple **S**equence **L**ength **P**olymorphism*), CAPS- (***C**leaving **A**mplified **P**olymorphic **S**equences*) sowie Sequenzkartierungen von Einzelbasen-Polymorphismen verwendet (Jander et al. 2002). Die Auswahl der Polymorphismen erfolgte anhand der „Monsanto Arabidopsis Polymorphism and L*er* Sequence Collections“ (*http://www.arabidopsis.org/browse/Cereon/index.jsp*). Als DNA Polymerase wurde die *Thermus aquaticus* Taq-Polymerase (TAQ) eingesetzt, welche gemäß Pluthero exprimiert und isoliert wurde (Pluthero 1993). Als TAQ-Puffer [10 x] wurden 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$ und 15 mM $MgSO_4$ verwendet. Die Stoffmenge der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) betrug insgesamt 40 mM, die der Primer betrug je 100 pM. Pro Ansatz wurden 1 µL TAQ-Polymerase, TAQ-Puffer [1 x], 40 µM dNTPs, je 100 pM Primer *„forward“* und *„reverse“*, mind. 35 ng/µL DNA (ca. 2 µL) gemischt und mit sterilem $Wasser_{deion.}$ auf 20 µL aufgefüllt.

Tab.2.5.2: Standard PCR-Programm für die Genkartierung.

Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
94	180	1
94	15	42
52	15	
72	45	
72	60	1

Bei der CAPS-Kartierung wurden wie unter „2.5.2 Polymerasekettenreaktion zur Kartierung“ beschrieben, DNA Fragmente mit Polymorphismen amplifiziert. Anschließend wurden die Produkte mittels Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangabe verdaut. Bei differenziell vorhandener Schnittstelle sollte entweder nur die DNA des Ökotyps Columbia oder Landsberg *erecta* geschnitten werden. Dadurch war eine Identifikation der Genotypen des untersuchten Organismus möglich. Die Identifikation der Schnittstellen erfolgte mit dem „NEBcutter V2.0“ (*http://tools.neb.com/NEBcutter2/index. php*).

2.5.3 Genspezifische Polymerasekettenreaktion

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes entspricht den Komponenten, wie sie unter „2.5.2 Polymerasekettenreaktion zur Kartierung“ beschrieben ist. Aufgrund teils sehr starker Sequenzunterschiede wurde für jedes amplifizierte Gen bzw. jeden Genabschnitt die Anlage-

rungstemperatur der Primer individuell jeweils 5°C unter dem Schmelzpunkt T_m (Herstellerangabe) gewählt. Die Elongationszeit betrug 60 s je 1000 bp.

Tab.2.5.3: PCR-Programm für genspezifische Amplifikationen.

Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
94	180	1
94	30	42
Primerabhängig [5°C unter T_m]	30	
72	60 s/1000 bp	
72	300	1

Als DNA Polymerase wurde TAQ verwendet. Die einzelnen Schmelzpunkte der Primer sind im Anhang angegeben.

2.5.4 Agarose Gelelektrophorese

Zur Analyse von PCR-Produkten unter 450 bp wurden 4 % (w/v) Agarosegele mit Ethidiumbromid verwendet (Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf), für genspezifische PCR-Produkte und sonstige DNA Analysen über 450 bp wurden 1,2 % (w/v) Agarosegele mit Ethidiumbromid verwendet (NEEO Ultra-Qualität Agarose, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe).

Tab. 2.5.4: Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.

Lösung	Zusammensetzung
TAE-Puffer [50 x]	2 M Tris
	1 M Eisessig
	0,05 M EDTA
	pH 7,5 - 7,8 mit Eisessig einstellen
	ad 1000 mL $Wasser_{deion.}$
Ethidiumbromid, 1 % in H_2O	8,5 ‰ (v/v) in 1 x TAE-Puffer mit Agarose
DNA-Probenpuffer [6 x]	30 % (v/v) Glycerol
	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	0,25 % (w/v) Xylencyanol FF

Als DNA-Standards wurden die „Quick-Load™ 100 bp DNA Ladder“ (New England Biolabs GmbH, Frankfurt) sowie die „GeneRuler™ 1kb DNA Ladder“ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet.

2.5.5 Reinigung von PCR-Fragmenten ohne Nebenprodukte

PCR-Fragmente wurden mit dem „GeneMATRIX PCR/DNA Clean-Up DNA Purification Kit, EURx Ltd., Danzig, Polen“ nach Herstellerangabe gereinigt, wenn keine Nebenbanden vorhanden waren. Die PCR-Proben wurden in einem Hochsalzpuffer gelöst, die DNA in einer Säule an Silikat gebunden und anschließend durch einen Niedrigsalzpuffer eluiert.

2.5.6 Reinigung von PCR-Fragmenten mit Nebenprodukten

PCR-Fragmente mit Nebenbanden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem „GeneJET™ Gel Extraction Kit, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot“ nach Herstellerangabe gereinigt. Das ausgeschnittene PCR-Fragment in Agarose wurde in einem Hochsalzpuffer bis zum Schmelzen der Agarose erhitzt, in einer Säule an Silikat gebunden und nach mehrmaligem Waschen mit einem Niedrigsalzpuffer eluiert.

2.5.7 Klonierungen

Für Klonierungen zum Zwecke der Sequenzierung wurde das „CloneJET™ PCR Cloning Kit, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot“ mit dem Vektor pJet1.2 verwendet, bei dem die PCR-Produkte nach Auffüllen der Basenüberhänge mit dem „DNA blunting Enzym“ durch eine T4 DNA-Ligase mit einem Vektor verbunden wurden.

Tab. 2.5.7.I: Reaktionsansatz „CloneJET™ PCR cloning“.

Komponente	Menge [µL]
Reaktionspuffer [2 x]	10
DNA blunting Enzym	1
$Wasser_{deion.}$	5
PCR Produkt (gereinigt)	2

Der Ansatz wurde durchmischt und anschließend kurz zentrifugiert. Darauf folgte eine Inkubation bei 70°C für 5 min. Nach Abkühlen für 1 min auf Eis wurde zum Ansatz je 1 µL des Vektors pJet1.2 und T4 DNA-Ligase gegeben, erneut durchmischt und kurz zentrifugiert. Nach mindestens 5 min und höchstens 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu 20 µL Reaktionsansatz 80 µL chemisch kompetente DH5α oder 40 µL OneShot TOP10 Zellen gegeben, durch zweimaliges Pipettieren durchmischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dem Hitzeschock bei 42°C für 90 s folgte eine Abkühlung für 2 min auf Eis. Dem Ansatz wurden 400 µL LB-Medium hinzu gegeben und ohne Antibiotika für 1 h bei 37°C inkubiert. Darauf folgte das Ausplattieren unter der Sicherheitswerkbank auf „Lysogeny-Broth-Agar“ (LB-Agar) mit 100 µg/mL Ampicillin. Alternativ erfolgte die Klonierung mit dem „TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen GmbH, Karlsruhe“

nach Angabe des Herstellers in den pCR2.1-TOPO Vektor, basierend auf einem mit Topoisomerasen verbundenen Vektor, welche das mit TAQ amplifizierte PCR-Produkt mit Desoxyadenosinüberhängen mit den Desoxythymidinüberhängen des Vektors ligieren. Die Vektorkarten der Plasmide sind im Anhang aufgeführt.

Tab. 2.5.7.II: Verwendete Mikroorganismen zur Plasmidamplifikation.

Mikroorganismus	Beschreibung
One Shot TOP10 Invitrogen, chemisch kompetent	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-
DH5α eigene Anzucht, chemisch kompetent	F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, hsdR17(r_K^- m_K^+), λ–

2.5.8 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob das erwartete Insert in den Vektor aufgenommen wurde, erfolgte eine Kolonie-PCR. Dazu wurden die Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in das PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Pro Ansatz wurden 1 µL TAQ-Polymerase, 2 µL TAQ 10 x Puffer, 40 mM dNTPs, je 100 pM Primer „*forward*“ und „*reverse*“, 2 µL DNA [mind. 35 ng/µL] gemischt und in $Wasser_{deion.}$ zu den Bakterien gegeben (ad 20 µL).

Tab. 2.5.8: PCR-Programm für die Kolonie-PCR.

Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
94	600	1
94	60	40
54	60	
72	120	
72	300	1

2.5.9 Anzucht der Bakterien

Kolonien, welche mittels Kolonie-PCR positiv auf Aufnahme des gewünschten Inserts in den Vektor getestet waren, wurden bei 37°C, 180 rpm im Inkubationsschüttler angezogen.

Tab. 2.5.9: Zusammensetzung des LB-Mediums.

LB-Medium, Typ: LB-Miller	Konzentration
Pepton aus Soja	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)
Agar (nur bei LB-Agar)	1,5 % (w/v)
$Wasser_{deion.}$	ad 1000 mL

Es wurden 5 mL steriles LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt und mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte inokuliert.

2.5.10 Isolation von Plasmiden

Mittels alkalischer Lyse erfolgte der Zellaufschluss und die Denaturierung der Proteine. Nach einer Neutralisation schloss sich die Fällung der Plasmide in Isopropanol an. 4,5 mL einer Übernachtkultur wurden 1 min bei 20200 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen, erneut 15 s zentrifugiert und der restliche Überstand verworfen.

Tab.2.5.10: Puffer und Lösungen für die Plasmidisolation.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Lösung A (autoklaviert)	25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	10 mM Na_2EDTA
	1 % (v/v) Glycerin
Lösung B (frisch angesetzt)	1 % (w/v) SDS
	0,2 N NaOH
	ad $H_2O_{deion.}$
Lösung C (autoklaviert)	3 M Kaliumacetat
	5 M Eisessig

Das Zellsediment wurde in 200 µL „Lösung A" resuspendiert und mit 400 µL „Lösung B" durch zweimaliges Invertieren gemischt. Danach wurden 300 µL „Lösung C" zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren durchmischt. Danach folgte eine Lagerung für 60 min bei 4°C. Nach 10 min Zentrifugation bei 20200 x g wurde der Überstand in ein neues Plastikreaktionsgefäß überführt und mit 850 µL Isopropanol durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Bei -20°C wurden die Plasmide für mindestens 30 min gefällt und 15 min bei 20200 x g sedimentiert. Das Sediment wurde mit 400 µL 75 % (v/v) Ethanol eiskalt gewaschen und in der Vakuumzentrifuge bei Raumtemperatur für 3 min getrocknet. Die Plasmide wurden in 30 µL sterilem $Wasser_{deion.}$ gelöst und bei -20°C gelagert.

2.5.11 Isolation von Plasmiden für Sequenzierungen

Plasmide wurden aus *E. coli* mit dem „Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification System, Promega GmbH, Mannheim" nach Herstellerangabe isoliert und in $Wasser_{deion.}$ gelöst bei -20°C gelagert. Die Methode der Reinigung basiert ebenfalls auf einer alkalischen Lyse, jedoch wird die Plasmid-DNA an eine Silikatmembran gebunden, durch Waschen von Verunreinigungen wie Proteine oder Membranen getrennt und anschließend mit einem Niedrigsalzpuffer eluiert.

2.5.12 Sequenzierungen

Sequenzierungen von Plasmiden und PCR-Produkten wurden von der Firma „GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland“ mit einem „ABI 3730xl“ nach dem Kettenabbruchverfahren durchgeführt. Die DNA Konzentration für PCR-Produkte betrug ca. 30 ng/µL und für Plasmide ca. 80 ng/µL. Die Konzentration wurde im „BioPhotometer plus, Eppendorf AG, Hamburg“ photometrisch bestimmt. Als Primer wurden jeweils 10 pmol/µl genspezifischer Primer für PCR-Produkte oder Standardprimer (pJet1.2 fw, pJet1.2 rev, M13 fw, M13 rev) für Plasmide verwendet. Alle PCR-Produkte und Plasmide wurden vor der Sequenzierung mit den beschriebenen Methoden gereinigt.

2.5.13 Detektion von Heteroduplex DNA durch TILLING

Für das „*TILLING*“ wurde das „SURVEYOR Mutation Detection Kit, Transgenomic Inc., Glasgow“ nach Herstellerangabe verwendet. Beim „*TILLING*“ (Till et al. 2004) schneidet das Enzym „CEL I“ Heteroduplex DNA spezifisch an Stellen mit Basenfehlpaarungen. Aufgrund der Fragmentgröße ist es möglich, die Lage der Mutation in einem Agarosegel zu erkennen und mit einer Sequenzierungsreaktion zu bestätigen.

2.5.14 Isolation der gesamten Ribonukleinsäure aus *A. thaliana*

Alle Flüssigkeiten wurden mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht inkubiert und vor Verwendung 20 min bei 121°C autoklaviert. 200 - 300 mg in flüssigem Stickstoff gefrorenes Pflanzenmaterial wurden in 500 µL Lysispuffer, 500 µL Phenol (wassergesättigt) und 300 µL Chloroform/Isoamylalkohol [24:1] homogenisiert, in ein 1,5 mL Plastikreaktionsgefäß überführt und 10 min bei 4°C und 20200 x g zentrifugiert. Dem Überstand wurden 500 µL wassergesättigtes Phenol und 500 µL Chloroform/Isoamylalkohol [24:1] zugegeben, dies wurde mit dem „Vortexer“ durchmischt und 10 min, 4°C, 20200 x g zentrifugiert. Dem Überstand wurde 1 mL Chloroform/Isoamylalkohol [24:1] zugegeben, dies mit dem „Vortexer“ durchmischt und 10 min, 4°C, 20200 x g zentrifugiert. Dem Überstand wurden 500 µL Isopropanol zugegeben und die Ribonukleinsäuren eine Stunde bei 4°C gefällt. Die gesamte RNA wurde bei 10 min, 4°C, 20200 x g in der Zentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde in TE-Puffer mit 25 % (w/v) Lithiumchlorid gelöst, mindestens 2 h bei 4°C gelagert, und 15 min, 4°C, 20200 x g zentrifugiert. Dieser Präzipitationsschritt wurde zweimal wiederholt. Die RNA wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 50 µL sterilem, nicht mit DEPC behandeltem, Wasser gelöst und bei -80°C eingefroren.

Tab. 2.5.14: **Puffer und Lösungen für die Ribonukleinsäure (RNA) Isolation.**

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Lysispuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,5 - 9,0)
	25 mM EDTA
	25 mM EGTA
	100 mM β-Mercaptoethanol
	2 % (w/v) SDS
Chloroform-Isoamylalkohol [24:1]	96 % (v/v) Chloroform
	4 % (v/v) Isoamylalkohol
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA

2.5.15 Überprüfung der RNA

Die RNA wurde analog zur DNA in einem 1,2 % (w/v) Agarosegel mit 0,08 µL/mL 1 % Ethidiumbromid Lösung aufgetrennt und mit der Geldokumentationsanlage visualisiert.

2.5.16 Isolation der gesamten RNA aus *A. thaliana* für die qPCR

RNA, die mittels quantitativer Real-time-PCR (qPCR) quantifiziert werden sollte, wurde nach Herstellerangabe mit dem „RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden“ frisch isoliert und in einem „Precellys 24 Homogenisator, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen“ aufgeschlossen. Der Puffer „RLT“ lysiert die Pflanzenzellen und inaktiviert die Enzyme durch Guanidinthiocyanat; anschließend wird RNA größer als ca. 200 bp an die Silikatmembran gebunden, gewaschen und eluiert. Die Pflanzen wurden 6 Wochen oder 11 Tage nach Keimung geerntet.

2.5.17 Synthese der komplementären DNA aus RNA

Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) aus zuvor isolierter RNA erfolgte nach Herstellerangabe mit dem „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt“ aus 2 µg RNA in einem 20 µL Ansatz. Die „MultiScribe™ Reverse Transcriptase“ schreibt mit dem Oligo(dT)-Primer die RNA in die komplementäre DNA um.

2.5.18 Quantitative Real-time-PCR

Die Transkriptspiegel der Gene wurden fluorimetrisch mittels qPCR unter Verwendung von „SYBR Green“ quantifiziert. Die Primer der qPCR wurden mit dem Programm „Quantprime“ (*http://www.quantprime.de*) erstellt und bei „Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland “ synthetisiert. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und emittiert ein Signal bei 585 nm nach Anregung mit 470 nm, das mit der Produktmenge korreliert. Die Real-time-Amplifikation erfolgte mit dem „Brilliant II SYBR Green Master Mix, Agilent Technologies, Santa Clara, USA“ nach Herstellerangabe in einem „Stratagene Mx3005P, Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn“. Jede 10 µL Reaktion enthielt 2 µL cDNA, 600 nM der „*reverse*“ und „*forward*“ Primer und 1 x Brilliant II SYBR Green Master Mix. Die PCR wurde nach dem in Tab. 2.5.18 gezeigten Protokoll durchgeführt und die Fluoreszenzdaten kontinuierlich aufgezeichnet.

Tab. 2.5.18: PCR-Programm für die quantitative Real-time-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Aktivierung DNA Polymerase	95	15 min	1
Denaturierung	95	10	40
Primeranlagerung und Elongation	60	30	
Dissoziationskurve	55-95	0,2°C s^{-1}	1

Alle Werte wurden auf das Aktin-Gen *ACT2* (At3g18780) als internem Standard normalisiert (Pfaffl 2004), mit 2 - 3 biologischen Replikaten und einer Kontrolle ohne DNA abgesichert. Die relative Quantifizierung bestimmt die Veränderungen des „*steady-state mRNA level*“ eines Gens über mehrere Proben im Verhältnis zu einem nicht regulierten Gen als interner RNA-Kontrolle. Die Berechnung der relativen quantitativen Expression der zu untersuchenden Gene im Verhältnis zur *ACT2* Kontrolle erfolgte mit folgender Gleichung:

$$\mathrm{R} = 2^{-[\Delta\mathrm{Ct\ sample} - \Delta\mathrm{Ct}\ ACT2]}$$

basierend auf einer statistischen Real-time Effizienz von 2 und einem Zyklus-Schwellenwert (C_t) der Proben relativ zum Zyklus-Schwellenwert des *ACT2* Referenzgens.

2.6 Physiologische Untersuchungen

2.6.1 Jasmonsäure-Wachstumstest

Die Samen wurden bei 4°C über Nacht stratifiziert und für 4 Tage auf 1 x MS-Medium, 1 % Saccharose ohne Jasmonsäure angezogen. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Keimlinge auf 1 x MS-Medium, 1 % Saccharose mit 50 µM Jasmonsäure umgesetzt und das Wachstumsverhalten, insbesondere der Wurzeln, nach insgesamt 11 Tagen ausgewertet. Die Anzucht erfolgte bei 115 µE in einem 12 h/12 h Licht/Dunkel, 22°C/18°C Rhythmus im „Percival CU-36L5, CLF Plant Climatics GmbH, Emersacker“ Klimaschrank.

2.6.2 Salicylsäure-Wachstumstest

Die desinfizierten Samen der Maternallinie T19-2 und der Mutante *rimb6* wurden unter der Sicherheitswerkbank auf das 0,5 x MS-Medium, 0,5 % (w/v) Saccharose, aufgebracht und für 3 Tage bei 4°C stratifiziert. Die Anzucht erfolgte im Klimaschrank „Percival CU-36L5, CLF Plant Climatics GmbH, Emersacker“ bei 120 µE in einem 10 h/14 h Licht/Dunkel, 20°C/18°C Rhythmus. Nach 8 Wochen wurde der Phänotyp der Mutante mit dem der Maternalpflanze verglichen.

2.6.3 Analyse des Rosettendurchmessers

Um das Wachstumsverhalten zu untersuchen, wurde der Rosettendurchmesser als Größenparameter bestimmt. Um biotische Faktoren auszuschließen, wurden die Pflanzen auf 1 x MS-Platten mit 0,5 % (w/v) Saccharose und 0,5 % (w/v) Phytagel im „Percival CU-36L5, CLF Plant Climatics GmbH, Emersacker“ Klimaschrank bei 120 µE in einem 12 h/12 h Licht/Dunkel, 20°C/18°C Rhythmus angezogen. Zuvor erfolgte eine Stratifikation der Samen bei 4°C über Nacht. Die Bestimmung des Rosettendurchmessers erfolgte nach 14 Tagen.

2.6.4 Analyse der Wurzelstrukturen

Die Analyse der Wurzelstrukturen (Anzahl lateraler Wurzeln bzw. Länge des Hauptwurzelsystems) erfolgte mit den Programmen „EZ-Rhizo“ (Armengaud et al. 2009) und „ImageJ 1.43“. Die Anzucht der Pflanzen auf 0,5 x MS-Platten mit 0,5 % (w/v) Saccharose und 0,5 % (w/v) Phytagel erfolgte im Klimaschrank im 12 h/12 h Licht/Dunkel, 20°C/18°C Rhythmus bei 120 µE. Nach 14 Tagen wurden die Wurzeln mit einem „Epson Perfection 1650, Epson Deutschland GmbH, Meerbusch“ gescannt [200 dpi, Bitmap-Format] und die Wurzelstrukturen mit „EZ-Rhizo“ (*http://www.ez-rhizo.psrg.org.uk*) sowie „ImageJ 1.43“ (*http://rsbweb.nih.gov/ij*) ausgewertet.

2.6.5 Bestimmung des Chlorophyllgehalts

Die Bestimmung des Chlorophyllgehalts erfolgte nach der von Porra (2002) beschriebenen Methode mittels photometrischer Bestimmung der Absorption von Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b* bei 663 nm bzw. 645 nm nach Extraktion mit 80 % (v/v) Aceton im Dunkeln.

2.6.6 Reaktion auf Paraquat

Es wurden *rimb1*, *rimb6*, SALK_116432 und T19-2 steril auf 1 x MS-Medium mit 0,5 % Saccharose ausgesät, für 2 Tage bei 4°C stratifiziert und bei 90 µE in einem 10 h/18 h Licht/Dunkel, 20°C/18°C Rhythmus im „Percival CU-22L, CLF Plant Climatics GmbH, Emersacker“ Klimaschrank angezogen. Nach 13 Tagen wurden die Keimlinge mit 1,5 µM Paraquat (gelöst in H_2O) gleichmäßig besprüht, nach 7 Tagen im Klimaschrank unter den beschriebenen Bedingungen wurde die Überlebensrate durch Auszählen bestimmt.

2.7 Mikroskopie

2.7.1 Rasterelektronenmikropskopie

2.7.1.1. Kritische Punkt-Trocknung

Um Zellstruktureffekte durch das Hochvakuum im Rasterelektronenmikroskop zu vermeiden, wurde eine „kritische Punkt-Trocknung“ durchgeführt. Die intakten Blätter wurden chemisch in 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd in 200 mM Na-Cacodylat-Puffer (pH 7,0) für 30 min unter Vakuum und 30 min bei Normaldruck (Raumtemperatur) fixiert. Daran schloss sich ein 10 min Waschschritt in Na-Cacodylat-Puffer an. Die chemisch fixierten Blätter wurde mit 2 mL Na-Cacodylat-Puffer überschichtet. Die Entwässerung der Proben erfolgte im Exsikkator. Der wässrige Na-Cacodylat-Puffer wurde dabei durch eine steigende Acetonreihe ersetzt, um Gewebewasser zu entfernen:

Tab. 2.7.1.1: Acetonkonzentration und Einwirkungszeit in der kritischen Punkt-Trocknung.

Acetonkonzentration [v/v]	Zeit [min]
15 %	2 x 15
30 %	2 x 15
40 %	2 x 15
50 %	2 x 15
60 %	2 x 15
70 %	2 x 15
80 %	1 x 45
100 %	1 x 45

Die kritische Punkt-Trocknung erfolgte im „Critical Point Dryer, Balzers Union AG, Balzers, Liechtenstein“, in welchem das Aceton durch CO_2 ersetzt wurde. Nach Verdampfen des CO_2 bei Raumtemperatur wurden die Proben im Rasterelektronenmikroskop analysiert.

2.7.1.2 Rasterelektronenmikroskopie

Um die Blätter im Rasterelektronenmikroskop zu untersuchen, wurden die Blätter auf einen Objektträger geklebt und für 210 s im „Agar Sputter Coater, Agar Scientific Ltd., Stansted, England“ mit Gold beschichtet [Schichtstärke ca. 30 nm]. Die Analyse der Proben bei der jeweiligen Vergrößerung erfolgte im „LEO 1430VP, Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen“ Rasterelektronenmikroskop nach Anleitung des Herstellers.

2.7.2.3 Auswertung mittels ImageJ

Die Auswertung der im Rasterelektronenmikroskop erstellten Bilder erfolgte mit dem Programm „ImageJ 1.43“ (*http://rsbweb.nih.gov/ij*) nach Skalierung auf den jeweiligen Maßstab der Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme. Es wurden die Zellgrößen epidermaler Zellen [μm^2], Trichome, sowie die Spaltöffnungen untersucht.

2.7.2 Lichtmikroskopie

Die Analyse makroskopischer Strukturen erfolgte mit dem Stereomikroskop „Wild M3, Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz“ und Kaltlichtbeleuchtung mittels „PL1000, Photonic Optische Geräte GmbH & Co. KG, Wien, Österreich“. Die Analyse mikroskopischer Strukturen wurde mit dem „Axio Imager A.1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen“ bearbeitet und mit der Software AxioVision 4.7.2 (*http://www.zeiss.com/C12567BE0045ACF1/Contents-Frame/B95589134 6F EE 6F8C1256 A87004ABDF9*) ausgewertet. Trichome wurden mit dem Stereomikroskop „Wild M3, Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz“ auf einen degenerativen Phänotyp untersucht. Die Untersuchung des Palisaden- und Schwammparenchyms erfolgte mit dem „Axio Imager A.1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen“ im Hinblick auf Störungen des strukturellen Aufbaus.

2.7.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Analyse von Blattquerschnitten 11 Wochen alter Pflanzen erfolgte mit dem „Zeiss LSM 510 Meta, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena“. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit „LSM Image Browser Rel. 4.2“ (*http://www.zeiss.com/C12567BE0045ACF1/Contents-Frame/CAA2EF638EC5F0D3C1256ADF0050E2F1*).

2.8 Bioinformatische Methoden

Die Sequenzierungsdaten wurden mit BioEdit 3.3.19 (*http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/ bio-edit.html)* analysiert und ausgewertet. Um die DNA Basenfolge in die reverse komplementäre Basenfolge zu übersetzen, wurde „Reverse complement“ (*http://www.bioinformatics.org/sms/ rev_comp.html*) verwendet. Die Übersetzung von DNA-Sequenz zu Aminosäuresequenz erfolgte mit „Translate nucleotides“ *(http://hcv.lanl.gov/content/sequence/TRANSLATE/translate. html*).

Aminosäure und DNA-Sequenz Alignments wurden mit ClustalW2 (*http://www.ebi.ac.uk/Tools /clustalw2/ index.html*) berechnet. In den Nukleotid-Datenbanken des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, *http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi*) wurde mittels des „blastn“ Algorithmus nach Sequenzhomologien und -divergenzen gesucht.

3. ERGEBNISSE

3.1 Morphologie und Phänotyp

Die *rimb*-Mutanten (Heiber 2007) wurden auf Basis eines Luciferase basierten Reportergenkonstrukts auf niedrige Luciferaseaktivität nach EMS-Mutagenese selektiert (Heiber et al. 2007). Das Phänotypenspektrum reichte von leicht chlorotischen Blatträndern (*rimb3*) bis hin zu Blattphänotypen und Habitusveränderungen, wie sie bei *rimb1* und *rimb6* prägnant hervortraten. Da Aufgrund der Phänotypen ein weiteres Merkmal, neben niedriger Luciferaseaktivität, zur Kartierung der Mutationsloki vorlag, erfolgte die Auswahl der Pflanzen anhand der gezeigten Phänotypen im Vergleich zur Maternalpflanze T19-2:

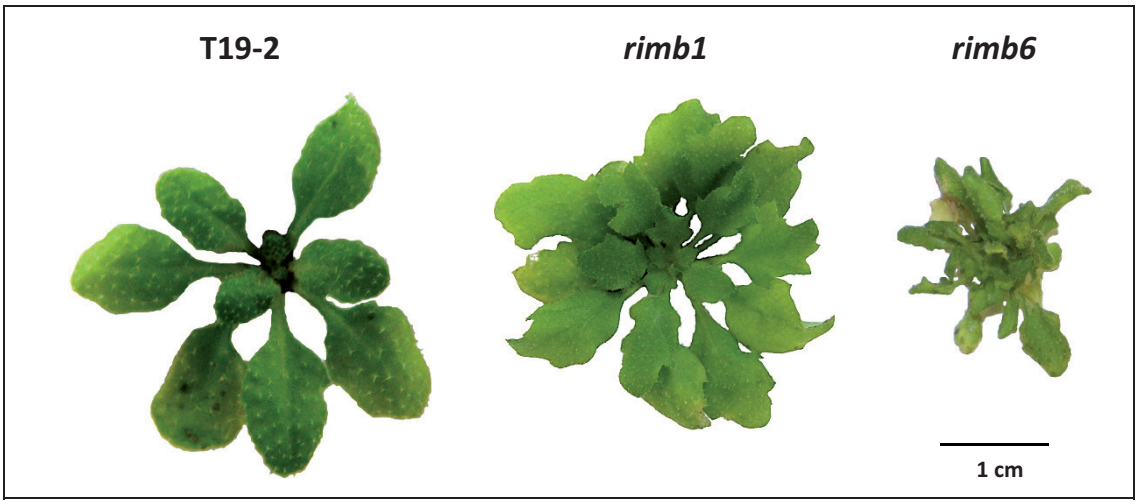


Abb. 3.1: Der Phänotyp der Maternallinie im Vergleich zu den redox gestörten Mutanten. Gezeigt sind acht Wochen alte Pflanzen, welche kurz vor Ausbildung der Sprossachse stehen.

Auffallend war ein Größenunterschied der Mutanten, insbesondere der *rimb6*, im Vergleich zu T19-2, verbunden mit einem deutlichen Blattphänotyp im Rosettenstadium. Die *rimb1* zeigen den Phänotyp erst im Laufe ihrer Entwicklung. Im Sämlingsalter waren sie nicht von T19-2 zu unterscheiden, die Kotyledonen zeigten keine Anomalien. Mit steigendem Alter entwickeln die Blätter eine starke „Wellung“, verbunden mit insgesamt verkleinerten, aber im Verhältnis zur Länge verbreiterten, Blättern. An den Rändern entwickelten sich teilweise Chlorosen.

Die Mutante *rimb6* zeigte stark degenerierte Blätter, welche in sich gedreht waren, verbunden mit einer stark verkleinerten Rosettengröße, welche nährstoffabhängig teilweise Pinnwandnadel-Kopfgröße unterschritt. Daneben traten z.T. Chlorosen auf, insbesondere beim Wechsel der Anzuchtbedingungen (Klimakammer - Gewächshaus).

Unterschiede im Zeitpunkt der Sprossachsenbildung waren nicht zu erkennen, lediglich die Anzahl der Sprossachsen zeigte bei der Mutante *rimb1* eine Tendenz zu buschartiger Ausbildung mit mehreren Sprossachsen. Die Sprossachse der *rimb6* war im Vergleich zu T19-2, analog zu einer insgesamt kleineren Ausbildung der Pflanze, in ihrer Länge auf Nährstoffmangelerde verkürzt.

3.1.1 Analyse des Rosettendurchmessers

Die Analyse des Rosettendurchmessers diente der morphologischen Untersuchung der Vitalität mutagenisierter Pflanzen im Vergleich zur Maternalpflanze und den Wildtypen und somit indirekt für die photosynthetisch aktive Blattfläche.

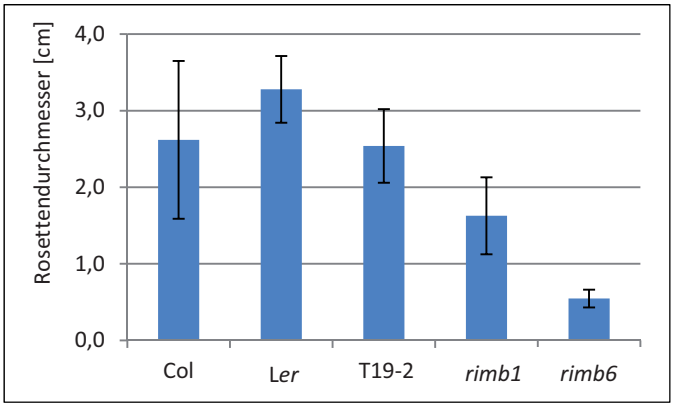


Abb. 3.1.1: Analyse des Rosettendurchmessers. *rimb1* und *rimb6* im Vergleich zur Maternalpflanze T19-2, den Ökotypen Landsberg *erecta* (L*er*) und Columbia (Col), 14 Tage nach Keimung, n ≤ 14 je Ansatz.

Erwartungsgemäß war der Rosettendurchmesser von T19-2 fast identisch mit Col. Demgegenüber standen die deutlich reduzierten Rosettengrößen von *rimb1* und die nochmals verkleinerte Rosettengröße der *rimb6*. Der Ökotyp Landsberg *erecta* zeigte einen im Vergleich zu Columbia vergrößerten Rosettendurchmesser. Es war eine deutliche Streuung individueller Rosettendurchmesser festzustellen.

3.1.2 Analyse der Wurzelstrukturen

Die Hauptwurzellänge wurde mittels „ImageJ 1.43“ (*National Institute of Health*) bestimmt, die übrigen Wurzelstrukturen wurden gemäß Armengaud et al. (2009) mit „EZ-Rhizo“ analysiert. Die Anzahl der Lateralwurzeln ergab sich aus den addierten Messwerten der pro Pflanze gemessenen EZ-Rhizo Daten.

Abb. 3.1.2.I: Analyse der Wurzelstrukturen. Die Analysen erfolgten mit 14 Tage alten Pflanzen. In dieser Aufnahme war die Hauptwurzellänge der T19-2 im Vergleich zur *rimb6* untypischer weise reduziert.

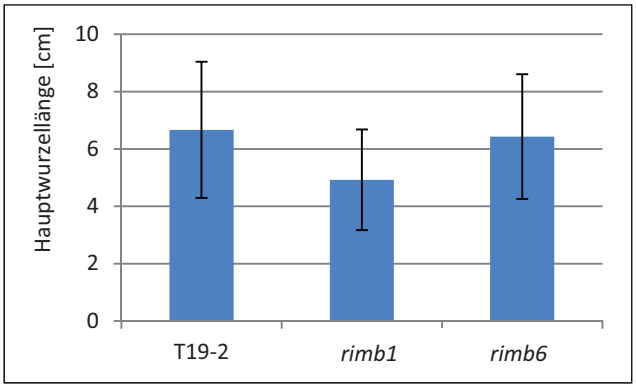
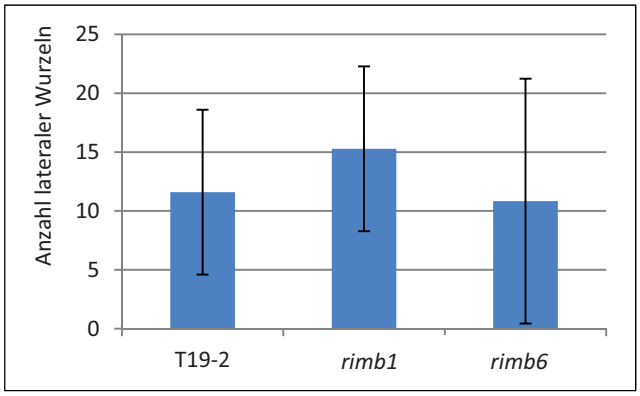


Abb. 3.1.2.II: Analyse der Hauptwurzellänge. 14 Tage nach Keimung, gemessen vom Kotyledonenansatz bis zur Wurzelspitze, n ≤ 8 je Ansatz.

Die Länge der T19-2 Hauptwurzel sowie die der *rimb6* entsprachen sich weitestgehend. Bei der vergleichenden Betrachtung fiel auf, dass die Länge der *rimb6* Hauptwurzel in einigen Pflanzen verkürzt zu sein schien, dies konnte allerdings nicht bestätigt werden. Die Hauptwurzellänge der *rimb1* war im Vergleich zur Maternallinie verkürzt.

Abb. 3.1.2.III: Anzahl der lateralen Wurzeln. 14 Tage nach Keimung, gezählt wurden alle von der Hauptwurzel abgehenden lateralen Wurzeln, n ≤ 8 je Ansatz.



Auffallend war die individuell ausgeprägte starke Varianz in der Zahl der Lateralwurzeln, insbesondere der *rimb6*, was sich in einer hohen Standardabweichung manifestierte. Konsistent mit der Beobachtung der weitestgehend identischen Hauptwurzellänge der T19-2 und *rimb6* war die durchschnittlich fast identische Zahl lateraler Wurzeln. Die Zahl lateraler Wurzeln der *rimb1* dagegen war erhöht, verglichen mit T19-2 sowie *rimb6*.

3.1.3 Bestimmung des Chlorophyllgehalts

Die Analyse des Chlorophyllgehalts erfolgte im Vergleich zu T19-2 mit Pflanzen, welche homozygot für *rimb6* kartiert wurden. Im Sämlingsalter sind die Chloroplasten der *rimb6* wildtyptypisch entwickelt, erst mit fortschreitendem Alter bilden sich strukturelle Störungen in den Thylakoiden, verbunden mit Stärkeeinlagerungen (Heiber 2007). Deshalb wurde bei einen Monat alten Pflanzen der Gehalt des Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b* bestimmt, um einen Effekt der Störungen auf die *rimb6* zu untersuchen, insbesondere im Hinblick auf das Wellenlängenspektrum des Lichts, in dem die Chlorophylle unterschiedlich absorbieren.

Tab. 3.1.3: Chlorophyllgehalt der *rimb6* im Vergleich zu T19-2. Es wurden mehreren unabhängige, mit L*er* gekreuzte, *rimb6* Linien mit T19-2 verglichen (n ≤ 8 je Ansatz). Es wurden jeweils die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung angegeben. Die Pflanzen wurden 30 Tage nach Inokulation vermessen.

Pflanze	Gesamtchlorophyll [µg/ml]	Chlorophyll *a* [µg/ml]	Chlorophyll *b* [µg/ml]
T19-2	5,45 ± 1,29	2,64 ± 0,44	2,81 ± 0,79
rimb6	4,70 ± 2,00	2,09 ± 0,80	2,61 ± 1,21

Der durchschnittliche Gesamtchlorophyllgehalt von *rimb6* im Vergleich zu T19-2 lag lediglich bei 86 %. Aufgeschlüsselt nach den einzelnen Chlorophyllen enthielt *rimb6* im Vergleich zu T19-2 nur 79 % Chlorophyll *a*, der Gehalt an Chlorophyll *b* der *rimb6* im Vergleich zu T19-2 lag bei 93 %. Auffallend war der Unterschied des Chlorophyll *a/b* Verhältnisses der *rimb6* [0,80] im Vergleich zu T19-2 [0,94], mit stärkerer Reduktion des Chlorophyll *a* Gehalts in *rimb6*. Insgesamt ließ sich eine Variation der einzelnen Werte erkennen, wie sie ebenso bei den morphologischen und anatomischen Untersuchungen festzustellen war.

3.2 Die Mutante *rimb1*

3.2.1 Kartierung der Mutante *rimb1*

Um den Erfolg der *rimb1* x L*er* Kreuzung zu überprüfen, wurde die F_1-Generation auf das phänotypische Erscheinungsbild untersucht. Aufgrund der Rezessivität des Phänotyps (Heiber 2007) waren bei erfolgreicher Kreuzung der Mutanten wildtyp-typische Phänotypen zu erwarten. Nicht wildtyp-typische Samenchargen wurden verworfen. Um den Erfolg der Kreuzung abzusichern, wurde mittels PCR auf das Vorkommen von nur in Landsberg *erecta* vorkommenden DNA Polymorphismen selektiert. Die jeweilige F_2-Samencharge wurde auf niedrig Luciferase getestet. Die Pflanzen der F_2-Generation wurden anhand des Blattphänotyps für die weitere Kartierung ausgewählt und auf Erdsubstrat in der Klimakammer bzw. im Gewächshaus angezogen. Der Aufbau der Population erfolgte stufenweise in Größen von ca. 500 - 800 Pflanzen. Die Kartierung des Chromosomenarms anhand des genetischen Merkmals „homozygot Col“ erfolgte mit einer Populationsgröße von ca. 150 Pflanzen, für die Feinkartierung wurde die Population auf 411 homozygote Pflanzen erweitert. Die Mutante *rimb1* konnte mittels SSLP-, CAPS- und Sequenzkartierungen auf den oberen Arm von Chromosom 1, zwischen die Marker „T12O21-40985“ [11.507 kb] und „cer474250“ [11.673 kb], in einen Bereich mit 35 Genen kartiert werden. Als Kartierungsmerkmal der 411 homozygot bestimmten Pflanzen wurde der Blattphänotyp verwendet, der mit einer Penetranz von 15 % bis 22 % in den segregierenden Populationen auftrat. Es wurden alle Chromosomenarme, mit Ausnahme des oberen Arms von Chromosom 4, welcher aufgrund seiner geringen Größe nur schlecht mit der von Jander et al. (2002) beschriebenen Kartierungsmethode untersucht werden kann, mit ein bis zwei Markern getestet. Hinweise auf einen weiteren Mutationslokus waren nicht zu erkennen.

Nach Identifikation des oberen Arms von Chromosom 1 als Mutationslokus wurde der kartierte Bereich durch den Einsatz von 26 weiteren Markern auf einen Bereich von 167 kb eingeengt. Die anschließende Datenbankanalyse (*http://www.arabidopsis.org*) deutete auf ein Gen, welches aufgrund seiner Annotation besonders hervorstach: *CEO1* kodiert ein Protein der (ADP-ribosyl)transferase Domänen Subfamilie, die eine Untergruppe der WWE-Protein-Protein Interaktionsdomänen Proteinfamilie bildet. Superoxidradikale induzieren den Zelltod oder Läsionen in *ceo1* Mutanten. Ohne Stressbehandlung ist CEO1 im Nukleus lokalisiert, unter Hochsalz oder oxidativem Stress lokalisiert CEO1 im Nukleus und Cytoplasma. (*TAIR - The Arabidopsis Information Resource;* Swarbreck et al. 2007).

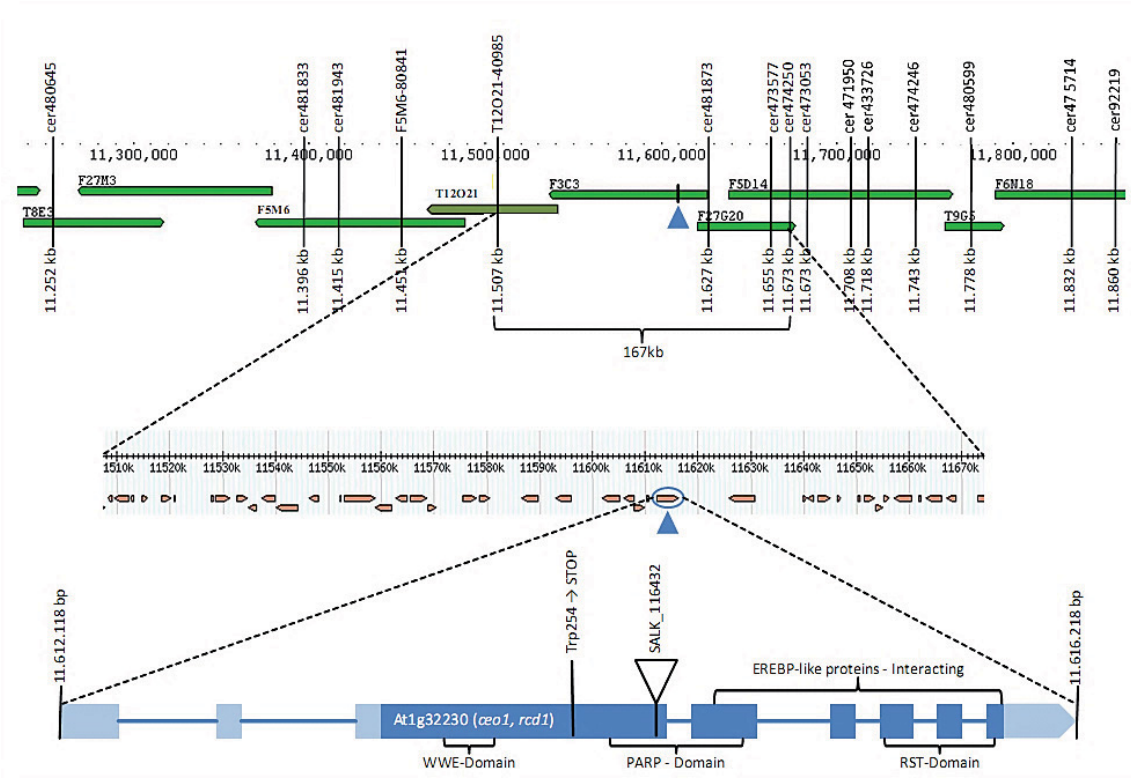


Abb. 3.2.1: Übersicht der *rimb1* Kartierung. Gezeigt ist der genomische DNA Abschnitt mit den einzelnen BACs, wie er bei „*TAIR*“ annotiert ist. Senkrecht sind die einzelnen Marker aufgetragen, welche zur Kartierung verwendet wurden. In der Bildmitte ist die Anordnung der Gene im kartierten Bereich gezeigt. Das blaue Dreieck zeigt die Lage des Gens. Unten ist der Genaufbau von At1g32230 mit den einzelnen Domänen sowie Lage der Mutation und der zugehörigen SALK T-DNA Insertionslinie gezeigt. Die „WWE-Domain“ dient der ADP-Ribosylierung und Protein-Ubiquitinierung (Aravind 2001); die „PARP-Domain“ ist in den programmierten Zelltod sowie die DNA Reparatur involviert (Yu et al. 2006); die „RST-Domain“ ist als RCD1-SRO1-TAF4 Domäne annotiert (Jaspers et al. 2009). Hellblau: die nicht kodierenden Bereiche, blauer Strich: die Intron Sequenzen, dunkelblau: Protein kodierende Abschnitte.

3.2.1.1 Sequenzierungen

Die Sequenzierung des Gens At1g32230 erfolgte in vier überlappenden Teilen, da das Gen aufgrund seiner Exon/Intron Struktur und der damit verbundenen Größe sowie der sehr starken Homologie zu *SRO1* (*SIMILAR TO RCD ONE 1*) starke Probleme bei PCR und Sequenzierung verursachte. Der Basenaustausch wurde in zwei unabhängigen Proben nachgewiesen.

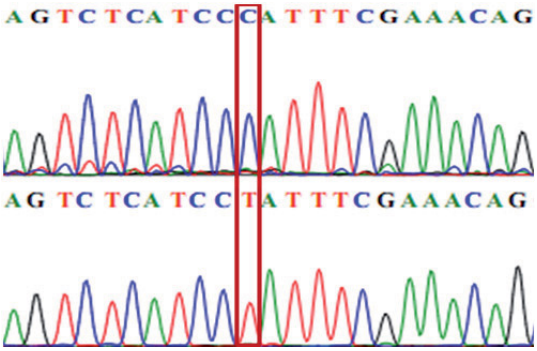


Abb. 3.2.1.1.I: Sequenzierungschromatogramm. Aufgetragen sind die revers komplementären Ergebnisse der Sequenzierungen. Oben T19-2, unten *rimb1*. Die Sequenzierung einer unabhängigen Probe bestätigte die Mutation in *rimb1*.

```
T19-2          CTCAACGATCTTCAAATGAGCACTATGACGAGGCTACGGAGGATAGCTGCAGCCGCAAGC
rimb1          CTCAACGATCTTCAAATGAGCACTATGACGAGGCTACGGAGGATAGCTGCAGCCGCAAGC
               ************************************************************

T19-2          TCGAAGCTGCTGTTTCGAAATGGGATGAGACTGATGCTATAGTCGTCTCTGGTGCCAAGC
rimb1          TCGAAGCTGCTGTTTCGAAATAGGATGAGACTGATGCTATAGTCGTCTCTGGTGCCAAGC
               *********************.**************************************

T19-2          TTACGGGAAGCGAAGTACTTGATAAAGATGCAGTAAAAAAAATGTTTGCTGTAGGCACAG
rimb1          TTACGGGAAGCGAAGTACTTGATAAAGATGCAGTAAAAAAAATGTTTGCTGTAGGCACAG
               ************************************************************
```

TGG -> TAG

Abb. 3.2.1.1.II: CLUSTAL 2.1 multiples Sequenz Alignment. Der Austausch eines Guanosins zu einem Adenin veränderte ein für Tryptophan kodierendes Basentriplett zu einem STOP-Codon.

```
T19-2       EDPKQNAPHDIKLRLEIDVNGGETPRLNLEECSDESGDNMMDDVPLAQRSSNEHYDEATE 240
rimb1       EDPKQNAPHDIKLRLEIDVNGGETPRLNLEECSDESGDNMMDDVPLAQRSSNEHYDEATE 240
            ************************************************************

T19-2       DSCSRKLEAAVSKWDETDAIVVSGAKLTGSEVLDKDAVKKMFAVGTASLGHVPVLDVGRF 300
rimb1       DSCSRKLEAAVSK-DETDAIVVSGAKLTGSEVLDKDAVKKMFAVGTASLGHVPVLDVGRF 299
            ************* ***********************************************

T19-2       SSEIAEARLALFQKQVEITKKHRGDANVRYAWLPAKREVLSAVMMQGLGVGGAFIRKSIY 360
rimb1       SSEIAEARLALFQKQVEITKKHRGDANVRYAWLPAKREVLSAVMMQGLGVGGAFIRKSIY 359
            ************************************************************
```

Trp-> STOP

Abb. 3.2.1.1.III: CLUSTAL 2.0.12 multiples Sequenz Alignment. Der Vergleich auf Proteinebene zeigte, dass ein Tryptophan kodierendes Basentriplett zu einem STOP-Codon mutiert war und die Translation an dieser Stelle abgebrochen wird. Es kann kein funktionsfähiges Protein gebildet werden.

Die Mutante *rimb1* konnte auf das Gen At1g32230 (*RADICIAL-INDUCED CELL DEATH1, RCD1, CEO1*) kartiert werden. Dort war durch eine einzelne Punktmutation das Basentriplett für Trp254 in ein Stop-Codon mutagenisiert, wodurch dort die Translation abbricht. Die Überprüfung der T19-2 ergab keine genetische Veränderung im Gen At1g32230, somit konnte die Mutation auf die EMS-Mutagenese zurückgeführt werden.

3.2.1.2 Analyse der T-DNA Linie

Um eine phänotypische Analogie der im Gen At1g32230 inserierten T-DNA Linie SALK_116432 zu *rimb1* zu untersuchen, wurde die T-DNA Linie mittels PCR auf eine homologe Insertion im Gen At1g32230 überprüft und bestätigt. Ein Primer band im Genom und ergab mit dem „*left border*“ Primer der T-DNA Linie ein PCR-Produkt. Eine weitere PCR, welche mit vor und nach der T-DNA Insertion liegenden Primern erfolgte, erbrachte, dass es sich um eine homozygote Linie handelte. Fast alle homozygoten Pflanzen, die das Keimlingsstadium überlebten, zeigten einen einheitlichen Phänotyp und Habitus.

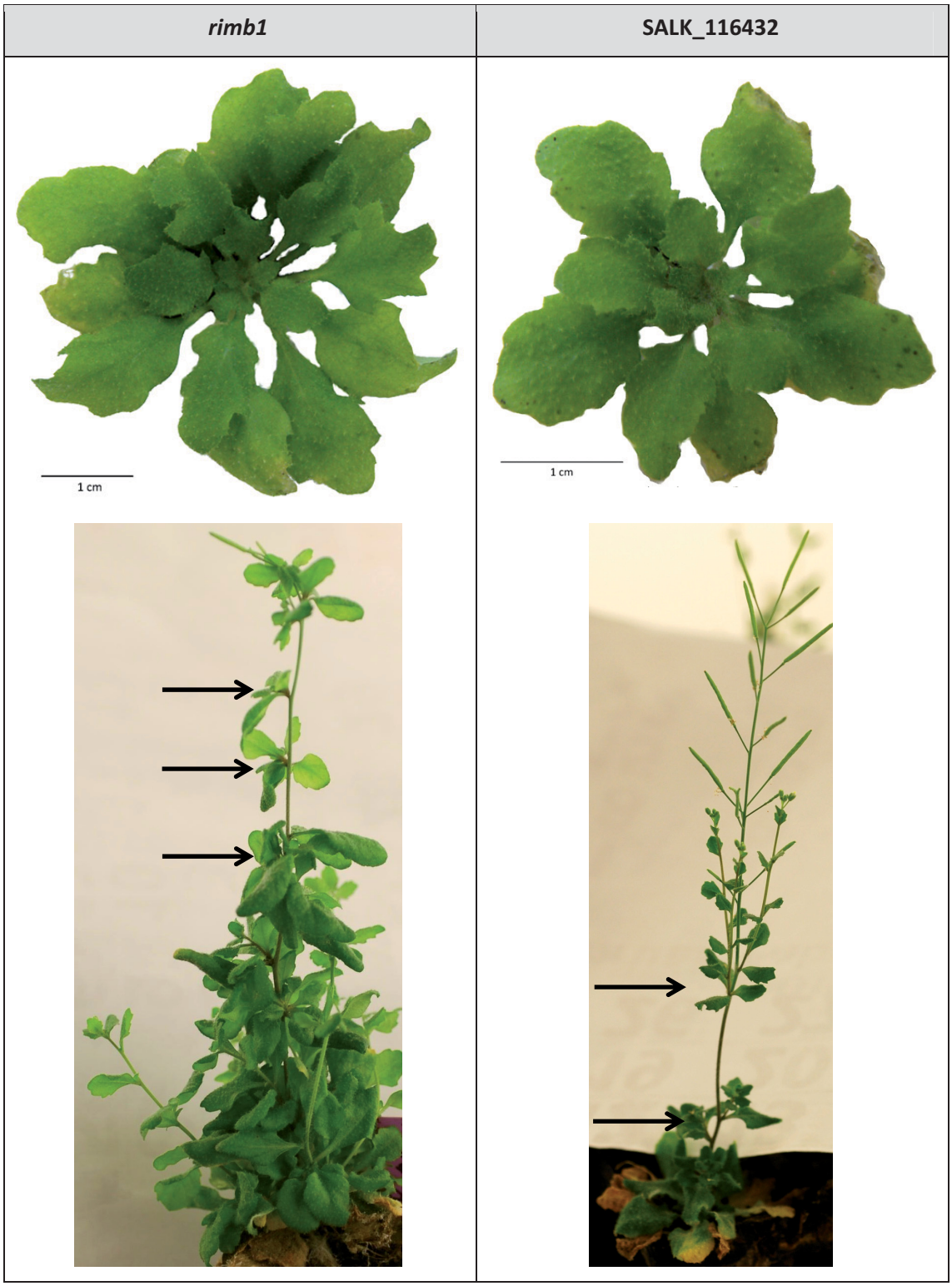


Abb. 3.2.1.2: Phänotyp der *rimb1* im Vergleich zur SALK_116432. Auffallend waren die rosettenähnlichen Blätter an der Sprossachse (schwarze Pfeile), wie sie auch von Teotia & Lamb (2009) für T-DNA Linien mit Insertion im Gen At1g32230 beschrieben wurden.

Die Phänotypen der *rimb1* und der SALK_114632, welche eine T-DNA-Insertion im Gen At1g32230 trägt, zeigten große Ähnlichkeiten: die Keimlinge entwickelten sich wildtyp-typisch, in älteren Pflanzen zeigte sich dagegen eine deutliche Wellung der Rosettenblätter, auch der

von Teotia & Lamb (2009) beschriebene Habitus mit rosettenähnlichen Blättern um die Sprossachse war für T-DNA und Mutante identisch.

3.2.2 Physiologische Untersuchungen

3.2.2.1 Jasmonsäure

Aufgrund der Annotation des kartierten Gens der *rimb1*, dass dieses in den Jasmonsäure Stoffwechsels eingreift (Jaspers et al. 2010), wurden Keimlinge auf autoklaviertem Murashige und Skoog-Medium mit 50 µM Jasmonsäure als Antagonist zu Salicylsäure (Niki et al. 1998) angezogen. Das Wachstum zeigte zwischen den Mutanten im Vergleich zur T19-2 keinen Unterschied, insbesondere im Hinblick auf Wurzellänge und -verzweigung. Auch war die Entwicklung der Keimlinge nicht beeinflusst.

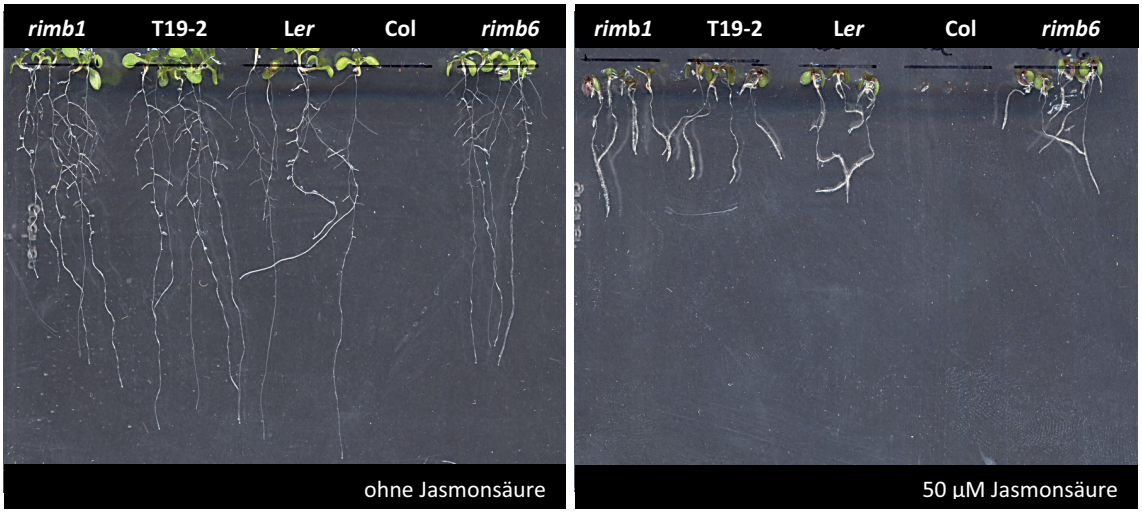


Abb. 3.2.2.1: Einwirkung von Jasmomsäure. Auswirkung der Jasmonsäure auf das Wachstumsverhalten der Mutanten *rimb1* und *rimb6* im Vergleich zu T19-2, Landsberg *erecta* (L*er*) sowie Columbia (Col).

Die Variationen im Bereich der Wurzellänge lassen sich durch eine natürliche statistische Verteilung individueller genetischer Merkmale erklären.

3.2.2.2 Reaktion auf Paraquat

Die Kartierung zeigte, dass die Mutante *rimb1* in einem Gen, welches bei Inaktivierung eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber Paraquat zeigt, kodiert ist (Ahlfors et al. 2004). Deshalb wurden T19-2, *rimb1* und die im Gen inserierte T-DNA Linie SALK_116432 mit Paraquat besprüht und die Überlebensrate als Maßstab für eine Resistenz gegenüber chemisch induzierten Hyperoxiden herangezogen.

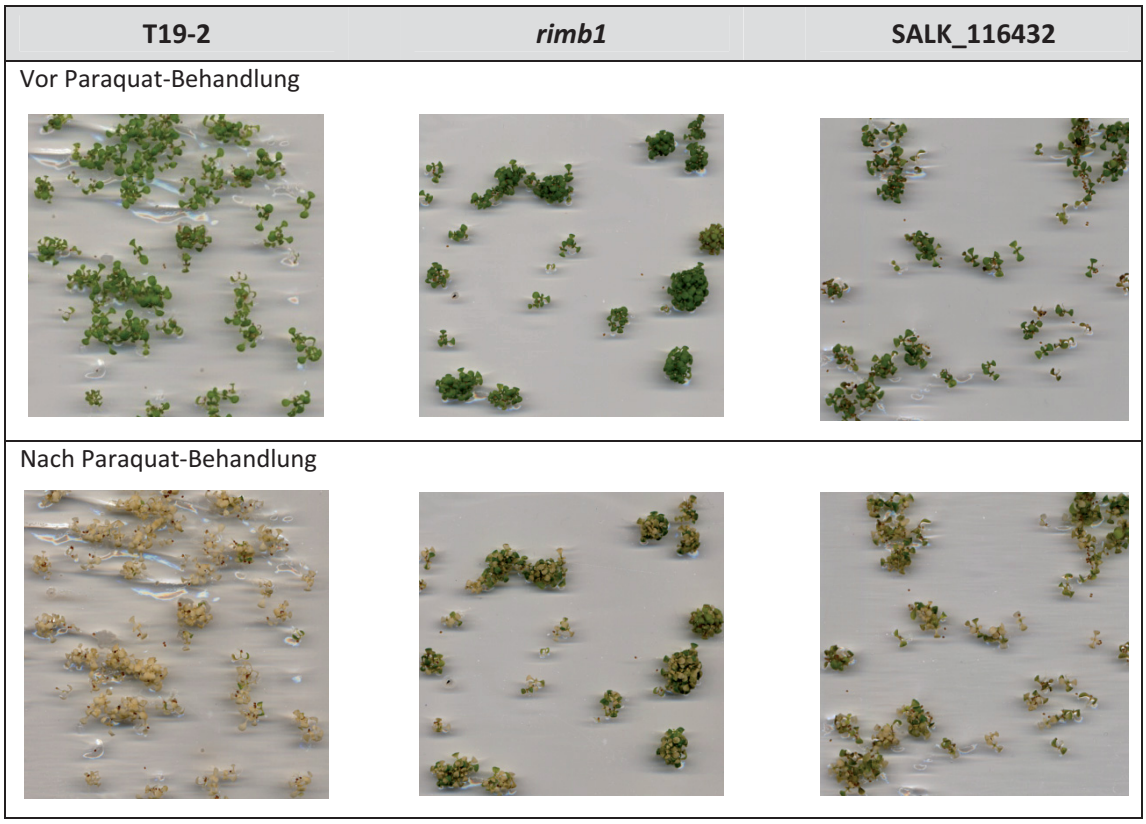


Abb. 3.2.2.2: Paraquat Sprühtest. Obere Reihe: 13 Tage alte Pflanzen vor Behandlung mit 1,5 µM Paraquat, untere Reihe: Pflanzen 5 Tage nach Behandlung mit Paraquat, n ≥ 157 je Ansatz.

Als Definition für die Überlebensrate wurden grüne Pflanzen als lebend und gebleichte Pflanzen als letal definiert.

	T19-2	SALK_116432	*rimb1*
Letale Pflanzen	211	41	72
Lebende Pflanzen	6	116	214
Gesamtzahl	217	157	286
Überlebensrate [%]	**3**	**74**	**75**

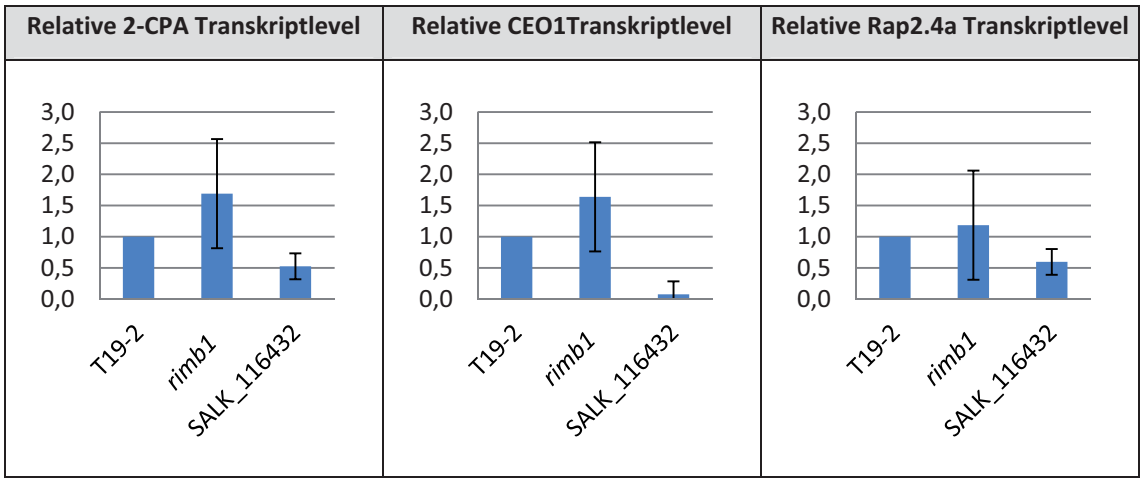
Tab. 3.2.2.2: Prozentuale Überlebensraten fünf Tage nach Paraquat Behandlung.

Die prozentualen Überlebensraten entsprachen dem annotierten Wert, wie er von Ahlfors et al. (2004) für die T-DNA Insertionslinie SALK_116432 beschrieben wurde. Die Überlebensrate von 3 % bei T19-2 lässt sich durch eine unzureichende Benetzung einiger Pflanzen erklären, da die Überlebenden T19-2 Pflanzen von anderen T19-2 überwachsen waren.

3.2.2.3 Quantitative Real-time-PCR-Analyse der 2-CPA, CEO1 und Rap2.4a Transkriptspiegel

Um den Einfluss der Mutation in *rimb1* auf Transkriptebene für *CEO1* und den interagierenden Transkriptionsfaktor *Rap2.4a* (Shaikhali 2006) auf das Zielgen *2-CPA* zu untersuchen, wurde mit einer quantitative Real-time-PCR überprüft, wie hoch die Transkriptlevel der Gene *2-CPA* (At3g11630), *CEO1* (At1g32230) und *Rap2.4a* (At1g36060) auf Basis der entsprechenden cDNA, normalisiert auf das Aktin-Gen *ACT2* (At3g18780) als internem Standard, waren. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe von Dipl. Biol. M. Mellenthin umgesetzt.

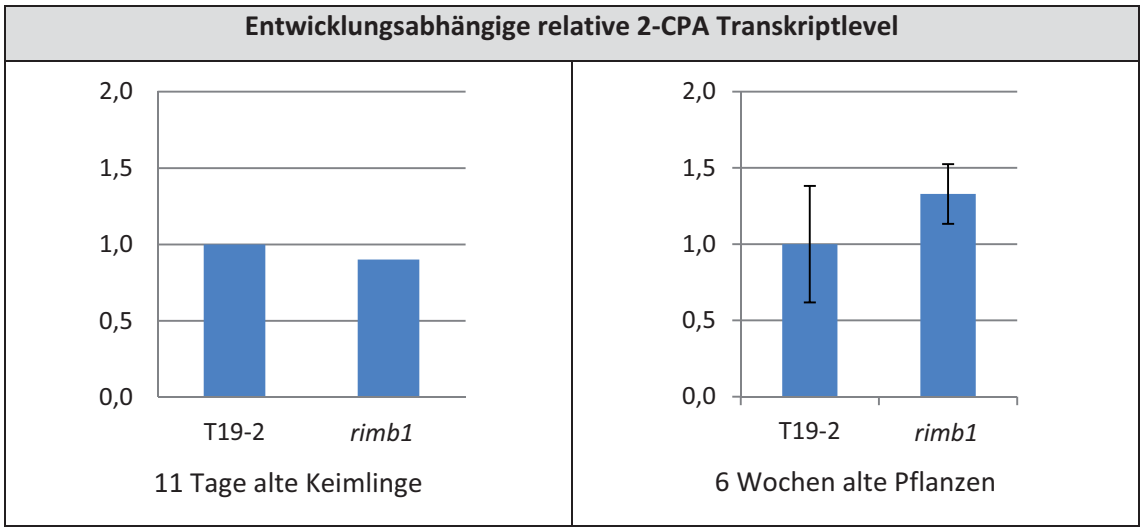
Abb. 3.2.2.3.I: Relative Transkriptniveaus der Gene *2-CPA*, *CEO1* und des *CEO1* Interaktionspartners *Rap2.4a*. Es wurden 6 Wochen alte Rosettenblätter in der qPCR vermessen. Die Transkriptlevel der T19-2 wurden jeweils auf 1 gesetzt.



Auffallend war, dass das 2-CPA Transkriptniveau der *rimb1* im Gegensatz zur T-DNA SALK_116432 bei Standardisierung auf T19-2 erhöht war. Ebenso war die Erhöhung des CEO1 Transkriptniveaus der *rimb1* bei gleichzeitiger Erniedrigung des relativen Transkriptniveaus der T-DNA Linie zu beobachten. Das relative Transkriptniveau des Gens Rap2.4a zeigte insbesondere für die *rimb1* eine deutliche Schwankungsbreite und schien sich ähnlich der zugehörigen SALK_116432 zu verhalten.

Um ein entwicklungsabhängiges Verhalten des relativen 2-CPA Transkriptniveaus zu untersuchen, wurde eine qPCR auf 11 Tage alte Keimlinge durchgeführt und mit dem Transkriptniveau in 6 Wochen alten Pflanzen verglichen.

Abb. 3.2.2.3.II: Entwicklungsabhängiges relatives 2-CPA Transkriptniveau. 11 Tage alte Keimlinge (n = 6 je Ansatz, ganze Keimlinge gepoolt) im Vergleich zu 6 Wochen alten Pflanzen (n = 3 je gepooltes biologisches Replikat, gesamte Pflanzen homogenisiert).



Auffallend war das erhöhte Transkriptniveau 6 Wochen alter *rimb1* im Vergleich zu dem erniedrigten Transkriptniveau in 11 Tage alten *rimb1* Keimlingen, jeweils im Vergleich zur parallel angezogenen Kontrolle T19-2. Das erniedrigte Trankskriptniveau der *rimb1* Keimlinge entspricht den mit dem Reportergenkonstrukt getroffenen Beobachtungen einer erniedrigten Luciferaseaktivität in *rimb1* Keimlingen.

3.2.3 Morphologisch-anatomische Analysen

Die mikroskopischen Untersuchungen sollten die Ursache der Blattphänotypen ermitteln. Deshalb wurden epidermale Strukturen, Blattstruktur sowie Trichome mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht.

3.2.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Auswertungen

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zielten auf epidermale und oberflächennahe Gewebe sowie Verteilung und Aufbau von Trichomen und Spaltöffnungen. Um Effekte des Hochvakuums im Rasterelektronenmikroskop auszuschließen, musste eine Kritische Punkt-Trocknung erfolgen, um das Gewebewasser zu entfernen. Den nachfolgenden Aufnahmen ging deshalb immer eine Kritische Punkt-Trocknung voraus.

3.2.3.1.1 Trichome und Mittelrippe

Wie anhand der Bilder zu erkennen, waren fast alle Trichome der Maternalpflanze T19-2 gleichmäßig wildtyp-typisch entwickelt. Diese Beobachtungen konnten auch für *rimb1* getroffen werden, die Trichome waren bis auf vereinzelte Ausnahmen wildtyp-typisch entwickelt. Im Hintergrund sind bei *rimb1* (Abb. 3.2.3.1.1.II) furchenartige Störungen der Epidermis zu erkennen, diese fehlen bei T19-2.

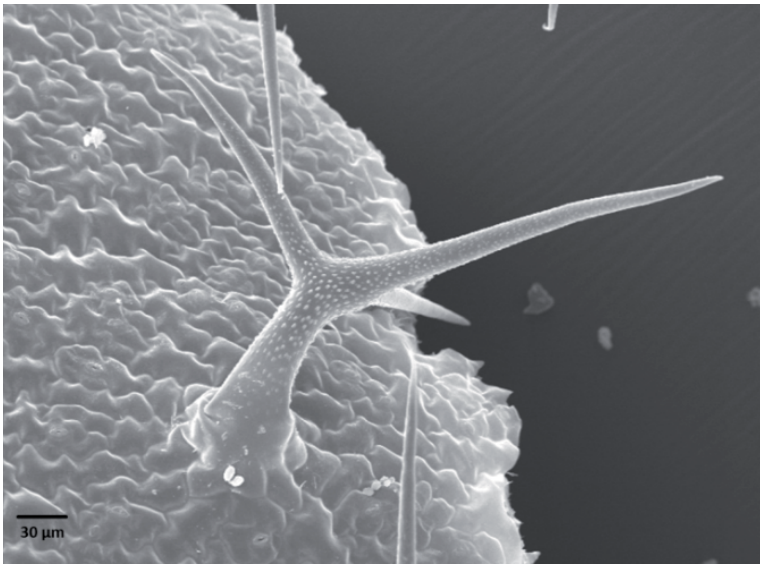
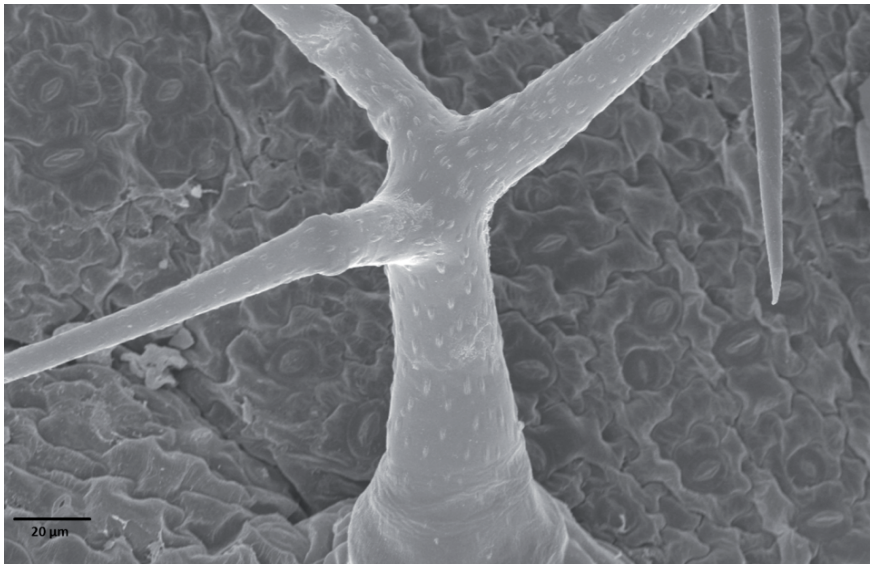


Abb. 3.2.3.1.1.I: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines T19-2 Trichoms.

Abb. 3.2.3.1.1.II: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines *rimb1* Trichoms der Blattunterseite.



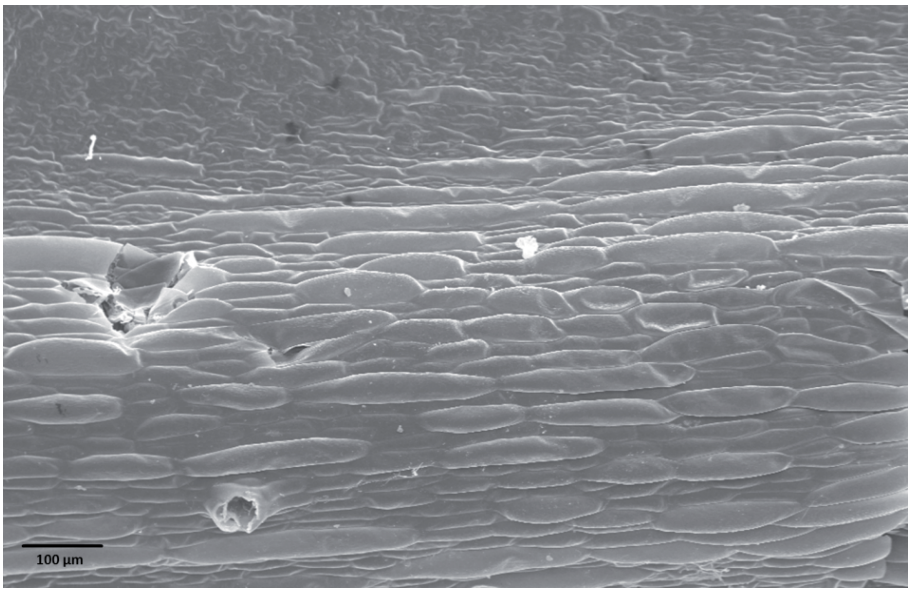
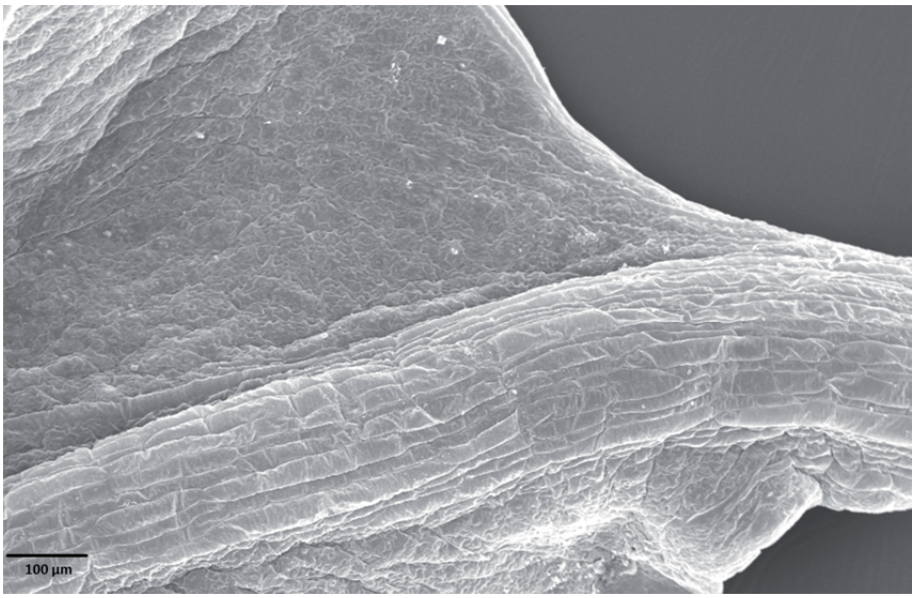


Abb. 3.2.3.1.1.III: T19-2 Blattunterseite mit Mittelrippe.

Abb. 3.2.3.1.1.IV: *rimb1* Blattunterseite mit Mittelrippe.



Weder bei der Maternalpflanze T19-2 noch bei *rimb1* waren Anomalien im Aufbau der Mittelrippe zu erkennen. Die Störung im linken Bildbereich in Abb. 3.2.3.1.1.III war ein Präparationsartefakt.

In der Mutante *rimb1* konnten weder Störungen in Aufbau und Struktur der Trichome noch Anomalien im Bereich der Mittelrippe beobachtet werden.

3.2.3.1.2 Epidermaler Aufbau

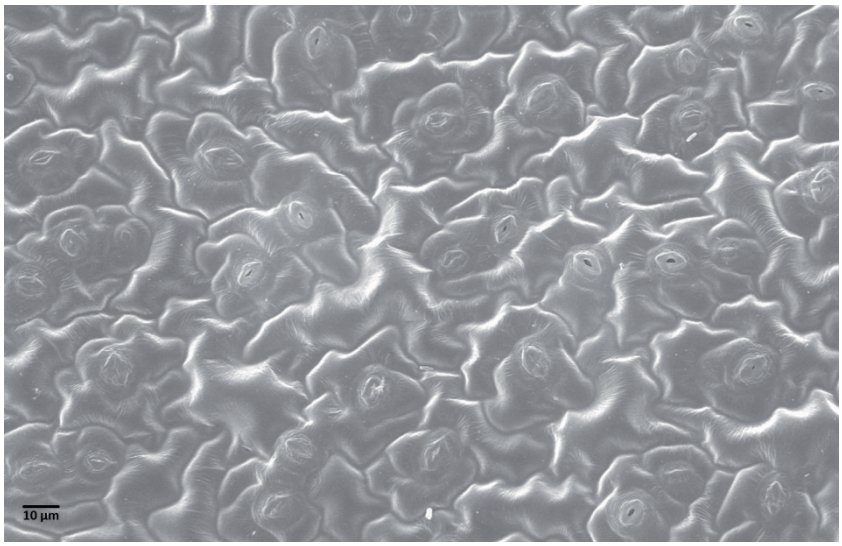
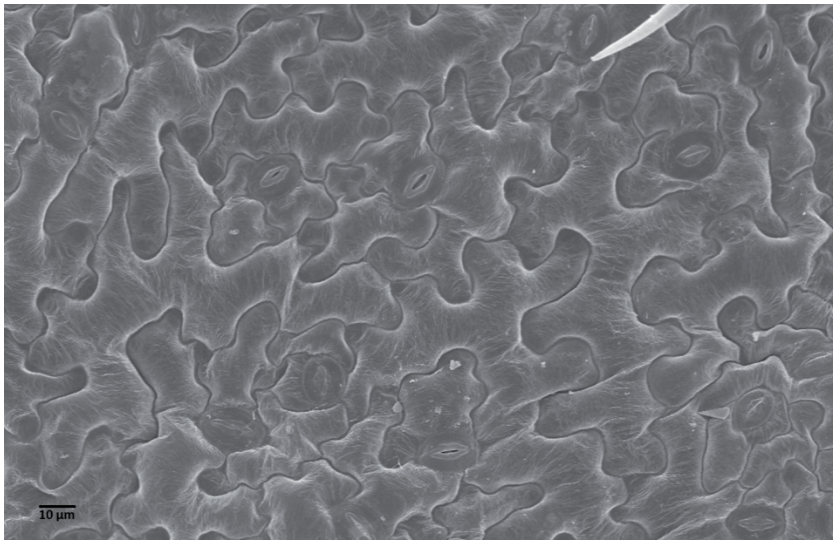


Abb. 3.2.3.1.2.I: T19-2 Blattoberseite mit Spaltöffnungen.

Abb. 3.2.3.1.2.II: *rimb1* Blattoberseite.



Die Stomata der T19-2 waren gleichmäßig über das Gewebe verteilt, auch die Zellgrößen sind weitgehend einheitlich. Auffallend in *rimb1* waren einige sehr große epidermale Zellen, welche fast die halbe Aufnahme durchzogen. Bei *rimb1* sind an der Blattoberseite keine epidermalen Störungen wie in Abb. 3.2.3.1.1.II zu erkennen.

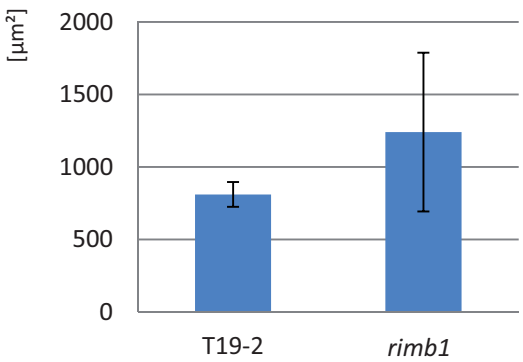


Abb. 3.2.3.1.2.III: Durchschnittliche Zellgröße der Epidermis im Vergleich zur Maternalpflanze T19-2.

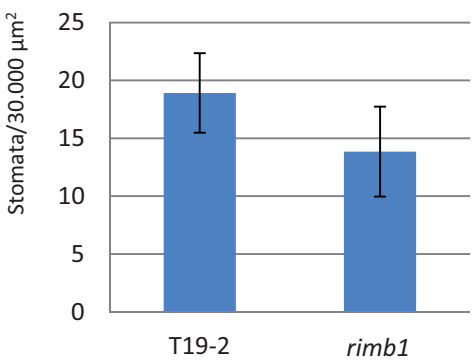


Abb. 3.2.3.1.2.IV: Zahl der Stomata, bezogen auf 30.000 µm².

Die durchschnittliche epidermale Zellgröße der Mutanten wich von der der T19-2 ab. Die *rimb1* zeigte eine deutliche Vergrößerung epidermaler Zellen, wohingegen in *rimb6* eine Verkleinerung der Zellen zu erkennen war. Insgesamt war eine hohe Varianz der Zellgrößen vorhanden, wie anhand der Standardabweichung in *rimb1* zu erkennen.

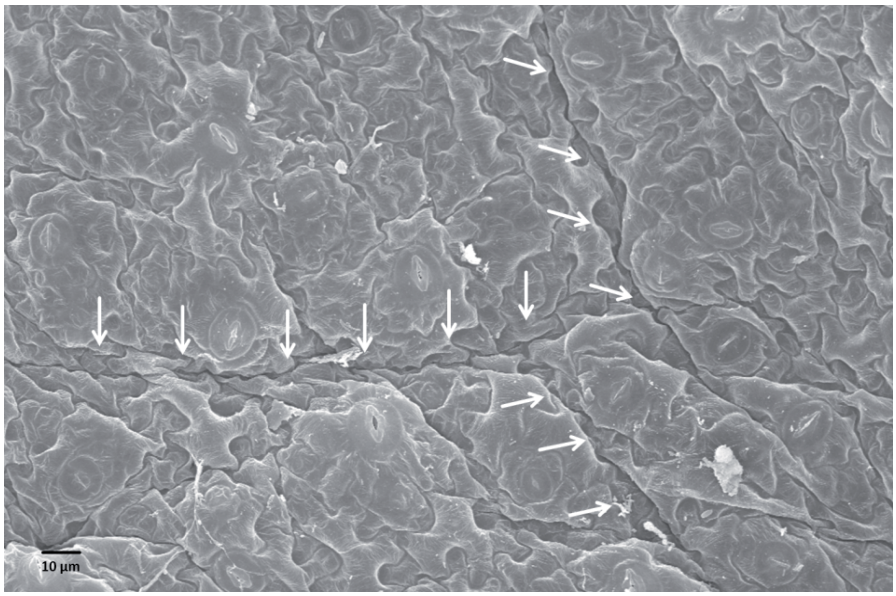


Abb. 3.2.3.1.2.III: *rimb1* Blattunterseite mit starken epidermalen Störungen. Weiße Pfeile zeigen die epidermalen Störungen, die sich furchenartig durch die Unterseite des Blattes zogen.

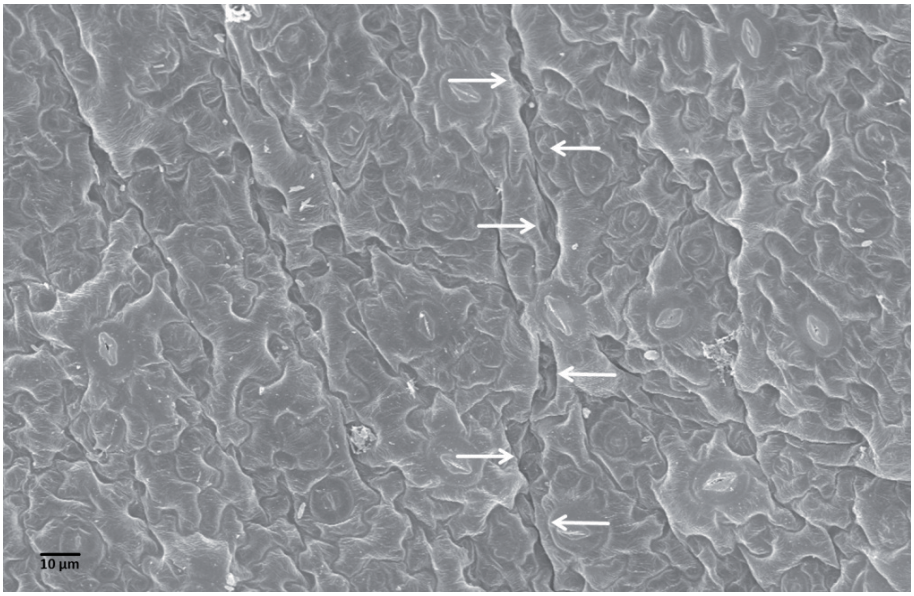


Abb. 3.2.3.1.2.IV: *rimb1* Blattunterseite. Auch hier waren die epidermalen Störungen zu erkennen (weiße Pfeile).

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten eine epidermale Störung bei *rimb1*, die sich in Form von kanalartigen Furchen durch die Epidermis zogen, allerdings nur an der Blattunterseite (Abb. 3.2.3.1.2.III und -IV). Diese Strukturveränderungen konnten nur bei der Mutante *rimb1* eruiert werden, sie fehlten bei *rimb6* und T19-2. Die Spaltöffnungen waren gleichmäßig über das Blattgewebe verteilt, bei *rimb1* war die Zahl der Stomata im Vergleich zu T19-2 reduziert (Abb. 3.2.3.1.2.IV). Diese Reduktion konnte auch für *rimb6* beobachtet werden.

3.3 Die Mutante *rimb6*

3.3.1 Kartierung der Mutante *rimb6*

3.3.1.1 Segregationsanalyse

Um den Erfolg der *rimb6* x L*er* Kreuzung zu überprüfen, wurde die F_1-Generation auf das phänotypische Erscheinungsbild untersucht. Aufgrund der Rezessivität des Phänotyps (Heiber 2007) waren bei erfolgreicher Kreuzung der Mutanten wildtyp-typische Phänotypen zu erwarten. Nicht wildtyp-typische Samenchargen wurden verworfen. Um den Erfolg der Kreuzung abzusichern, wurde mittels PCR auf das Vorkommen von nur in Landsberg *erecta* vorkommenden DNA Polymorphismen selektiert. Die jeweilige F_2-Samencharge wurde auf niedrig Luciferase getestet. Samen von F_2-Pflanzen, welche phänotypisch für die *rimb6* Mutation homozygot identifiziert waren, wurden steril auf Mikrotiterplatten ausgesät und ihre Luciferaseaktivität im Vergleich zur Positivkontrolle T19-2 gemessen, um das Segregationsverhalten des Blattphänotyps mit niedrig Luciferase zu untersuchen. Es wurden 8 Linien mit je 5 Mikrotestplatten untersucht.

Tab. 3.3.1.1: Segregationsanalyse *rimb6*. 11 Tage alte, für den Blattphänotyp homozygot identifizierte, *rimb6* Pflanzen wurden mit T19-2 auf ihre Luciferaseaktivität hin gemessen.

rimb6 Linie	Luciferaseaktivität (Mittelwert ca. 400 Pflanzen)	Luciferaseaktivität T19-2 (Mittelwert ca. 60 Pflanzen)	Luciferaseaktivität [%] *rimb6* im Vergleich zu T19-2
M41	286	4080	7
M37	164	3612	5
M24	182	4658	4
M33	133	3771	4
M32	242	4697	5
M28	313	5917	5
M22	123	4804	3
M31	450	5012	9
Mittelwert	**237**	**4569**	**5**

Die untersuchten *rimb6* zeigten im Vergleich zur T19-2 eine deutliche Reduzierung der Luciferaseaktivität auf durchschnittlich 5 % der Werte von T19-2. Die Schaltung des Luciferasekonstrukts in T19-2 konnte gezeigt werden, nach 3,5 stündiger Verdunkelung zeigten die T19-2 Pflanzen nur noch durchschnittlich 75 % der Aktivität belichteter T19-2 (Mittelwerte aus je ca. 240 Pflanzen).

3.3.1.2 Kartierung der Mutante *rimb6*

Die Pflanzen der F_2-Generation wurden anhand des Blattphänotyps für die weitere Kartierung ausgewählt und auf Erdsubstrat in der Klimakammer bzw. im Gewächshaus anzogen. Der Aufbau der Population erfolgte stufenweise in Größen von ca. 400 - 700 Pflanzen. Die Kartierung des Chromosomenarms erfolgte mit einer Populationsgröße von ca. 140 Pflanzen, für die Feinkartierung wurde die Population auf 330 homozygote Pflanzen erweitert.

Der Mutationslokus der Mutante *rimb6* konnte auf den unteren Arm von Chromosom 4, zwischen die BACs FCA9 und F15J5 kartiert werden. Als Kartierungsmerkmal der 330 „homozygot Col“ Pflanzen wurde der Blattphänotyp verwendet, der mit einer Penetranz von 7 % bis 22 % in den segregierenden Populationen auftrat. Hinweise auf einen weiteren Mutationslokus waren nicht zu erkennen. Mit ein bis zwei Markern wurde jeder Chromosomenarm, mit Ausnahme des oberen Arms von Chromosom 4, auf den Mutationslokus getestet. Nach Identifikation des unteren Arms von Chromosom 4 als Mutationslokus wurde der kartierte Bereich durch den Einsatz von 28 weiteren Markern auf einen Bereich von 114 kb eingeengt. In diesem Bereich lokalisieren 26 Protein kodierende Gene, eine tRNA und drei Pseudogene. Keines der Gene zeigte in der Annotation von „*TAIR*“ eine besondere Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), deren Entgiftung oder der Signaltransduktion. Die Analyse im „eFP-Browser“, basierend auf Microarraydaten des „ATH1 GeneChip“, (Geisler & Geisler Lee, Popescu et al. 2007, Popescu et al. 2009; *http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi*) zeigte das Gen At4g17770 im erweiterten kartierten Bereich als 2-CPA Interaktionspartner.

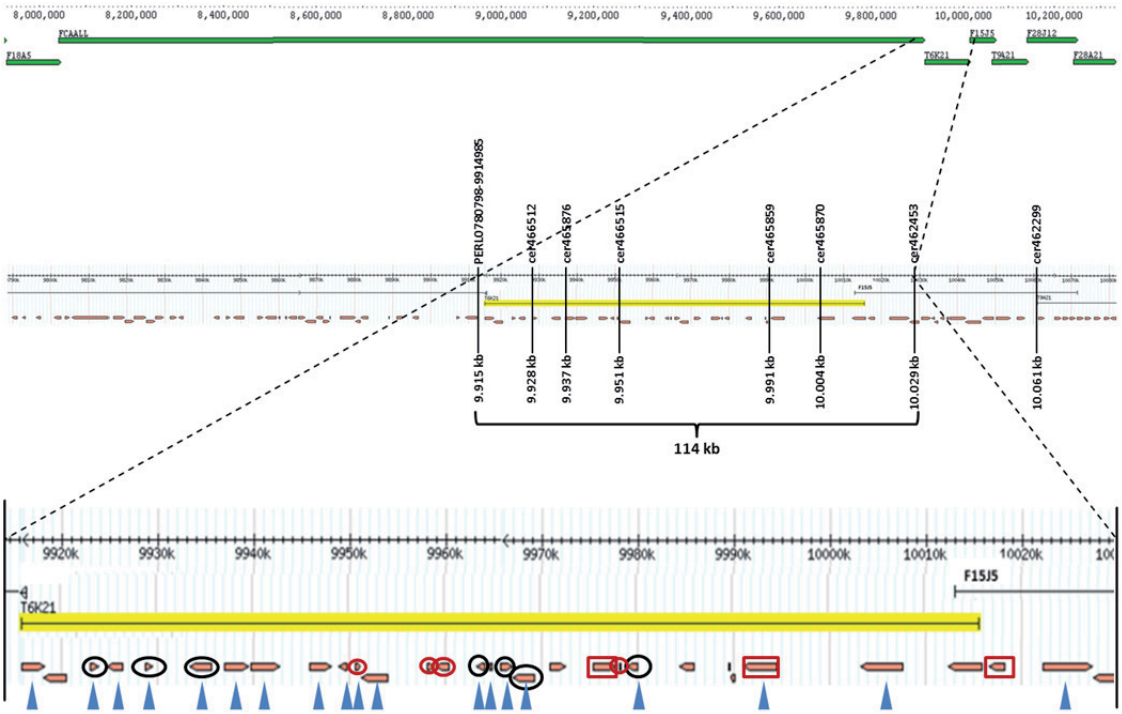


Abb. 3.3.1.2: Übersicht der *rimb6* Kartierung. Gezeigt ist der genomische DNA Abschnitt mit den einzelnen BAC's, wie er bei „*TAIR*“ annotiert ist. Senkrecht sind die einzelnen Marker aufgetragen, welche zur Kartierung verwendet wurden. Die Mutation konnte in einen 114 kb Bereich mit 30 Genen begrenzt werden. Schwarze Kreise zeigen Gene, welche für eine Mutation negativ sequenziert wurden, rote Kreise bezeichnen tRNA kodierende und Pseudogene. Hellblaue Dreiecke bezeichnen Gene, für welche T-DNA Insertionslinien auf ihren Phänotyp überprüft wurden. Rote Quadrate bezeichnen Gene, deren k.o.-Phänotyp nicht *rimb6* entsprechen (Sato et al. 2005; Sasaki et al. 2010; Robinson et al. 2004).

3.3.1.3 Analyse der T-DNA Linien

Folgende im Zielbereich liegende Gene wurden mittels T-DNA Linien auf phänotypische Analogien zum Habitus der *rimb6* visuell untersucht, da sie in den Datenbanken des „eFP-Browser“ (Winter et al. 2007) und „Atted-II“ (Obayashi et al. 2007) als 2-CPA koexprimiert annotiert wurden, in *„The Arabidopsis Information Resource“* (Swarbreck et al. 2007) mit Stress assoziiert waren, im erweiterten Bereich des kartierten Areals lagen oder im kartieren Areal (schwarz unterstrichen) lokalisierten:

At4g17070; At4g17740; At4g17750; At4g17760; At4g17765; At4g17770; At4g17785; At4g17788; At4g17800; At4g17810; At4g17830; At4g17850; At4g17860; At4g17880; At4g17890; At4g17895; At4g17900; At4g17905; At4g17908; At4g17910; At4g17920; At4g17930; At4g17940; At4g17950; At4g17980; At4g18010; At4g18020; At4g18050; At4g18100; At4g18110; At4g18120; At4g18130; At4g18140; At4g18150; At4g18170; At4g18250; At4g18260; At4g18270

Die Bezeichnung der T-DNA Linie sowie die Insertionslokalisation sind im Anhang angegeben. Keine der untersuchten Pflanzen zeigte bei steriler Anzucht und auf nährstoffarmem Erdsubstrat einen *rimb6* entsprechenden Phänotyp.

3.3.1.4 Ergebnisse des TILLING

Mit *„TILLING“* (***T**argeting **I**nduced **L**ocal **L**esions **i**n **G**enomes*) (Till et al. 2004) wurde der genomische DNA Bereich zwischen 9.915 kbp und 9.951 kbp, in Größen von 4 kbp, auf Chromosom 4 der *rimb6* untersucht. Aufgrund des starken Auftretens von Nebenprodukten in der PCR konnte nur der Bereich von 9.933.004 bp bis 9.940.603 bp ausgewertet werden. In diesem Bereich trat zunächst eine Basenfehlpaarung zwischen den Genen At4g17880 und At4g17890 auf. Dies konnte weder in einem zweiten Ansatz noch mittels Sequenzierung bestätigt werden, es muss daher von einem falsch positiven Ergebnis ausgegangen werden. Die weiteren Untersuchungen mittels *TILLING* wurden eingestellt, da es nicht möglich war, PCR-Produkte ohne Nebenprodukte zu amplifizieren.

3.3.1.5 Sequenzierungen

Nach Analyse der „eFP-Browser“ (Winter et al. 2007) und „Atted-II“ (Obayashi et al. 2007) Datenbanken wurden u.a. als 2-CPA koexprimiert annotierte Gene im erweiterten, kartierten Bereich der *rimb6* und im kartierten Bereich (schwarz unterstrichen) sequenziert:

At4g17770; At4g17810; At4g17850; At4g17870; At4g17880 (*TILLING* positiv); At4g17890 (*TILLING* positiv); At4g17920; At4g17940; At4g17950; At4g17980; At4g18170

Alle sequenzierten Gene entsprechen der Wildtyp-Sequenz von *Arabidopsis thaliana* var. Columbia. Bei den Genen At4g17880 und At4g17890 wurden nur die Bereiche sequenziert, welche im *TILLING* positiv für eine heteroduplex DNA-Struktur waren.

Das *ADP-Ribosylierungsfaktor-GAP Domäne* kodierende Gen At4g17890 und der mit Jasmonsäure interagierende Transkriptionsfaktor *MYC4* (At4g17880) wurden aufgrund ihrer im *TILLING* potentiell positiven Mutationsdetektion untersucht; ein zweites *TILLING* mit den in der PCR amplifizierten Fragmenten fiel wie die Sequenzierungen der entsprechenden Genbereiche negativ für die Mutationslokalisation aus, deshalb muss von einem falsch positiven Ergebnis des ersten *TILLING* Ansatzes ausgegangen werden.

Der Mutationslokus der *rimb6* konnte bisher mit keiner T-DNA Insertionslinie oder Sequenzierung in einem Gen lokalisiert werden.

3.3.2 Physiologische Untersuchungen

3.3.2.1 Jasmonsäure-Wachstumstest

Analog zur Mutante *rimb1*, wurden *rimb6* Keimlinge auf sterilem Murashige und Skoog-Medium mit 50 µM Jasmonsäure angezogen. Das Wachstum zeigte zwischen den Mutanten im Vergleich zu T19-2 keinen Unterschied, insbesondere im Hinblick auf Wurzellänge und Lateralwurzeln. Auch war die Entwicklung der Keimlinge nicht beeinflusst.

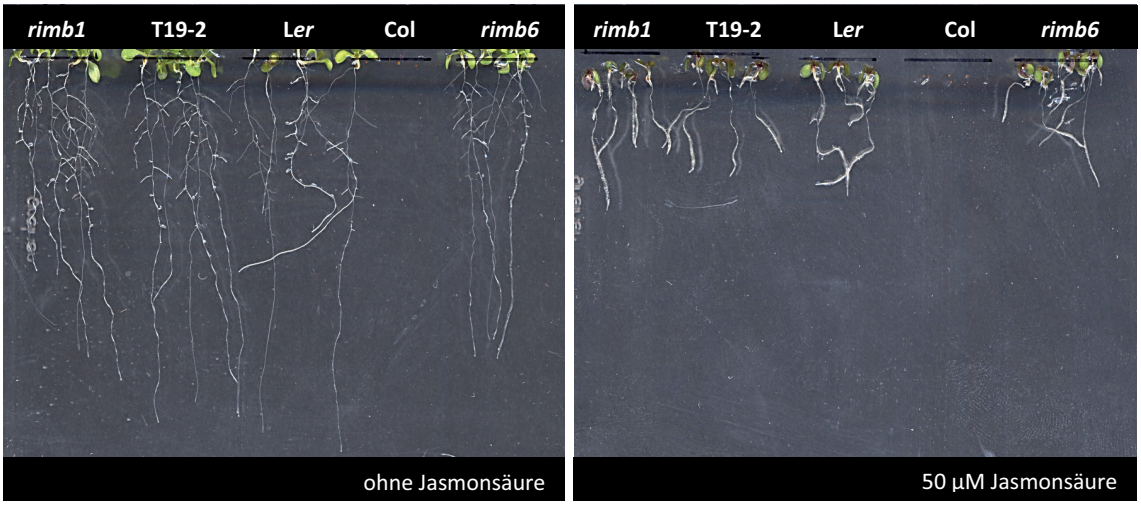


Abb. 3.3.2.1: Auswirkung der Jasmonsäure auf das Wachstumsverhalten der Mutanten *rimb1* und *rimb6* im Vergleich zu T19-2, Landsberg *erecta* (L*er*) sowie Columbia (Col).

Die Variationen im Bereich der Wurzellänge lassen sich durch eine natürliche statistische Verteilung individueller genetischer Merkmale erklären.

3.3.2.2 Salicylsäure-Wachstumstest

Um zu testen, ob Salicylsäure als Antagonist zu Jasmonsäure einen Effekt auf die Mutante *rimb6* im Vergleich zu T19-2 hat, wurden Samen auf 1 mM Salicylsäure ausgesät und analog zur Untersuchung der Nährstoffeffekte in sterilen Kulturen angezogen.

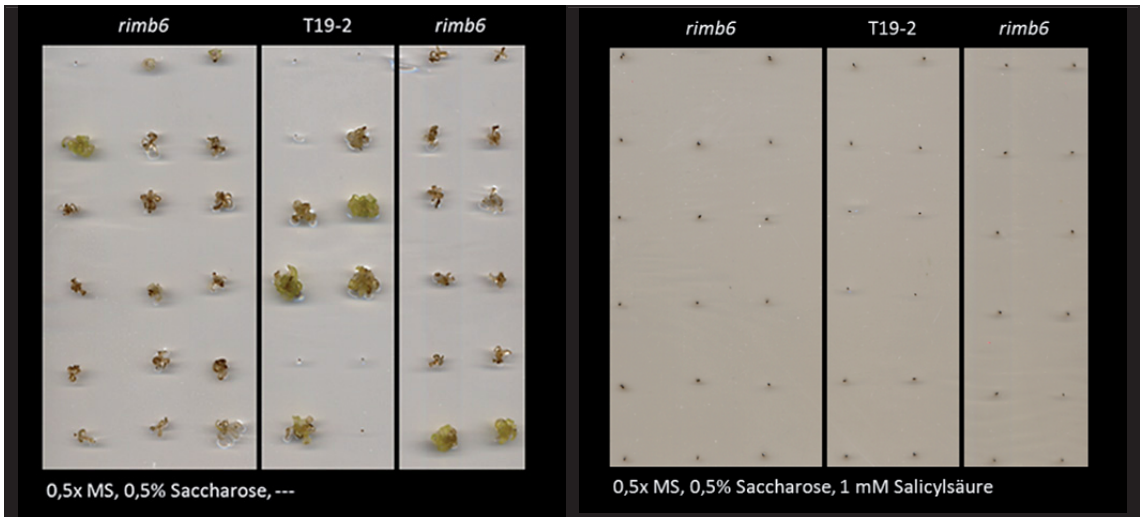


Abb. 3.3.2.2: Wirkung von Salicylsäure auf das Keimungsverhalten. Kontrolle ohne Salicylsäure (links) im Vergleich zu mit 1 mM Salicylsäure versetztem Medium (rechts).

Die Salicylsäure hatte einen keimhemmenden Effekt auf *rimb6* und Kontrolle. Zwischen T19-2 und *rimb6* waren keine Unterschiede bezüglich des Keimverhaltens zu erkennen.

3.3.2.3 Variation des Nährstoffgehalts in Erdkulturen

Nach dem Umzug der Arbeitsgruppe von der *„Universität Bielefeld“* an die *„Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“* war eine Veränderung des Blattphänotyps der Mutante *rimb6* auf nährstoffreichem Erdsubstrat zu beobachten. Die Blätter waren weniger stark verdreht, Chlorosen traten kaum auf und der Rosettendurchmesser erreichte teilweise die Größe der T19-2.

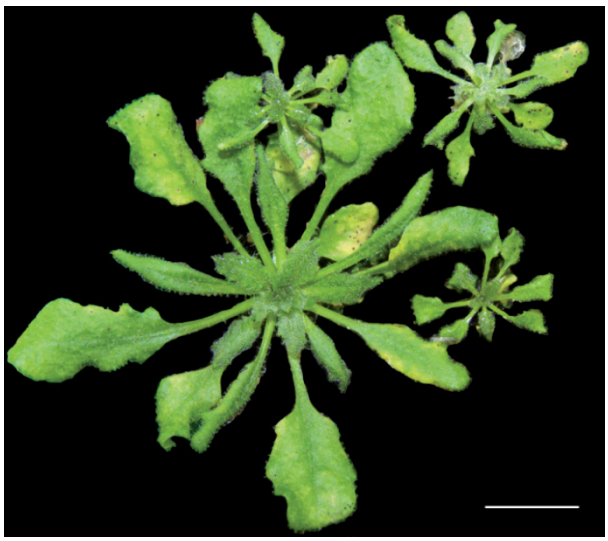


Abb. 3.3.2.3.I: Phänotypische Variationen von *rimb6* unter gleichen Anzuchtbedingungen. Mit ca. 780 mg/150 mL Volldünger/Substrat angezogene *rimb6* Pflanzen auf Erdsubstrat. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 1 cm.

Alle Pflanzen wurden in einem Topf unter gleichen Bedingungen angezogen, dennoch gab es eine deutliche Variation in der Ausprägung des Blattphänotyps, des Rosettendurchmessers und des Habitus (Abb. 3.3.2.3.I).

Basierend auf den Beobachtungen der phänotypischen Veränderung der *rimb6* wurde der Nährstoffgehalt variiert, um eine Komplementierung des Phänotyps der Mutante *rimb6* mit unterschiedlichen Nährstoffkonzentrationen zu überprüfen. Es wurden verschiedene Mengen an Volldünger zu nährstoffarmem Substrat gegeben und die Ausprägung des Blattphänotyps untersucht.

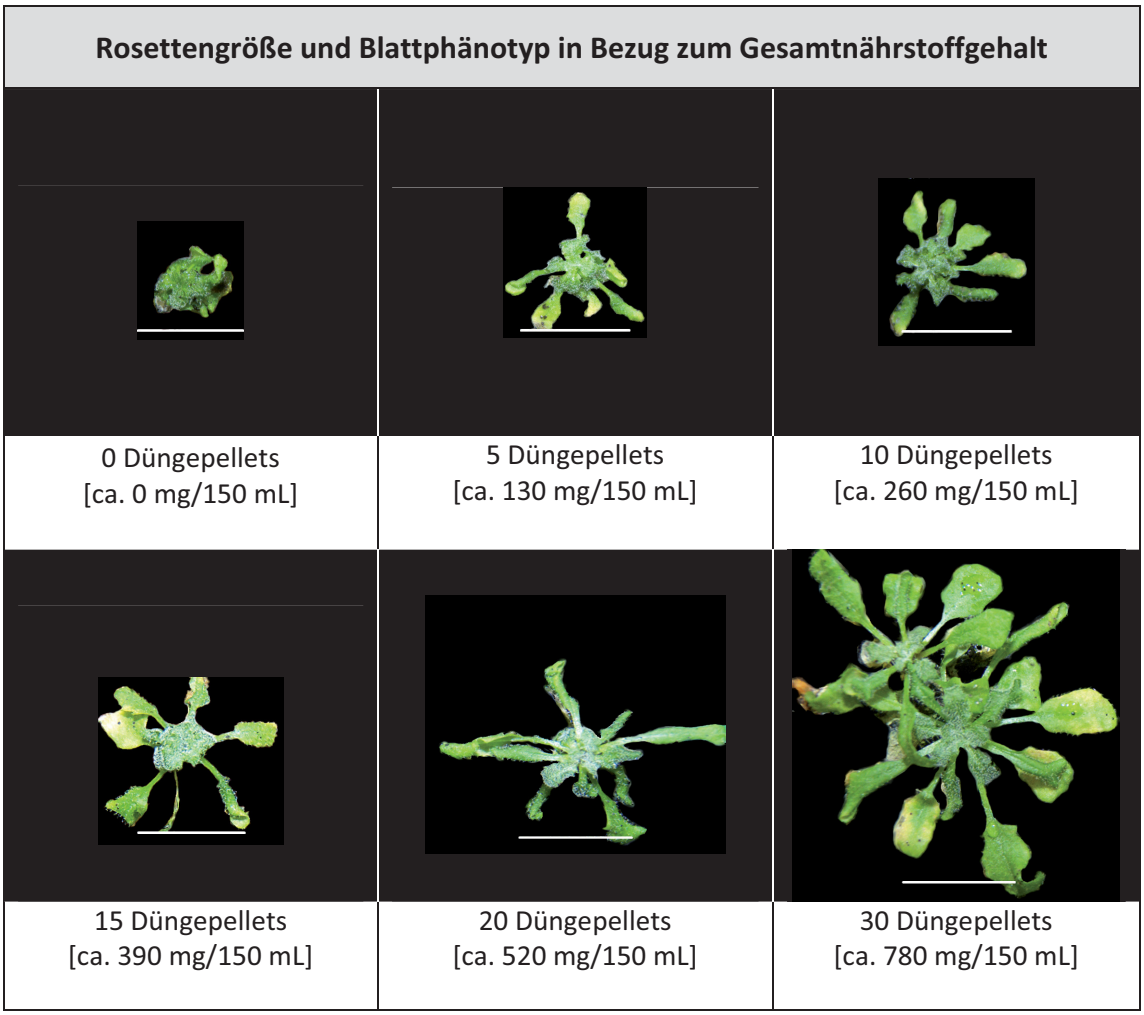


Abb. 3.3.2.3.II: Rosettengrößen in Abhängigkeit vom Gesamtnährstoffgehalt. Die weißen Maßstabsbalken entsprechen je 1 cm. Auffallend war die Veränderung des Phänotyps mit steigender Nährstoffversorgung, welcher bei Nährstoffmangel deutlicher hervortritt.

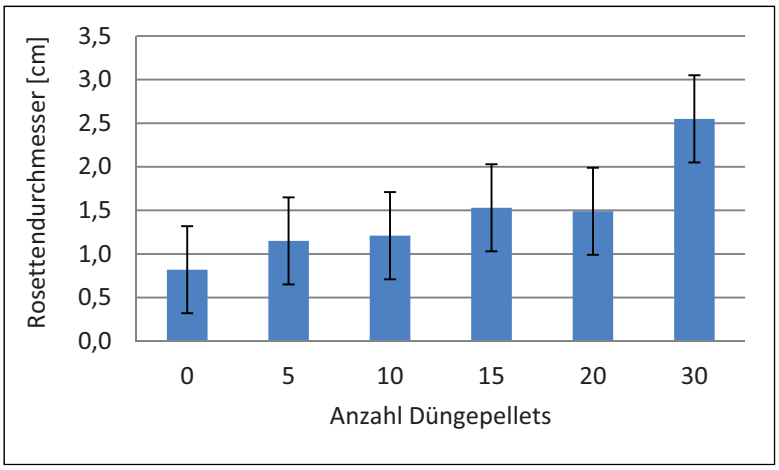


Abb. 3.3.2.3.III: Rosettendurchmesser in Abhängigkeit vom Nährstoffgehalt. Aufgetragen ist in Abhängigkeit vom Gesamtnährstoffgehalt der durchschnittliche Rosettendurchmesser, n ≤ 20 je Ansatz.

Im Mittel stieg der Rosettendurchmesser mit erhöhtem Nährstoffgehalt entsprechend einer „Dosis-Wirkungs-Kurve“ an. Ein Einfluss des Gesamtnährstoffgehalts auf den Blattphänotyp konnte bei sehr vielen Pflanzen festgestellt werden, der Blattphänotyp war mit steigender Nährstoffversorgung weniger stark bis fehlend ausgeprägt.

Um Beeinträchtigungen einzelner Pflanzen durch ungleichmäßige Verteilung der Düngerpellets im Erdsubstrat auszuschließen, wurden die Linien mit gleichmäßig verteilten Nährstoffen nochmals auf sterilem Medium verglichen (siehe 3.3.2.4 Selektive Variationen der Nährstoffe in sterilen Kulturen).

3.3.2.4 Selektive Variationen der Nährstoffe in sterilen Kulturen

Mit der selektiven Gabe von Makronährstoffen in sterilem Medium von 1,5- facher bis zur 2,5-fachen Konzentration zu 0,5 x Murashige und Skoog Medium mit 0,5 % Saccharose wurde analog zur Variation des Nährstoffgehalts in Erdkulturen unter Minimierung biotischer Stressoren untersucht, ob der Blattphänotyp der Mutante *rimb6* mit einem bestimmten Nährstoff komplementiert werden kann. Da eine Wachstumshemmung auf nährstoffarmem Erdsubstrat auftrat, wurde zuvor das Wachstumsverhalten auf ½ x MS-Medium im Vergleich zu Voll-MS-Medium bei gleicher Saccharose Konzentration untersucht.

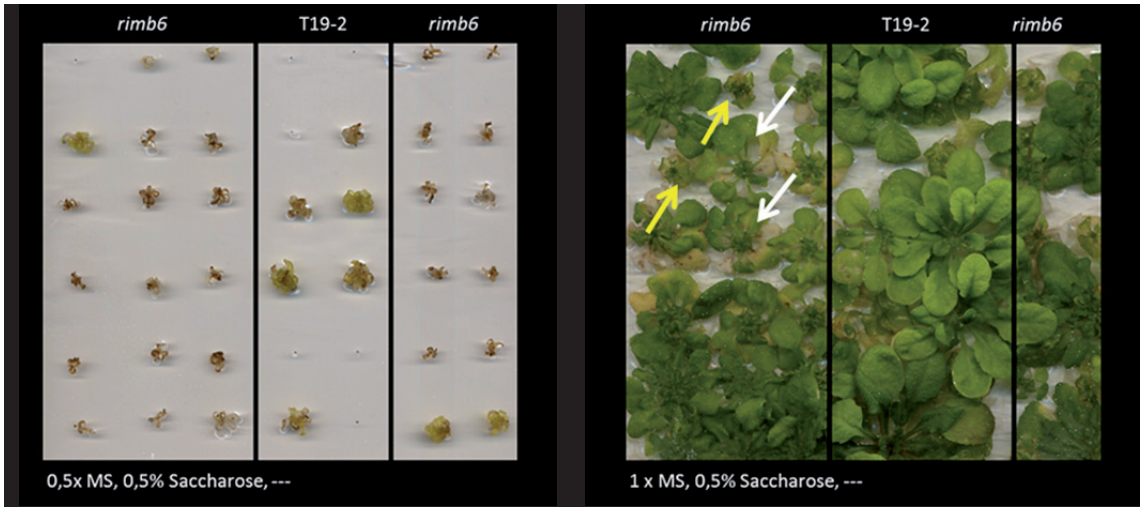


Abb. 3.3.2.4.I: Nährstofflimitierte Pflanzen im Vergleich zu Pflanzen auf vollem Nährstoffgehalt. Kontrolle mit Voll-MS-Medium [1 x] und ½ x MS-Medium ohne zusätzliche Nährstoffe und 0,5 % Saccharose. Der nährstofflimitierte ½ x MS-Medium Ansatz zeigte eine deutliche Unterversorgung der zum Wachstum benötigten Nährstoffe. Die weißen Pfeile deuten auf *rimb6* Pflanzen mit Wildtyp ähnlichem Habitus, die gelben Pfeile zeigen auf *rimb6* mit deutlichem Blattphänotyp.

Wie zu erkennen, zeigte das ½ x MS-Medium einen limitierenden Effekt auf T19-2 als auch *rimb6*. Der Habitus der *rimb6* veränderte sich im Laufe der Entwicklung unter Voll-MS-Medium zu einem Wildtyp ähnlichen Blattphänotyp (weiße Pfeile, Abb. 3.3.2.4.I), bei manchen Pflanzen dagegen war kein Einfluss auf den Phänotyp zu erkennen (gelbe Pfeile, Abb. 3.3.2.4.I). Das Voll-MS-Medium war in der Lage, die Pflanzen mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen.

Um zu überprüfen, welcher Nährstoff den beobachteten Effekt auf den Phänotyp im Voll-MS Ansatz hatte, wurden diese variiert. Die Variation der Nährstoffe basiert auf der Zusammensetzung des MS-Mediums, welches alle Makronährstoffe in optimaler Menge für das Pflanzenwachstum enthält (Murashige & Skoog 1962). Basierend auf dem Vorexperiment, bei dem mit ½ x MS-Medium eine Wachstumshemmung mit klarer *rimb6* Blattphänotyp Ausprägung sowie eine teilweise Komplementation des Blattphänotyps auf Voll-MS-Medium zu beobachten war, wurden die einzelnen Makronährstoffe im Überschuss zu ½ x MS-Medium gegeben.

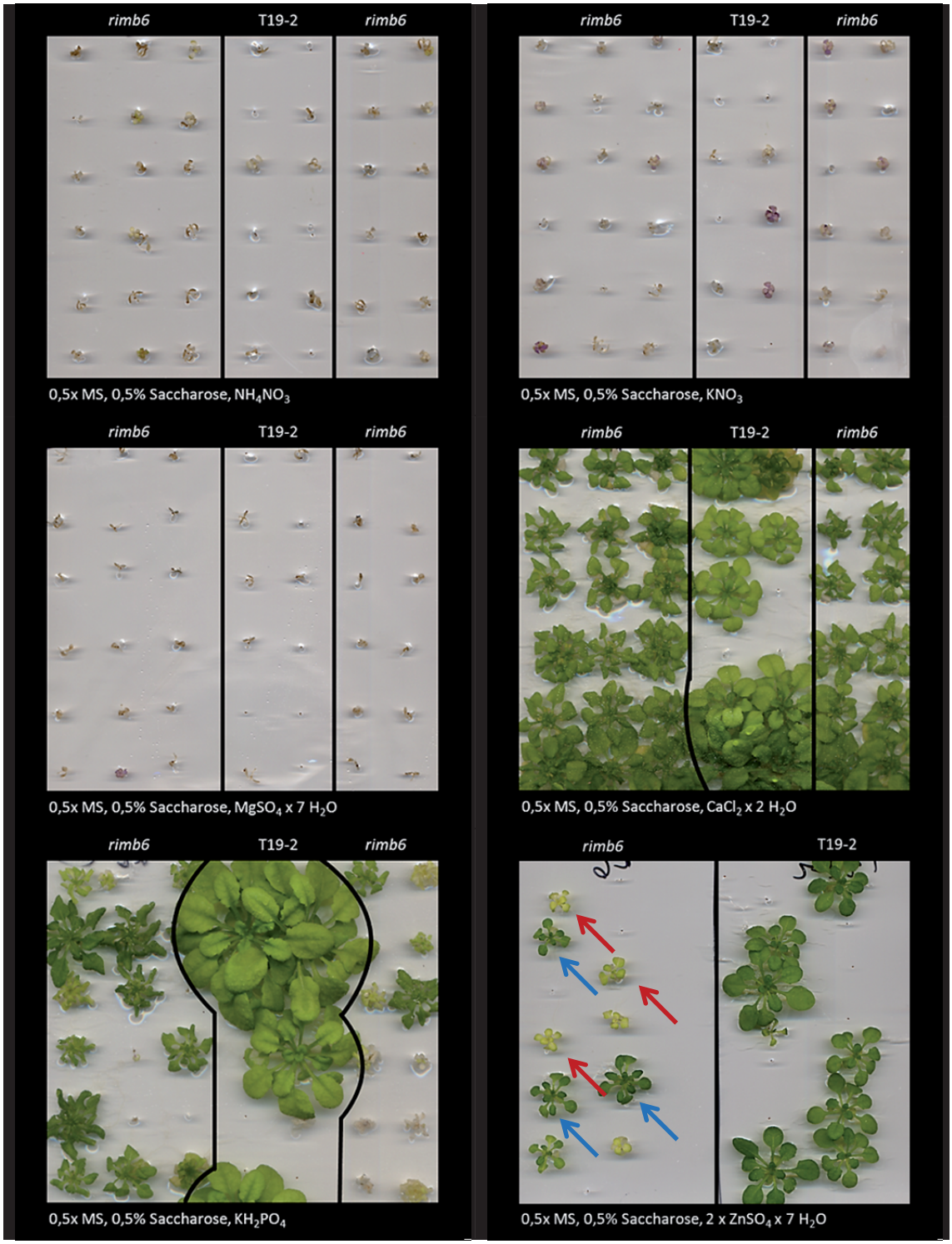


Abb. 3.3.2.4.II: Variation einzelner Nährstoffe. Einzelne Nährstoffe in 1,5-facher bzw. in 2,5-facher Konzentration ($ZnSO_4$ x 7 H_20). Einen Effekt zeigten lediglich Kaliumhydrogenphosphat, Calciumchlorid und Zinksulfat auf die Pflanzen. Rote Pfeile zeigen chlorotische Pflanzen, blaue Pfeile zeigen vollständig komplementierte *rimb6*.

Ammoniumnitrat [NH_4NO_3], Kaliumnitrat [KNO_3] und Magnesiumsulfat [$MgSO_4$] hatten keinen Einfluss auf Kontrolle und Mutante. Einen Effekt auf die Gesamtvitalität der Pflanzen hatten Calciumchlorid [$CaCl_2$], Kaliumhydrogenphosphat [KH_2PO_4] und Zinksulfat [$ZnSO_4$]. Die Versorgung mit Zinksulfat [$ZnSO_4$] hatte einen teilweise komplementierenden Effekt auf *rimb6* (blaue

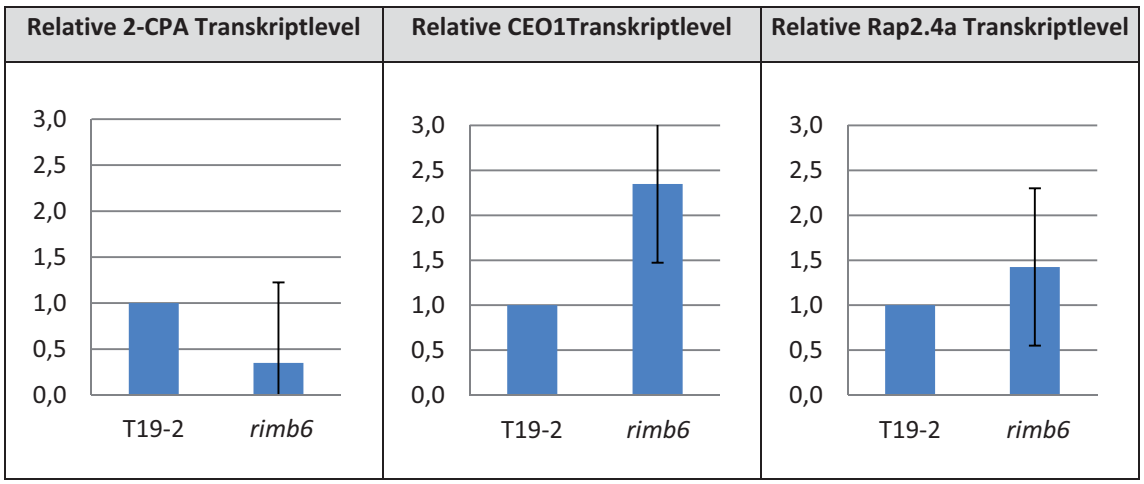
Pfeile, Abb. 3.3.2.4.II). Der typische Blattphänotyp verschwand fast vollständig, allerdings zeigten einige Pflanzen deutliche Chlorosen (rote Pfeile, Abb. 3.3.2.4.II).

Der beobachtete Effekt bei Zinksulfat [$ZnSO_4$] kann auf das Zink zurückgeführt werden, da bei Magnesiumsulfat [$MgSO_4$] kein Effekt auf die Pflanzen zu beobachten war. Es muss davon ausgegangen werden, dass Magnesium [Mg^{2+}], wie Sulfat [SO_4^{2-}], keinen Effekt auf die Mutante hatte. Da sich bei Kaliumnitrat [KNO_3] kein Effekt zeigte, muss davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Effekt vor allem auf Phosphat im Ansatz mit KH_2PO_4 beruhte. Ein Einfluss von Stickstoff, Magnesium, Schwefel und Kalium war nicht zu erkennen. Einen Effekt zeigten Phosphationen, Zinkionen und Calciumchlorid auf den Blattphänotyp der *rimb6*.

3.3.2.5 Quantitative Real-time-PCR-Analyse der 2-CPA, CEO1 und Rap2.4a Transkriptspiegel

Um einen möglichen Einfluss der Mutation in *rimb6* auf das in *rimb1* identifizierte Gen *CEO1* und den Interaktionspartner *Rap2.4a* zu überprüfen, wurde mit einer quantitativen Real-time-PCR überprüft, wie hoch die Transkriptlevel der Gene *2-CPA* (At3g11630), *CEO1* (At1g32230) und *Rap2.4a* (At1g36060) auf Basis der entsprechenden cDNA, normalisiert auf das Aktin-Gen *ACT2* (At3g18780) als internem Standard, waren. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe von Dipl. Biol. M. Mellenthin umgesetzt.

Abb. 3.3.2.5: Relative Transkriptniveaus der Gene *2-CPA*, *CEO1* und dem *CEO1* Interaktionspartner *Rap2.4a*. Es wurden 4 Wochen alte Rosettenblätter in der qPCR vermessen. Die Transkriptlevel der T19-2 wurden auf 1 gesetzt.



Das 2-CPA Transkriptniveau der *rimb6* ist im Vergleich zu T19-2 deutlich erniedrigt, wie es durch die Messungen der Luciferaseaktivität erwartet wurde. Das CEO1 Transkriptlevel ist wie das Rap2.4a Transkriptlevel erhöht.

3.3.3 Morphologisch-anatomische Analysen

Die mikroskopischen Untersuchungen sollten die Ursache der Blattphänotypen ermitteln. Da während der Kartierung der Mutante *rimb6* ein Gen, welches für die Trichom Entwicklung kodiert, als Mutationslokus in Betracht kam, wurden die Trichome mit dem Stereomikroskop auf einen degenerativen Phänotyp untersucht. Zudem wurden epidermale Strukturen sowie Trichome im Rasterelektronenmikroskop untersucht und Gewebeschnitte mittels Lichtmikroskop visualisiert.

3.3.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Auswertungen

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zielten auf epidermale und oberflächennahe Gewebe sowie Verteilung und Aufbau von Trichomen und Stomata. Während einer ersten Untersuchung erschienen die Trichome von *rimb6* stark degenerativ verändert und in sich gedreht. Diese Abnormalie konnte auf das Vakuum im Rasterelektronenmikroskop zurückgeführt werden und war kein phänotypisches Merkmal der Mutante *rimb6*. Um durch das schnelle entweichen des Gewebewassers eine Gewebedegeneration zu verhindern, erfolgte eine Kritische Punkt-Trocknung; den nachfolgenden Aufnahmen ging immer eine Kritische Punkt-Trocknung voraus.

3.3.3.1.1 Trichome und Mittelrippe

Ein Vergleich zwischen T19-2 und *rimb6* zeigte keine Anomalien in Verteilung sowie Aufbau der Trichome. In T19-2 zeigten die Trichome den typischen dreigliedrigen Aufbau des Wildtyp (Abb. 3.3.3.1.1.I), der auch bei den Trichomen der *rimb6* zu erkennen ist (Abb. 3.3.3.1.1.II).

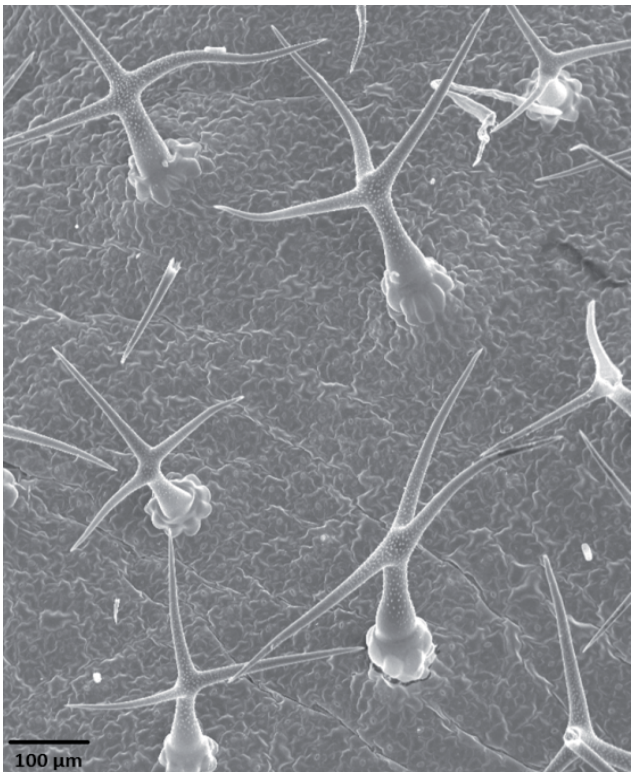
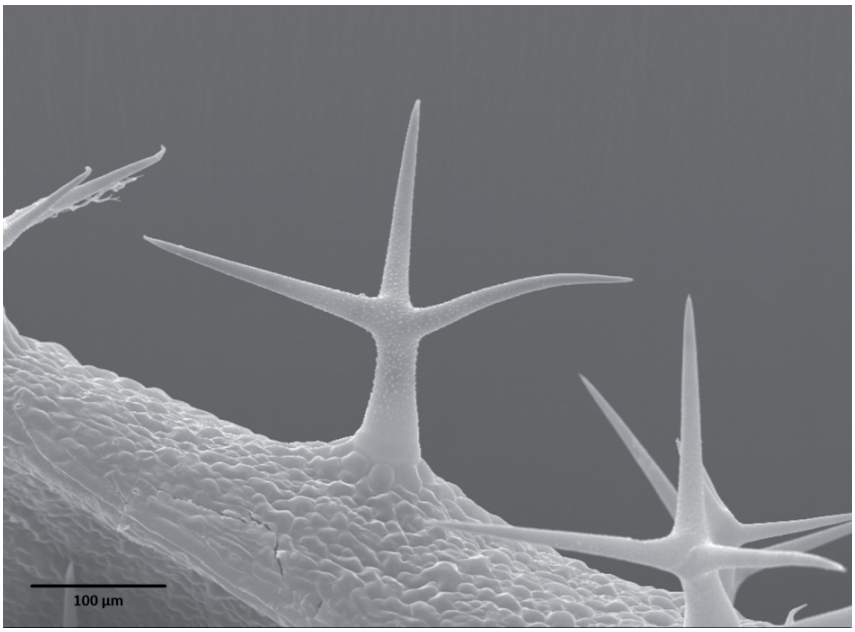


Abb. 3.3.3.1.1.I: T19-2 Trichome im Überblick auf der Blattoberseite.

Abb. 3.3.3.1.1.II: Trichome der *rimb6.*



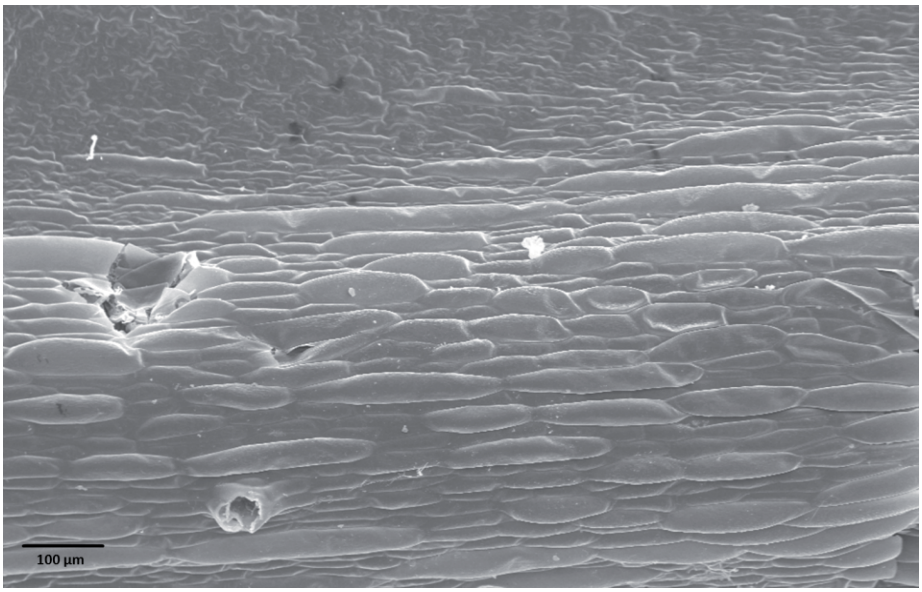
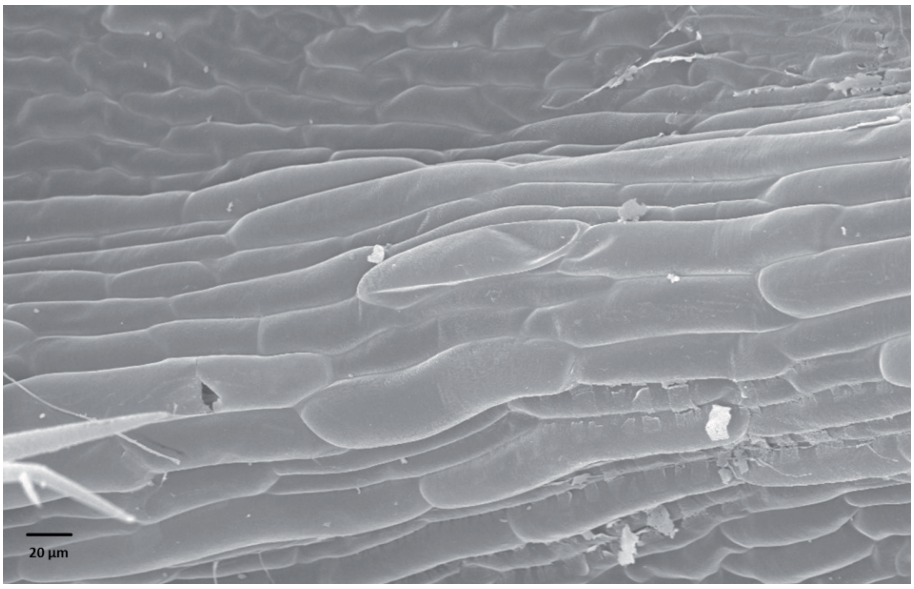


Abb. 3.3.3.1.1.III: T19-2 Blattunterseite mit Mittelrippe.

Abb. 3.3.3.1.1.IV: *rimb6* Blattunterseite mit Mittelrippe.



Wie anhand der Bilder belegt, waren keine Anomalien der Maternalpflanze T19-2 zu erkennen, die Störung im linken Bildbereich war ein Präparationsartefakt (Abb. 3.3.3.1.1.III). Die Mittelrippen der Mutante *rimb6* zeigten keine Abweichungen vom strukturellen Aufbau der T19-2 Mittelrippe. In Abb. 3.3.3.1.1.IV sind im unteren rechten Bildbereich schuppenartige Cuticularwachse zu erkennen.

3.3.3.1.2 Epidermale Strukturen

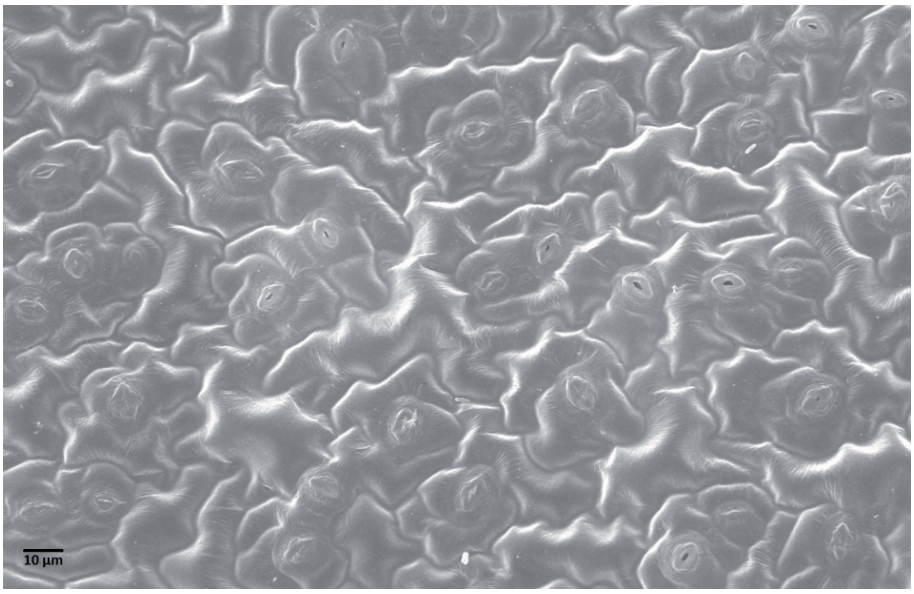
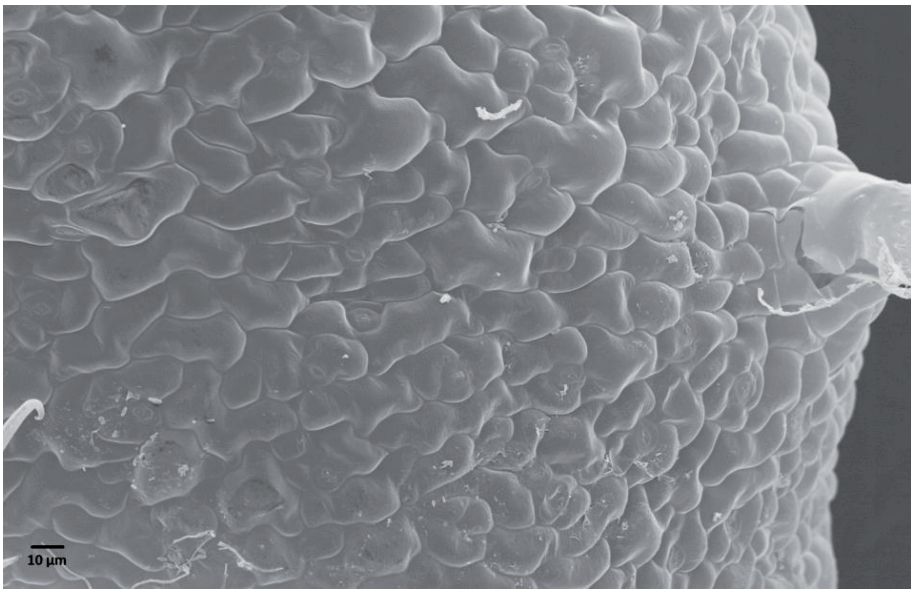


Abb. 3.3.3.1.2.I: T19-2 Blattoberseite mit Spaltöffnungen.

Abb. 3.3.3.1.2.II: *rimb6* Blattoberseite.



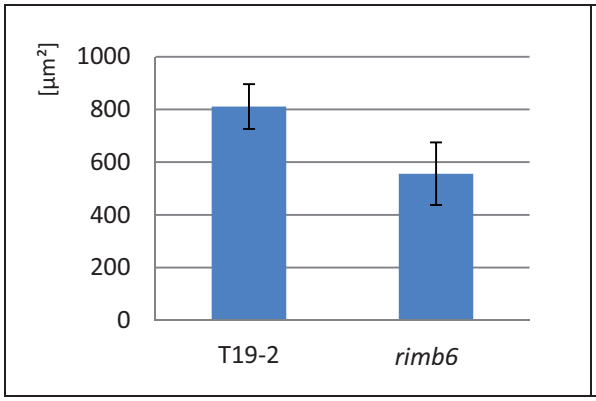


Abb. 3.3.3.1.2.III: Durchschnittliche Epidermis Zellgröße im Vergleich zur Maternalpflanze T19-2.

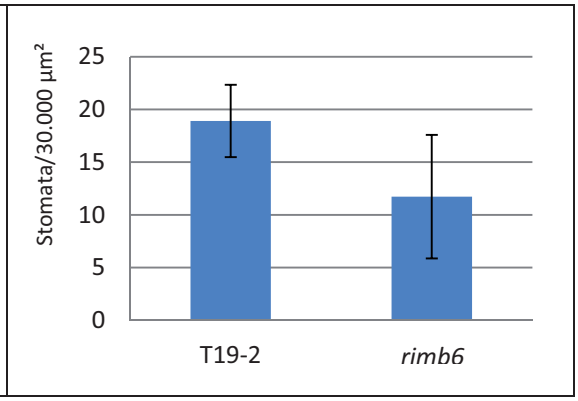


Abb. 3.3.3.1.2.IV: Zahl der Spaltöffnungen, bezogen auf 30.000 µm².

Die durchschnittliche epidermale Zellgröße der *rimb6* war im Vergleich zu T19-2 deutlich verkleinert. Die Zahl der Spaltöffnungen wurde auf eine Fläche von 30.000 µm² normiert. Die Stomata der T19-2 waren gleichmäßig über das Gewebe verteilt, die epidermalen Strukturen waren gleichmäßig. Bei *rimb6* waren keine furchenartigen epidermalen Störungen wie bei *rimb1* zu erkennen, die Zahl der Spaltöffnungen im Vergleich zu T19-2 war jedoch reduziert (Abb. 3.3.3.1.2.II). Auffallend war die deutliche Varianz der einzelnen Blattproben der *rimb6*.

3.3.3.2 Lichtmikroskopische und konfokalmikroskopische Auswertungen

Mittels lichtmikroskopischer und konfokalmikroskopischer (CLSM) Untersuchungen sollte geklärt werden, welche Auswirkungen die Mutation auf die Anatomie der Mutante im Vergleich zur T19-2 hat und wie sich der Blattphänotyp morphologisch bzw. anatomisch manifestiert.

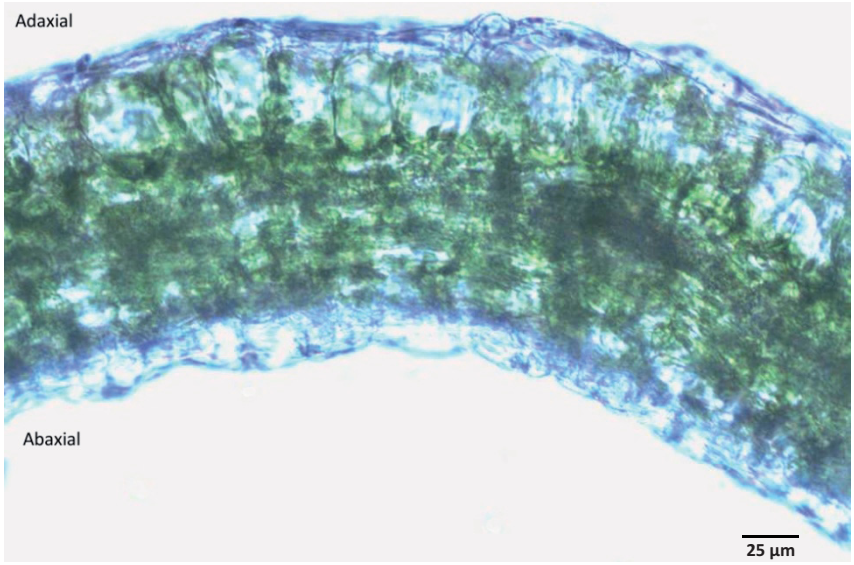


Abb. 3.3.3.2: Querschnitt durch ein 11 Wochen altes Rosettenblatt der *rimb6*. 20 x vergrößert, lichtmikroskopische Aufnahme.

Zu erkennen ist die obere Epidermis (adaxiale Blattseite), das darunter liegende Palisadenparenchym, das darunter liegende Schwammparenchym und die untere Epidermis (abaxiale Blattseite). Die *rimb6* zeigte analog zur T19-2 keine Anomalien des Mesophylls, auch waren in den Aufnahmen im CLSM keine Abweichungen der Gewebestrukturen von denen der Maternalpflanze zu erkennen, die Chloroplasten waren gleichmäßig im Mesophyll verteilt.

4. DISKUSSION

4.1 Die Mutanten *rimb1* und *rimb6*

Die Mutanten *rimb1* und *rimb6* zeigen von allen *rimb*-Mutanten (Heiber et al. 2007), insbesondere im Hinblick auf Blattform und Rosettengröße, die prägnantesten Phänotypen (Abb. 3.1). Bei beiden Mutanten sind die Mutationen rezessiv, da in Kreuzungen der jeweilige Phänotyp mit einer Wahrscheinlichkeit ≤ 25 % auftritt (Heiber 2007). Beide Mutanten sind somit basierend auf der Methode von Jander et al. (2002) kartierbar.

4.2 Die Mutante *rimb1*

4.2.1. Ergebnis der Kartierung

4.2.1.1 Sequenzierung

Die Mutante *rimb1* wurde in einen Bereich mit 35 Genen kartiert, in dem lediglich für das Gen *CEO1* (At1g32230) ein Zusammenhang mit oxidativem Stress erkennbar ist (Shaikhali 2006, Belles-Boix et al. 2000). Der kodierende Bereich von *CEO1* besteht aus 7 Introns und 8 Exons und hat eine Größe von ca. 4100 bp. Deshalb wurde das Gen in drei Abschnitte und den Promotor geteilt und überlappend sequenziert. Die Sequenzierungen ergaben, dass an Position 254 der Aminosäuresequenz in der Mutante *rimb1* ein Tryptophan kodierendes Basentriplett zu einem STOP-Codon mutiert ist. Dies hat zur Folge, dass die mRNA in ausreichender Menge transkribiert wird (Abb. 3.2.2.3.I), das Protein aber nur verkürzt vorliegt. Das Protein CEO1 hat keine DNA bindende Domäne, ist aber als interagierend mit mehreren Proteinen beschrieben. CEO1 interagiert u.a. mit AP2/EREBP-Transkriptionsfaktoren (Jaspers et al. 2010); Rap2.4a, welcher bei oxidativem Stress die *2-CPA* Transkription induziert (Shaikhali 2006), gehört dieser Proteinklasse an. Für *CEO1* wurde eine T-DNA Insertionslinie untersucht, um eine phänotypische Identität zwischen *rimb1* und der T-DNA Linie zu überprüfen, welche auch nachgewiesen werden konnte; zudem wurde mit einer unabhängigen Sequenzierung der Mutationslokus erneut bestätigt. Die beschriebene teilweise Paraquat-Resistenz (Ahlfors et al. 2004) konnte ebenfalls in *rimb1* und der zugehörigen T-DNA Linie nachgewiesen werden (Abb. 3.2.2.2).

CEO1 gliedert sich in mehrere Proteindomänen: eine WWE-Domäne, die für die Interaktion mit anderen Proteinen und die ADP-Ribosylierung und Protein-Ubiquitinierung verantwortlich ist (Aravind 2001, Jaspers et al. 2010), eine PARP-Domäne, die in den programmierten Zelltod sowie die DNA Reparatur involviert ist (Yu et al. 2006) und die RST-Domäne, welche als RCD1-SRO1-TAF4 typische Proteindomäne annotiert wurde (Jaspers et al. 2009). Der Translationsabbruch durch die Punktmutation erfolgt zwischen der WWE- und der PARP-Domäne (Abb. 3.2.1), so dass eine Proteininteraktion theoretisch noch möglich wäre, die Reaktion auf

ROS jedoch nicht mehr mit induziertem Zelltod erfolgen kann (siehe 3.2.2.2 Reaktion auf Paraquat). Der Abbruch der Translation erfolgt vor der RST-Domäne, welche von Jaspers et al. (2010) als interagierend mit Transkriptionsfaktoren beschrieben ist, so dass eine Interaktion mit dem von Shaikhali beschriebenen Transkriptionsfaktor Rap2.4a (Shaikhali 2006) unmöglich wird.

4.2.1.2 Untersuchung der T-DNA

Um die Identität des Mutationslokus der *rimb1* in *CEO1* zu bestätigen, wurde die im Gen *CEO1* inserierte T-DNA Linie SALK_116432 untersucht. Die *rimb1* zeigt einen identischen Phänotyp im Vergleich zur in *CEO1* inserierten T-DNA Linie, im Keimlingsstadium waren T-DNA und Mutante nicht vom Wildtyp zu unterscheiden, der Blattphänotyp trat bei beiden erst im Laufe der Entwicklung auf. Die wellige Struktur, insbesondere der Rosettenblätter, sowie die rosettenähnlichen, um die Sprossachse angeordneten Blätter, sind bei Mutante als auch T-DNA Linie deutlich zu erkennen (Teotia & Lamb 2009) und belegen phänotypisch, dass es sich bei der Mutation in *rimb1* um eine Störung im Gen *CEO1* handelt (Abb. 3.2.1.2). Alle bisher beschriebenen *CEO1* Mutanten zeigen einen identischen Phänotyp, unabhängig von der Lokalisation im Gen (Jaspers et al. 2009).

4.2.2 Phänotypisch-physiologische Untersuchungen

4.2.2.1 Analysen der Rosettendurchmesser

Die *rimb1* Rosettengröße ist geringer als die von T19-2 und die Pflanzen zeigen teilweise Chlorosen, verstärkt an den Blatträndern (Abb. 3.1.1). Dies deutet auf Entwicklungsstörungen und oxidativen Stress hin, verbunden mit ungewolltem partiellem Zelltod, insbesondere in älteren Pflanzenteilen (Overmyer et al. 2000, Yu et al. 2006). Da die Pflanzen in steriler Kultur angezogen wurden, muss davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte durch die Mutation in *rimb1* verursacht sind und nicht durch die ungleiche Verteilung der Nährstoffe in inhomogenem Substrat oder biotische Faktoren verursacht wurden. Um zu klären, ob die Rosettengröße durch eine gestörte Aufnahme von essentiellen Nährstoffen bedingt ist, wurden die Wurzeln als Hauptorgane der primären Nährstoffversorgung, insbesondere im Hinblick auf Anzahl lateraler Wurzeln und die Länge des Hauptwurzelsystems, untersucht; um zu klären, ob eine Zellteilungs-, Zellstreckungsstörung oder eine verminderte Zellzahl vorliegt, wurden Rosettenblätter im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die beobachtete Reduzierung der Rosettengröße lässt sich durch die Mutation und die damit verbundene gestörte Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies in *rimb1* erklären, welche u.a. eine Reduktion der Pflanzengröße bewirken (Foyer & Mullineaux 1994).

4.2.2.2 Analysen der Wurzelstrukturen

Die *rimb1* zeigt im Vergleich zur Maternallinie T19-2 und *rimb6* Unterschiede in der Wurzelstruktur. Die Hauptwurzel der Mutante ist verkürzt, dagegen ist die Anzahl lateraler Wurzeln erhöht (Abb. 3.1.2.II und Abb. 3.1.2.III). Die Beobachtungen einer verkürzten Hauptwurzellänge und erhöhten Lateralwurzelzahl sind ebenso für die Mutante *RCD1-3* beschrieben (Teotia & Lamb 2009). *rimb1* zeigt in Gegensatz zur *rimb6* und T19-2 keine Auffälligkeiten in Bezug auf Düngung und Phänotyp, lediglich ein Größenunterschied des Rosettendurchmessers war in Abhängigkeit zur Nährstoffverfügbarkeit zu erkennen. Durch die gesteigerte Zahl lateraler Wurzeln scheint *rimb1* die verkürzte Länge der Hauptwurzel zu kompensieren. Katiyar-Agarwal et al. (2006) konnten eine Lokalisation von RCD1 in den Wurzelspitzen nachweisen, so dass sich die veränderte Wurzelmorphologie auf RCD1 zurückführen lässt. In mammalen Zellen und Hefen ist RCD1 als Faktor der Zelldifferenzierung beschrieben (Hiroi et al. 2002), daher lässt sich vermuten, dass auch in anderen eukaryotischen Organismen wie *Arabidopsis thaliana* eine solche Funktion vorliegt und eine Mutation in *RCD1* zu morphologischen Veränderungen des Wurzelsystems führen kann.

4.2.2.3 Reaktion auf Jasmonsäure

Die Mutante *rimb1* zeigt bei steriler Anzucht auf Jasmonsäure-haltigem Medium keine Anomalien in Bezug auf Wuchsverhalten und Phänotyp (Abb. 3.2.2.1). Diese Ergebnisse decken sich mit den von Overmyer et al. 2000 getroffenen Beobachtungen, dass *rcd1* Mutanten bei Wachstum auf Methyl-Jasmonat keine Abweichungen von der Wurzelentwicklung des Wildtyps zeigen.

4.2.2.4 Reaktion auf Paraquat

Eine physiologische Besonderheit bei inaktivem *CEO1* Gen ist die Resistenz gegenüber Paraquat [1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium-dichlorid], wie sie von Ahlfors et al. (2004) beschrieben wurde. Um zu testen, ob in *rimb1* diese Resistenz gegenüber dem Hyperoxid und Superoxid induzierenden Herbizid ebenfalls vorhanden ist, wurden die Pflanzen mit Paraquat besprüht. Die *rimb1* zeigte eine fast identische Überlebensrate von ca. 75 % zur *CEO1 knock out* T-DNA Linie, wohingegen die Letalitätsrate der Kontrolle T19-2 bei fast 100 % lag (Tab. 3.2.2.2). ROS lösen den Zelltod aus (Fleury et al. 2002, Overmyer et al. 2000), daher ergibt sich, da CEO1 als eine Art „Sensor“ für reaktive Sauerstoffspezies zu dienen scheint (Jaspers et al. 2009, Jaspers et al. 2010), dass durch den Ausfall des Gens die Signaltransduktion unterbrochen ist und die Zellen nicht mit reguliertem Zelltod oxidativ geschädigter Zellareale reagieren können.

4.2.2.5 Quantitative Real-time-PCR-Analysen

Um die Auswirkungen der Mutation in *CEO1* auf *Rap2.4a* und *2-CPA* zu untersuchen, wurden die relativen Transkriptniveaus der Gene bestimmt. Insbesondere der Zusammenhang zwischen CEO1 und Rap2.4 war von Interesse, da bekannt ist, dass der Transkriptionsfaktor Rap2.4a mit CEO1 interagiert und 2-CPA induziert (Shaikhali 2006). Für 2-CPA wurde ein erniedrigter Transkriptspiegel erwartet, da die Selektion der *rimb*-Mutanten auf Basis des Reportergenkonstrukts von einem erniedrigten 2-CPA Transkriptniveau ausgeht (Heiber 2007). Die Ergebnisse der qPCR sind, normalisiert auf die Maternalpflanze T19-2, widersprüchlich (Abb. 3.2.2.3.I): Das Transkriptlevel von 2-CPA ist in *rimb1* erhöht, ebenso das Transkriptlevel von CEO1. Der Transkriptspiegel von Rap2.4a ist kaum erhöht. Das hohe Transkriptlevel von CEO1 lässt sich dadurch erklären, dass die mRNA vermutlich als Reaktion auf ROS transkribiert wird, das Protein dagegen durch das in der mRNA vorhandene STOP-Codon nur teilweise translatiert werden kann. Durch die fehlende Detoxifizierung der ROS kommt es zu einem erhöhten Bedarf an antioxidativ wirkenden Proteinen und somit wird die Transkription von CEO1 verstärkt induziert, ohne dass das Protein gebildet werden kann. Der kaum erhöhte Transkriptspiegel des mit CEO1 interagierenden und den 2-CPA induzierenden Transkriptionsfaktor Rap2.4a (Shaikhali 2006) belegt eine basale und von CEO1 weitgehend unabhängige Transkription von Rap2.4a.

Irritierend in diesem Zusammenhang ist der 2-CPA Transkriptspiegel, welcher in *rimb1* deutlich erhöht ist, in der zugehörigen T-DNA Linie SALK_116432 dagegen erwartungsgemäß deutlich erniedrigt vorliegt (Abb. 3.2.2.3.I). Dies widerspricht den gesamten Beobachtungen in den zugrundeliegenden Screens der „*rimb*-Mutanten“, bei dem von einer Reduktion des 2-CPA Transkriptlevel ausgegangen wird, was anhand einer erniedrigten Luciferaseaktivität des Reportergens [2-CPA-Promotor vor Luciferasegen] belegt wurde (Heiber et al. 2007). Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass durch den Ausfall von CEO1 die ROS Detoxifikation gestört ist und somit 2-CPA induziert werden muss - da es aber unwahrscheinlich ist, dass nur ein Signaltransduktionsweg 2-CPA induziert (es gibt sechs unabhängige *rimb*-Mutanten), ist die Möglichkeit der 2-CPA Induktion über weitere Signaltransduktionswege in Betracht zu ziehen, die durch die Störung der Redoxhomöostase durch den CEO1 *knock out* erst angeschaltet werden. Da der *rimb*-Mutanten-Screen mit 11 Tage alten Keimlingen, die qPCR dagegen mit 6 Wochen alten Rosettenblättern erfolgte, ist auch die Möglichkeit einer alternativen, entwicklungsabhängigen Induktion von 2-CPA in *rimb1* in Betracht zu ziehen.

Basierend auf dem Ergebnis der erhöhten 2-CPA Transkription in *rimb1*, wurde das 2-CPA Transkriptlevel 11 Tage alter Keimlinge mit 6 Wochen alten Proben verglichen, um auftretende entwicklungsabhängige Faktoren zu untersuchen (Abb. 3.2.2.3.II). In 11 Tage alten *rimb1* Keimlingen, wie sie für den zugrundeliegenden Screen der *rimb*-Mutanten verwendet wurden, ist das Transkriptlevel von 2-CPA gegenüber 11 Tage alten T19-2 erniedrigt, wie es aus den Beobachtungen von Heiber (2007) für das Reportergenkonstrukt erwartet wurde. In 6 Wochen alten *rimb1* Pflanzen dagegen war der Transkriptspiegel von 2-CPA erhöht, dies deutete auf eine entwicklungsabhängige Induktion von 2-CPA in *rimb1.* Eine mögliche Erklärung ist die Induktion von 2-CPA durch Signaltransduktionswege, die erst ab einer bestimmten Konzentration von ROS und den damit verbundenen akkumulierten oxidativen Schäden induziert werden. Für *rimb1* ist eine deutliche Erhöhung der relativen Luciferaseaktivität und somit der 2-CPA Expression über das Niveau der T19-2 nach 2 h unter Hochlicht (von 50 µE auf 400 µE) beschrieben (Heiber et al. 2007). Da Hochlicht verstärkt die Bildung von ROS auslöst, kann davon ausgegangen werden, dass *CEO1* konzentrationsabhängig auf Superoxid induzierte Signale reagiert. Möglich ist zudem der Einfluss eines veränderten Lichtspektrums, der sich durch den Wechsel der Anzuchtbedingungen durch den Institutsumzug ergab. Die Ursache hierfür könnte ein verändertes Interaktionsspektrum sein, da CEO1 u.a. mit lichtresponsiven Genen wie *phyA* und *phyB* interagiert (Jaspers et al. 2009). Dertinger et al. (2002) stellten eine entwicklungsabhängige Konzentration der niedermolekularen Antioxidantien Glutathion und Ascorbat fest, welche mit steigendem Alter sinkt, verbunden mit steigender Biosynthese von α-Tocopherol. Ein ähnlicher Mechanismus ist für das 2-CPA Transkriptlevel der *rimb1* unter den veränderten Anzuchtbedingungen in Düsseldorf möglich.

4.2.3 Morphologisch-anatomische Untersuchungen

4.2.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die *rimb1* zeigt im Vergleich zu T19-2 und *rimb6* epidermale Veränderungen in Form kanalartiger Furchungen der abaxialen Blattseite. Diese Entwicklungsstörung ist die Ursache für den Blattphänotyp, der bei *rimb1* auftritt und eine wellige Blattstruktur bewirkt; zudem sind die epidermalen Zellen deutlich größer als die der T19-2, es liegt somit eine Zellteilungsstörung vor. Diese Beobachtung deckt sich mit der von Reichheld et al. (1999) postulierten These, dass die Redox-Homöostase einer der Signalmechanismen der Zellteilungssteuerung ist.

4.2.4 Zusammenfassung *rimb1*

Die Mutante *rimb1* konnte auf das Gen At1g32230 kartiert werden. At1g32230 ist als *CEO1* (***C**lone **E**ighty **O**ne*) oder *RCD1* (***R**ADICAL-INDUCED **C**ELL **D**EATH1*) annotiert (*The Arabidopsis Information Resource*) und moduliert Reaktionen auf Abscisinsäure, Ethylen und Jasmonsäure (Ahlfors et al. 2004). Belles-Boix stellte eine Schutzfunktion gegen oxidative Schäden fest, wie sie u.a. durch H_2O_2 induziert werden (Belles-Boix et al. 2000). Bei Überexpression in Hefe ist eine deutlich erhöhte Überlebensrate bei mit *tert*-Butylhydroperoxid behandelten Stämmen zu erkennen; *tert*-Butylhydroperoxid induziert als organisches Peroxid oxidative Schäden (Belles-Boix et al. 2000). Aus früheren Arbeiten (Shaikhali 2006) ist bekannt, dass CEO1 mit Rap2.4a interagiert. Der Transkriptionsfaktor Rap2.4a bindet induzierend an den Promotor von *2-CPA* (Shaikhali et al. 2008). Die Regulation von *2-CPA* durch CEO1 via Rap2.4a Interaktion kann als wahrscheinlichster Mechanismus angenommen werden. Die Transkription von *CEO1* ist durch ein vermutlich konzentrationsabhängiges Niveau reaktiver Sauerstoffspezies charakterisiert, bei höheren Konzentrationen sind andere Signaltransduktionswege wahrscheinlich. Im Keimlingsstadium oder unter niedrigen ROS Konzentrationen ist folgender Mechanismus für die *2-CPA* Induktion über den Signaltransduktionsweg CEO1 - Rap2.4a anzunehmen:

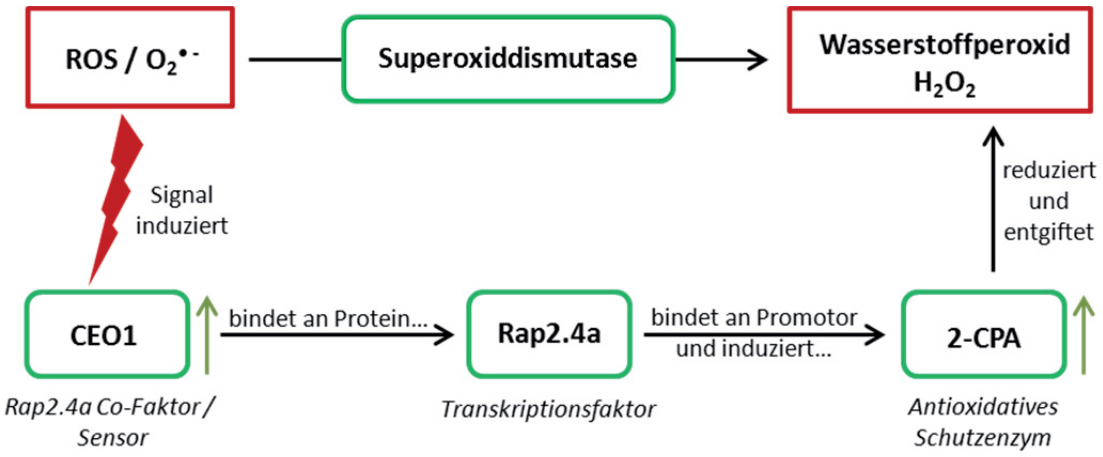


Abb. 4.2.4: Vereinfachter Mechanismus der *2-CPA* Geninduktion. *CEO1* wird durch Signale reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere Superoxid, induziert (Jaspers et al. 2010) und interagiert vermutlich mit der RST-Domäne (Aravind 2001, Jaspers et al. 2009) mit dem Transkriptionsfaktor Rap2.4a (At1g36060) welcher wiederum an den Promotor von *2-CPA* bindet und das Gen induziert (Shaikhali 2006).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es möglich war, mit RCD1/CEO1 ein Protein zu identifizieren, das vermutlich als „Sensor“ auf reaktive Sauerstoffspezies, insbesondere Superoxid, zu reagieren scheint (Jaspers et al. 2009, Jaspers et al. 2010) und als Co-Faktor die Rap2.4a induzierte Expression des *2-CPA* auslöst. Durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Rap2.4a, der das antioxidativ wirkende Schutzenzym 2-CPA induziert (Shaikhali 2006), wird der Abbau von ROS durch 2-CPA ausgelöst.

4.3 Die Mutante *rimb6*

4.3.1 Ergebnisse der Kartierung

4.3.1.1 Sequenzierungen

Die Mutante *rimb6* konnte in einen Bereich von ca. 114 kb zwischen die BACs FCA9 und F15J5 kartiert werden, eine Identifikation des Gens war noch nicht möglich. Im kartierten Bereich liegen 30 Gene, welche sich in 26 Protein kodierende Gene, 3 Pseudogene und eine tRNA gliedern. Pseudogene und tRNA wurden nicht untersucht. Die Gene At4g17880 und At4g17890 wurden aufgrund ihrer im *TILLING* positiven Mutationsdetektion untersucht; ein zweites *TILLING* mit den PCR amplifizierten Fragmenten fiel wie die Sequenzierung der entsprechenden Genbereiche negativ für die Mutationslokalisation aus, deshalb muss von einem falsch positiven Ergebnis des ersten *TILLING*-Ansatzes ausgegangen werden, eventuell ausgelöst durch eine PCR induzierte Mutation. Die 8 sequenzierten Gene zeigten keine Abweichungen der Sequenz vom Wildtyp, die 19 untersuchten T-DNA Linien zeigten keinen Phänotyp, drei weitere Gene (At4g17970, At4g18010, At4g18040) konnten durch die in der Literatur vorhandenen Phänotypen ausgeschlossen werden (Sato et al. 2005; Sasaki et al. 2010, Robinson et al. 2004). Für einige der im kartierten Areal lokalisierten Gene war allerdings keine T-DNA erhältlich (u.a. At4g17840, At4g17998, At4g17800), so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob eine Mutation dieser Gene einen *rimb6* ähnlichen Phänotyp induzieren kann.

Bei den sequenzierten Genen handelt es sich um im kartierten Areal lokalisierte Transkriptionsfaktoren, da es bei einem Signaltransduktionsweg wahrscheinlich ist, dass ein Transkriptionsfaktor in die *2-CPA* Induktion kausal involviert ist. Auch in die Protein-Protein Interaktion involvierte Proteine (analog einer *CEO1 - Rap2.4a - 2-CPA* Signaltransduktion) wurden sequenziert. Die Trehalose Synthase/Phosphatase wurde sequenziert, da Trehalose eine protektive Funktion unter oxidativem Stress erfüllt (Benaroudj et al. 2001). Das Protein bindende Gen At4g17920 wurde wegen eines vermuteten CEO1 analogen Verhaltens (CEO1 - Rap2.4 Interaktion, Shaikhali 2006) untersucht. Die sequenzierten Gene können für die Lokalisation der *rimb6* Mutation ausgeschlossen werden.

Da einige Gene im kartierten Areal nicht mehr untersucht werden konnten, ist es reine Spekulation, ein Lokusgen für *rimb6* zu benennen, dennoch sollten die nicht untersuchten Gene erwähnt werden: At4g17840, At4g17960, At4g17990, At4g17998, At4g18000, At4g18030. Von diesen Genen sind insbesondere At4g17840 und At4g18030 von Interesse. At4g17840 ist gemäß „eFP Browser“ (Winter et al. 2007) und „Atted-II“ (Obayashi et al. 2007) im Chloroplasten lokalisiert und mit Genen koexprimiert (Obayashi et al. 2009), die einen Zusammenhang mit

oxidativem Stress deutlich machen (*GSTU16* [*GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 16*], *ACD1* [*ACCELERATED CELL DEATH 1*], *ABI2* [*ABA INSENSITIVE 2*], *CAT2* [*CATALASE 2*], etc.).

Das Gen At4g18030 ist mit *2-CPA* koexprimiert annotiert [Atted-II] (Obayashi et al. 2007) und korreliert negativ mit den Transkriptionsfaktoren Rap2.4e (At4g39780), Rap2.3 (At3g16770) und Rap2.1 (At1g46768) [ACT; *http://www.arabidopsis.leeds.ac.uk/act/index.php*] (Manfield et al. 2006). Da Shaikhali zeigen konnte, dass der Transkriptionsfaktor Rap2.4a (At1g36060) induzierend an *2-CPA* bindet (Shaikhali et al. 2008), und die ethylenresponsiven APETALA2 (ERF/AP2)-Transkriptionsfaktoren mit abiotischen Stressen wie oxidativem Stress, Hitzestress, Kältestress und Trockenstress in Verbindung gebracht werden (Lin et al. 2008 [Rap2.4b], Ogawa et al. 2005 [Rap2.3], Dong & Liu 2010 [Rap2.1]), ist ein Zusammenhang zu *rimb6* in Betracht zu ziehen. Zudem ist ein sehr ähnliches Expressionsmuster von Rap2.4a, Rap2.4b und Rap2.4e zu beobachten [AtGenExpress] (Lin et al. 2008, Schmid et al. 2005). In diesem Zusammenhang scheint ein negativer Feedback via Rap2.4e mit finaler Induktion von *2-CPA* möglich.

Für das Gen At4g17960 sind keine Informationen verfügbar. Für die Gene At4g17990, At4g17998 sind ebenfalls keine weiterführenden Informationen zu erhalten, das schließt allerdings nicht die Möglichkeit der *rimb6* Mutationslokalisation aus. Für At4g18000 ist bekannt, dass es mit DNA interagiert (Yang et al. 2008), allerdings ist kein Zusammenhang zu oxidativem Stress bekannt.

4.3.1.2 T-DNA Linien

Keine der untersuchten T-DNA Linien zeigte auf nährstoffarmem Substrat einen *rimb6* Phänotyp. Um biotische Interaktionen zu vermeiden, wurden alle T-DNA Linien zusätzlich auf MS-Medium steril angezogen; es war bei keiner Pflanze der ausgebrachten T-DNA Linien der *rimb6* Phänotyp zu erkennen, ein Einfluss durch biotische Faktoren kann ausgeschlossen werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass keines der mittels T-DNA untersuchten Gene für *rimb6* kodiert.

Da die Mutation in *rimb6* bisher noch nicht kartiert werden konnte, wurde mit physiologischen Experimenten und einer erweiterten Charakterisierung versucht, potentielle Kandidatengene für die Mutationslokalisation der *rimb6* zu identifizieren, da auch die Methode des *TILLING* nicht den gewünschten Erfolg brachte (siehe Kapitel 3.3.1.4).

4.3.2 Phänotypisch-physiologische Untersuchungen

4.3.2.1 Analyse des Rosettendurchmessers

Die durchschnittlichen Rosettengröße von T19-2 und *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia entsprechen sich, was zeigt, dass das Reportergenkonstrukt keine Auswirkung auf die Physiologie der T19-2 hat (Abb. 3.1.1). Die Mutante *rimb6* ist bedeutend kleiner als T19-2 und *rimb1*. Dies ist abhängig von der Nährstoffverfügbarkeit; bei guter Nährstoffverfügbarkeit erreicht die Mutante die Größe der T19-2 (Abb. 3.3.2.3.II), auch tritt der typische Blattphänotyp mit den in sich gerollten und verdrehten Blättern kaum hervor (Abb. 3.1 und Abb. 3.3.2.4.I). Um einen prägnanten Phänotyp zu erzielen, wurden alle *rimb6* und die zugehörigen Kontrollen auf nährstoffarmem Substrat angezogen. Die reduzierte Blattgröße zeigt in Kombination mit einem limitierten Nährstoffangebot, dass die Mutante *rimb6* starke Störungen nicht nur im oxidativen Schutzsystem hat, sondern dass sich diese Störungen auf die Gesamtentwicklung der Pflanze auswirken. Um einen genaueren Einblick in die Wirkungen einzelner Nährstoffe und des Nährstoffgehalts zu bekommen, wurde die Zusammensetzung sowie der Gehalt der Nährstoffe variiert (siehe Kapitel 3.3.2.3).

4.3.2.2 Analyse der Wurzelstrukturen

Die Analyse der Wurzelstrukturen zielte darauf ab, ob der prägnante Phänotyp der *rimb6* auf eine Störung des Wurzelaufbaus zurückzuführen ist. Dies konnte nicht bestätigt werden. Die Hauptwurzellänge sowie die Zahl lateraler Wurzeln entsprechen der Kontrolle T19-2; der visuelle Eindruck einer verkürzten Hauptwurzel konnte nicht bestätigt werden, die Hauptwurzel ist lediglich stärker gekrümmt (Abb. 3.1.2.II). Die Mutation der *rimb6* hat somit keinen Einfluss auf den strukturellen Wurzelaufbau - der nährstoffabhängige Phänotyp der Mutante muss daher auf einen anderen Mechanismus zurückgeführt werden. Eine Störung der interzellularen Nährstoffverteilung ist möglich, eventuell ausgelöst durch den Ausfall eines Gens, das nicht nur in die Induktion von *2-CPA* eingreift, sondern auch die Nährstoffe zielgerichtet an den Ort des Bedarfs transportiert. Hesketh & Villette (2002) konnten im Tiermodell zeigen, dass der Mikronährstoff Selen durch *Metallothioneine* über einen mRNA basierten Mechanismus an den Ort des Bedarfs transportiert wird und die Transkriptlevel von *GPX1* und *GPX4* reguliert (Hesketh & Villette 2002). Peroxiredoxine sind im Gegensatz zu tierischen GPX kein Selenoproteine, ein ähnlicher Mechanismus ist aber auch in *rimb6* denkbar, eventuell ausgelöst durch eine gestörte Nährstoffverteilung in den Zellkompartimenten. In diesem Zusammenhang ist insbesondere der *„Phosphat-Triosephosphat-Phosphoglycerat Translocator“* (Flügge & Heldt 1984) in Betracht zu ziehen. Da Phosphat einen Effekt auf den Phänotyp der *rimb6* hatte (siehe Abb. 3.3.2.4.II) und der *„Phosphat-Triosephosphat-Phosphoglycerat Translocator“* den Export von

Photosyntheseprodukten mit dem Phosphatimport in die Chloroplasten koppelt, kann in einem gestörten intrazellularen Phosphattransport die Ursache für den *rimb6* Phänotyp vermutet werden.

4.3.2.3 Chlorophyllgehalt

Der Gesamtchlorophyllgehalt der *rimb6* ist im Vergleich zur Kontrolle T19-2 reduziert, insbesondere der Gehalt an Chlorophyll *a*. In den Chloroplasten ist durch die Einlagerung von Stärke und das Aufbrechen der Grana-Stapelung eine Störung in der Thylakoidstruktur zu erkennen (Heiber 2007). Die Modulierung von photoinhibitorischen Schäden durch die Chlorophyll-Antennengröße konnte bei *Dunaliella salina* gezeigt werden (Baroli & Melis 1998), eine Störung in *rimb6* ist durch das erniedrigte Chlorophyll *a/b* Verhältnis belegt und lässt eine Störung im Bereich der Antennengröße der Photoreaktionszentren als wahrscheinlich erscheinen. Auch ein reduzierter Chlorophyllgehalt durch Störung der Thylakoidstruktur und eine Reduktion funktionaler Photosysteme, wie er u.a. durch oxidative Schäden verursacht wird (Nishiyama et al. 2001) ist möglich. Um potentielle Mutationslokalisationen der *rimb6* zu untersuchen, wurde im kartierten Areal nach Genen gesucht, die mit der Photosynthese bzw. Chlorophyllsynthese in Verbindung gebracht werden. Das Gen At4g17740 ist das einzige explizit in die Photosynthese eingreifende Gen, welches im erweiterten Mutationsareal lokalisiert und eine D1-prozessierende Peptidase kodiert; die Untersuchung mittels T-DNA zeigte keine phänotypische Identität zur *rimb6*, das Gen At4g17740 kann für die Mutationslokalisation der *rimb6* ausgeschlossen werden. Beim Wechsel von PS II (560 nm) zu PS I (650 nm) Licht liegt ein deutlich erniedrigtes Chlorophyll *a/b* Verhältnis vor (Pfannschmidt et al. 1999), daher deutet das erniedrigte Chlorophyll *a/b* Verhältnis in *rimb6* auf eine Störung im Bereich des Photosystem I (PS I). Da das Photosystem II durch den Elektronenfluss ein starkes Oxidationsmittel für die Oxidation des Wassers bildet, das Photosystem I dagegen ein starkes Reduktionsmittel für $NADP^+$ bildet (Heldt 2003), ergibt sich aus dem erniedrigten Chlorophyll *a/b* Verhältnis eine Störung im Bereich des PS I mit Verschiebung der Redoxhomöostase zu einem reduzierenden Milieu mit Elektronenüberschuss, in dem deutlich mehr ROS gebildet werden können und somit auch deutlich mehr oxidative Schäden auftreten. Durch die ausgelöste Signalkette müsste *2-CPA* induziert werden, da dies in den *rimb*-Mutanten durch die Mutation nicht möglich ist, liegt auch ein erniedrigter 2-CPA Transkriptspiegel vor (Heiber et al. 2007).

4.3.2.4 Reaktion auf Jasmonsäure

Da der Transkriptionsfaktor *MYC4* (At4g17880) als Kandidatengen während der Kartierung für die Mutationslokalisation der *rimb6* in Betracht kam und dieser mit Jasmonsäure interagiert, wurde ein Einfluss von Jasmonsäure auf die Mutante *rimb6* untersucht. Der Hinweis auf einen „*feedback loop*“ von Jasmonsäure auf das ROS Niveau im Ligninmetabolismus (Denness et al. 2011), in Kombination mit der Beobachtung, dass das Gewebe der *rimb6* sehr labil ist, legten die Möglichkeit eines reduzierten Ligningehalts nahe. Die Mutante *rimb6* zeigt, analog zu T19-2 und *rimb1*, keinen erkennbaren Einfluss bei Wachstum mit Jasmonsäure. Eine Kompensation des Einflusses von Jasmonsäure durch die Mutation, welcher insbesondere im Bereich der Wurzelentwicklung zu erkennen wäre (Staswick et al. 1992), konnte nicht gezeigt werden; zudem sind keine Abweichungen des Habitus von der Maternalpflanze zu erkennen. Eine Mutation der *rimb6* im Jasmonsäure Metabolismus kann ausgeschlossen werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Baier et al. (2004), die einen Einfluss von Jasmonsäure auf ein Reportergenkonstrukt mit *2-CPA* Promotorfragmenten vor einer β-Glucuronidase nicht zeigen konnten.

4.3.2.5 Reaktion auf Salicylsäure

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, das Jasmonsäure und Salicylsäure einen antagonistischen Effekt im Superoxid abhängigen regulierten Zelltod der Mutante *rcd1* (*rimb1*) haben (Overmyer et al. 2000). Um zu überprüfen, ob dies auch für *rimb6* zutrifft, wurden die Samen auf Salicylsäure haltigem Medium ausgesät. Eine Keimung erfolgte weder bei Kontrolle noch Mutante. Dies lässt sich auf die hemmende Wirkung der Salicylsäure auf die Ethylenbiosynthese zurückführen (Leslie & Romani 1988). Ethylen induziert die Keimung (Locke et al. 2000), da dies durch Salicylsäure blockiert ist, erfolgt keine Keimung. Eine Mutation im Salicylsäure abhängigen Metabolismus kann für die Mutante *rimb6* damit ausgeschlossen werden. Ein Einfluss von Salicylsäure auf ein Reportergenkonstrukt mit *2-CPA* Promotorfragmenten vor einer β-Glucuronidase konnte nicht gezeigt werden, es ist daher davon auszugehen, dass *2-CPA* durch Salicylsäure nicht induziert wird (Baier et al. 2004).

4.3.2.6 Variation des Nährstoffgehalts

Der Phänotyp der Mutante *rimb6* ist unter anderem abhängig vom Gesamtnährstoffgehalt (Abb. 3.3.2.3.II). Bei sehr guter Nährstoffversorgung reduziert sich der Blattphänotyp meist auf leichte Blattkrümmung und leicht chlorotische Blatträndер, bei Mangelversorgung ist die gesamte Rosette teilweise nicht größer als stecknadelkopfgroß, verbunden mit einem sehr starken Blattphänotyp (Abb. 3.3.2.3.III); die Kontrolle T19-2 zeigt lediglich ein nährstoffabhängiges

Wachstum und ist bei gleicher Nährstoffversorgung immer größer als *rimb6*. Der Rosettendurchmesser der *rimb6* ist fast linear abhängig von der Nährstoffversorgung, der Habitus jedoch ist variabel (Abb. 3.3.2.4.I und Abb. 3.3.2.3.I), ähnlich der von Krupková et al. (2007) beschriebenen *tsd2* Mutante [Klasse I und III] (At1g78240), welche einen variablen und nicht klar zu fassenden Phänotyp unter identischen Wachstumsbedingungen zeigt und massiv in die Sprossentwicklung eingreift. Der Einfluss des Gesamtnährstoffgehalts auf den Phänotyp konnte nicht klar geklärt werden, es lässt sich lediglich feststellen, dass der Phänotyp der *rimb6* unter reduziertem Nährstoffgehalt prägnanter hervortritt. Um zu untersuchen, ob ein bestimmter Makronährstoff einen Einfluss auf *rimb6* hat, wurde die Konzentration einzelner Nährstoffe in ½ x MS-Medium selektiv erhöht. Die selektive Variation der Nährstoffe diente dazu, den Einfluss einzelner Nährstoffe auf die Mutante *rimb6* im Hinblick auf protektive Funktionen unter oxidativem Stress zu evaluieren. Eine Wirkung der Nährstoffe auf den Phänotyp von *rimb6* ist bei $CaCl_2$, KH_2PO_4 und $ZnSO_4$-Gabe zu erkennen.

Die Wirkung von $CaCl_2$ lässt sich durch eine steigende Calciumkonzentration im Cytosol erklären. Bei oxidativem Stress erfolgt *in vivo* Ca^{2+}-abhängig (Price et al. 1994) u.a. die Induktion der Glutathion-S-Transferase [GST1] (Rentel & Knight 2004). Da reduziertes Glutathion essentieller Bestandteil des Ascorbat abhängigen „*Water-Water-Cycle*“ ist, ergibt sich bei erhöhter $CaCl_2$ Konzentration eine protektive Funktion durch die Ascorbatperoxidasen [APX], so dass der „Ausfall“ des Ascorbat unabhängigen „*Water-Water-Cycle*“ durch eine verstärkte Induktion des Ascorbat abhängigen „*Water-Water-Cycle*“ kompensiert würde. Dies wird durch die Ergebnisse von Gomez et al. (2004) gestützt, die eine Calciumfreisetzung bei Zugabe von oxidiertem Glutathion zeigen konnten und so ein Calciumsignal in Abhängigkeit vom Oxidationsstatus des Glutathion postulieren. Die Calcium Freisetzung wird durch H_2O_2 und Ozon induziert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Calcium in die Signaltransduktion u.a. von oxidativem Stress involviert ist (Evans et al. 2004). Durch die externe Zugabe von Calcium steigen die intrazellularen Calciumspiegel, so dass sich eine Signaltransduktion durch die erhöhten Calciumspiegel vermuten lässt, die zu einer Induktion antioxidativer Enzyme führt.

Da $MgSO_4$ und KNO_3 keine phänotypischen Wirkungen erzielen, muss davon ausgegangen werden, dass Zink und Phosphat die beobachteten Effekte bewirken. Der positive Effekt des Mikronährstoffs Zinks könnte sich mit einer Induktion der Superoxiddismutase (SOD) erklären lassen. Del Rio et al. (1985) konnten in *Pisum sativum* zeigen, dass durch die subletale Gabe von Zink die Induktion einer Mangan-SOD (Mn-SOD) erfolgt, was wiederum eine protektive Wirkung gegen oxidativen Stress implementiert. Ein stimulierender Effekt von Zink auf den

Glutathion- und Ascorbat-Glutathion Metabolismus (Ascorbatperoxidase [APX], Monodehydroascorbatreduktase [MDHAR], Dehydroascorbatreduktase [DHAR], Glutathionreduktase [GR]) konnte von Aravind & Prasad (2005) gezeigt werden, allerdings nur in Kombination mit durch Cadmium induzierten oxidativem Stress, für welchen es keinen Hinweis im Versuchsansatz gibt. Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass eine moderat erhöhte Zinkkonzentration zu einer verstärkten Expression zinkbasierter Transkriptionsfaktoren wie dem Zinkfingerprotein ZAT12 führt, welches wiederum *APX1* induziert (Rizhsky et al. 2004) und dadurch oxidativen Stress und somit ROS kompensiert.

Der positive Effekt des Phosphats auf die Pflanzenvitalität erklärt sich u.a. durch die Beobachtung von Juszczuk et al. (2001): bei Phosphatmangel in *Phaseolus vulgaris* ist oxidativer Stress mit erhöhten H_2O_2 und Lipidperoxidations-Werten messbar; somit ist bei ausgeglichener Phosphatmenge ein homöostatisches Redoxgleichgewicht zu erwarten - bei nährstofflimitiertem Substrat ist durch Phosphatmangel ein zum photosynthetisch bedingten oxidativen Stress zusätzlich induzierter oxidativer Stress vorhanden, was für die Gesamtvitalität der *rimb*-Mutanten negativ ist und den Phänotyp prägnanter hervortreten lässt. Ein phosphatarmes Medium erhöht zudem die Stärkeeinlagerungen und reduziert den Saccharosegehalt (Foyer & Spencer 1986). Dies wurde auch von Heiber (2007) für die *rimb6* beschrieben, die eine erhöhte Stärkeeinlagerung und einen reduzierten Saccharoselevel messen konnte. Bei *Hordeum vulgare* und *Spinacia oleracea* ist die CO_2-Fixierung durch Phosphatmangel gehemmt (Foyer & Spencer 1986), so dass sich eine verstärkte Bildung von ROS bei gleicher Lichtintensität ergibt. Diese Beobachtung wird durch das Ergebnis einer stark reduzierten CO_2-Assimilationsrate in *Gerbera jamesonii* unter Nährstoffmangel mit Induktion mehrerer antioxidativ wirkenden Peroxidasen gestützt (Syros et al. 2004). Durch die Zugabe von Phosphat sollte die Photosyntheserate gesteigert werden, was zu gesteigerter Saccharosebildung und reduzierten Stärkeeinlagerungen führen müsste. Die gesteigerte CO_2-Fixierung durch eine erhöhte Photosyntheserate würde zudem zu einer Reduktion der ROS führen und den beobachteten vitalitätssteigernden Effekt erklären. In diesem Zusammenhang ist auch der *„Phosphat-Triosephosphat-Phosphoglycerat Translocator“* (Flügge & Heldt 1984) zu berücksichtigen, da dieser Phosphat ins Stroma hinein und Triosephosphat sowie Reduktionsäquivalente in Form von NADPH aus dem Stroma heraus, transportiert (Flügge & Heldt 1984). Da NADPH als Reduktionsäquivalent sowohl in das Thioredoxinsystem als auch das Glutaredoxinsystem eingebunden ist (siehe Kapitel 1.3.2.3) und der Redoxstatus des $NADP^+$/NADPH-Systems u.a. vom Photosystem I bestimmt wird, in dem bei *rimb6* eine Störung vorzuliegen scheint (siehe Kapitel 4.3.1.3), lässt sich der positive Einfluss des Phosphats durch folgenden Mechanismus erklären: wenn durch

Inhibierung der Phosphoglyceratkinase durch niedrige Phosphatspiegel der Gehalt an Glycerat-1,3-bisphosphat sinkt, steigt der NADPH-Gehalt und der Elektronentransport wird durch den fehlenden Akzeptor verlangsamt (Giersch & Robinson 1987). Durch einen fehlenden Elektronenakzeptor können vermehrt ROS entstehen, somit ergibt sich aus dem erhöhten Phosphatgehalt ein erniedrigtes Niveau an ROS.

4.3.2.7 Quantitative Real-time-PCR-Analysen

Die Analyse der 2-CPA, CEO1 und Rap2.4a Transkriptspiegel bestätigt die von Heiber (2007) getroffenen Ergebnisse: 2-CPA ist niedriger als in T19-2 exprimiert, wie es bei Störung in diesem Signaltransduktionsweg erwartet wird. Die Transkriptspiegel von CEO1 und Rap2.4a sind erhöht, was belegt, dass durch den Ausfall des *rimb6* spezifischen Signaltransduktionswegs andere Signalwege zum Tragen kommen, wie durch die erhöhte Induktion des CEO1 - Rap2.4a Signaltransduktionswegs belegt. Dennoch ist CEO1 nicht zu einer Kompensation der *rimb6* spezifischen Signalketten in der Lage, da das Transkriptniveau von 2-CPA trotz erhöhter CEO1 und Rap2.4a Transkription erniedrigt bleibt - dies belegt die Unabhängigkeit der *rimb1* und *rimb6* spezifischen Signaltransduktionswege, wie sie auch von Heiber (2007) postuliert wurden.

4.3.3 Mikroskopische Untersuchungen

4.3.3.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Auffallend an *rimb6* ist eine reduzierte Zellgröße, was auf einer Zellstreckungsstörung basiert. Dies deutete auf eine mögliche Störung im Auxinmetabolismus hin, da Auxin die Zellstreckung reguliert (Esmon et al. 2006). Auxine interagieren u.a. mit der SOS-Genfamilie [SALT OVERLY SENSITIVE], SOS5 ist für die normale Zellexpansion verantwortlich (Shi et al. 2003). Da CEO1/*rimb1* interagierend mit SOS1 annotiert ist (Katiyar-Agarwal et al. 2006), deutet dies auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der SOS-Genfamilie, oxidativem Stress und der Zellexpansion hin. Eine strukturelle Veränderung des zellularen Aufbaus konnte nicht eruiert werden, lediglich eine reduzierte Zahl der Stomata fällt auf. Eine Störung im Bereich der Aktinfilament-Organisation, welche nicht nur für Öffnung und Schließung der Stomata (Eun & Lee 1997), sondern auch strukturbildend für das gesamte Zytoskelett ist, kann ebenso eine der Ursachen für den Blattphänotyp sein.

4.3.3.2 Lichtmikroskopische und konfokalmikroskopische Untersuchungen

Die lichtmikroskopische und konfokalmikroskopische Untersuchung der *rimb6* im Vergleich zu T19-2 und *rimb1* zeigten keine erkennbaren Abweichungen vom strukturellen Aufbau der Gewebe, wie sie in der *rimb1* Epidermis zu erkennen waren. Der Blattphänotyp lässt sich möglicherweise durch verminderte Zelladhäsionen erklären, wie sie u.a. durch Störungen der Aktinfilament - Integrin Interaktion zu erklären sind und von Calderwood et al. (2000) zusammenfassend für eukaryotische Zellen beschrieben wurde. Eine weitere Möglichkeit ist eine Störung im Bereich der Pektine, wie für die Mutante *QUASIMODO1* beschrieben, resultierend in einer gestörten Zelladhäsion und Pektinsynthese (Bouton et al. 2002).

4.3.4 Zusammenfassung *rimb6*

Die Mutante *rimb6* konnte auf keines der untersuchten Gene kartiert werden, dennoch konnten mehrere Ergebnisse gewonnen werden: weder der Jasmonsäure-Metabolismus noch der Salicylsäure-Metabolismus sind in *rimb6* betroffen, eine Störung in diesen Signaltransduktionswegen für die *2-CPA* Induktion kann ausgeschlossen werden. Der Chlorophyllgehalt legt eine Störung im Bereich des Photosystem I nahe. Die Wurzelmorphologie entspricht dem der Maternalpflanze T19-2, die Zahl der Stomata dagegen ist reduziert. Der Blattphänotyp ist nährstoffabhängig, unter optimalen Bedingungen verschwindet er fast völlig. In den mikroskopischen Untersuchungen konnten keine Ursachen für den Blattphänotyp gefunden werden, die epidermalen Zellen sind jedoch aufgrund einer Zellstreckungsstörung deutlich verkleinert. Die Daten der qPCR bestätigen die von Heiber et al. (2007) beschriebene Unabhängigkeit der Signaltransduktionswege der Mutanten *rimb1* und *rimb6*.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es noch nicht möglich war, die Mutante *rimb6* zu kartieren. Es sollte allerdings aufgrund deutlich verbesserter Möglichkeiten der (Genom-) Sequenzierung in der nahen Zukunft möglich sein, die Mutante zu identifizieren, da das Areal, in welchem die Mutation lokalisiert, mit 114 kb überschaubar ist.

4.4 Ausblick

Die Kartierung der Mutante *rimb1* erweitert die von Shaikhali (2006) getroffenen Beobachtungen der CEO1 Interaktion mit Rap2.4a und führt sie mit den Ergebnissen von Overmyer et al. (2000) zusammen. Da in *rimb1* lediglich CEO1 mutiert ist, ergibt sich, dass CEO1, dem DNA bindende Eigenschaften fehlen (Jaspers et. al 2010), auf den Transkriptionsfaktor Rap2.4a angewiesen ist, um *2-CPA* zu induzieren. Es sollte daher geklärt werden, inwieweit CEO1 durch andere Proteine ersetzt werden kann, die mit Rap2.4a interagieren und die Funktion von CEO1 übernehmen können. Auch die umgekehrte Fragestellung, inwieweit Rap2.4a durch andere Transkriptionsfaktoren ersetzt werden kann, sollte noch untersucht werden.

Im Hinblick auf das Ergebnis einer eventuell durch das Lichtspektrum induzierten Expression von *2-CPA* muss geklärt werden, ob dieser Effekt tatsächlich auf das Lichtspektrum zurückzuführen ist und wenn ja, unter welchen Wellenlängen *2-CPA* induziert wird. Nach Identifikation der *rimb6* sollte es möglich sein, auch dieser Frage nachzugehen.

Für die Mutante *rimb6* ist aufgrund der fehlenden Genidentität unabdingbar, dass das mutierte Gen, eventuell mit einem „*Primerwalking*“ oder „*Next-Generation-Sequencing*“, identifiziert wird, da es nur so möglich sein wird, die Ergebnisse in einen sinnvollen Zusammenhang zu den Signaltransduktionsmechanismen zu setzen, welche im oxidativen Schutzsystem *2-CPA* regulieren.

5.1 ZUSAMMENFASSUNG

In der Mutante *rimb1* kann das antioxidativ wirkende Gen *2-CPA* aufgrund eines mutierten Signaltransduktionselements nur niedrig exprimiert werden. Die *rimb1*-Mutation wurde auf dem Gen At1g32230 kartiert; ein Tryptophan-Codon an Position 254 ist zu einem STOP-Codon mutiert. At1g32230 ist als *RADICAL-INDUCED CELL DEATH1* oder *CEO1* beschrieben (Ahlfors et al. 2004, Belles-Boix et al. 2000). CEO1 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Rap2.4a (At1g36060), welcher induzierend an den Promotor des Zielgens *2-CPA* (At3g11630) bindet (Shaikhali 2006). Somit ergibt sich, dass CEO1 als wichtiger Co-Faktor für Rap2.4a die Induktion eines 2-Cys-Peroxiredoxins auslöst. Der Blattphänotyp und die um die Sprossachse rosettenähnlich angeordneten Blätter entsprechen sich in *rimb1* und der T-DNA Linie SALK_116432, bei der die T-DNA im Gen *CEO1* inseriert, und belegen phänotypisch die Lokalisation der *rimb1*-Mutation im Gen At1g32230. Die erhöhte Resistenz gegen das Superoxid-induzierende Herbizid Paraquat entspricht den von Ahlfors et al. (2004) beschriebenen Werten für die *CEO1 knock-out* Linie. Es ist eine erhöhte Zahl lateraler Wurzeln, verbunden mit einer verkürzten Hauptwurzel, zu erkennen. Der Blattphänotyp lässt sich auf kanalartige Furchungen in der Epidermis der Blattunterseite und eine Zellteilungsstörung zurückführen. Der 2-CPA Transkriptspiegel ist in *rimb1* entwicklungsabhängig reguliert, in älteren *rimb1* ist 2-CPA höher exprimiert als im Wildtyp, in Keimlingen ist 2-CPA dagegen niedriger exprimiert. Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch die Kartierung der Mutante *rimb1* die Identifikation eines Signaltransduktionselements der retrograden Kommunikation möglich war; CEO1 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Rap2.4a, welcher induzierend an den *2-CPA* Promotor bindet (Shaikhali 2006) und so die Expression von *2-CPA* reguliert.

Die Mutante *rimb6* konnte in einem eng begrenzten Genombereich von ca. 114 kb auf den unteren Arm von Chromosom 4 lokalisiert werden; von ca. 27000 Genen in *Arabidopsis thaliana* kommen noch 30 Gene für die Mutationslokalisation in Betracht. Aufgrund deutlich verbesserter Möglichkeiten der Genomsequenzierung („*Next-Generation-Sequencing*“) ist es in absehbarer Zeit möglich, den Mutationslokus zu identifizieren, da die Region mit 114 kb sehr reduziert ist und es aufgrund des prägnanten Blattphänotyps möglich ist, mittels geeigneter Pflanzen den Mutationslokus zu identifizieren. Bei *rimb6* ist ein deutlicher Einfluss der Nährstoffe Calciumchlorid, Zink und Phosphat auf den Blattphänotyp zu erkennen, bei optimaler Nährstoffversorgung verschwindet der Blattphänotyp fast vollständig, bei Nährstoffmangel tritt er prägnant hervor; ein Einfluss des Wurzelaufbaus ist nicht zu erkennen. Der Wurzelaufbau entspricht dem Wildtyp. Es liegt eine Zellstreckungsstörung vor, die sich in einer verminderten Zellgröße manifestiert und eine Erklärung für die teils sehr kleine Rosettengröße geben kann. Ein Einfluss von Jasmon- und Salicylsäure auf den Phänotyp der *rimb6* ist nicht zu erken-

nen. Die Transkriptspiegel von CEO1 und Rap2.4a sind in *rimb6* erhöht, der 2-CPA Transkriptspiegel dagegen ist erniedrigt, was die von Heiber et al. (2007) getroffene Beschreibung unabhängiger Signaltransduktionswege in *rimb1* und *rimb6* bestätigt.

5.2 SUMMARY

In *rimb1*, the antioxidative *2-Cys-Peroxiredoxin A* is low expressed because of a mutation in the signal transduction pathway. The redox-imbalanced mutant *rimb1* was mapped to gene At1g32230 (*RADICAL-INDUCED-CELL DEATH1*, *CEO1*) where a Trp254STOP transition took place. CEO1 interacts with the transcription factor Rap2.4a (At1g36060). Rap2.4a binds at the *2-CPA* promoter and induces transcription of the target gene (Shaikhali 2006). CEO1 is an important co-factor for the Rap2.4a induced expression of a peroxiredoxin and has been shown to be involved in oxidative stress reactions (Belles-Boix et al. 2000). The billowy leaf phenotype and the rosette-like leaves around the shoot look identical in *rimb1* and in the CEO1-inserted SALK_116432 T-DNA line, showing the localisation of the *rimb1* mutation in the gene At1g32230. The resistance against the ROS inducing herbicide Paraquat is consistent with the results of Ahlfors et al. (2004) for the *CEO1* knock out. The root morphology shows an elevated number of lateral roots connected to a shorter main root length, an influence of nutrients on *rimb1* phenotype was not observed. The leaf phenotype can lead back to channel-like structures on the lower leaf side in the epidermis, connected with a cell dividing blockage. The transcript level of 2-CPA in *rimb1* was reduced in seedlings and elevated in older plants in what points to a developmental regulation of 2-CPA transcript level in *rimb1*. Through mapping of *rimb1*, it was possible to identify a signal transduction element of retrograde communication that possibly acts as a kind of “ROS-sensor” and induces in combination with the transcription factor Rap2.4a the antioxidative acting *2-CPA*.

The mutant *rimb6* was mapped to a 114 kb area at the lower arm of chromosome 4 where 30 genes are encoded. To date, it has not been possible to identify the mutation locus. Using new sequencing methods like „next-generation-sequencing“, it will be possible to identify the locus in the near future. In *rimb6*, a considerable effect of the nutrients $CaCl_2$, zinc and phosphate was noticed, under optimal nutrient levels, the leaf phenotype nearly disappeared, the root morphology seems to have no influence on this and appears wild type like. The *rimb6* cells were disturbed in cell elongation as shown by reduced cell size. Jasmonic acid and salicylic acid did not have an effect on *rimb6* phenotype. The transcript levels of 2-CPA were reduced while the transcript levels of CEO1 and Rap2.4a were elevated in *rimb6* – this underscores the independence of the signalling pathways in *rimb1* and *rimb6* that was described by Heiber et al. (2007).

6.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller
(+-) Jasmonsäure	6894-38-8	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure ≥99 % (Pufferan) (MES)	4432-31-9	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
Aceton, technisch	67-64-1	ZCL, HHU, Düsseldorf, Deutschland
Agar-Agar	9002-18-0	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose, Biozym LE Agarose	9012-36-6	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Agarose, NEEO Ultra-Qualität	9012-36-6	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin, Natriumsalz	69-52-3	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
Bromothymolblau, p.A. = 3',3'-Dibromothymolsulfonphthalein	76-59-5	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Cacodylsäure Natriumsalz x 3 H_2O (Pufferan)	124-65-2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid x 2 H_20	10035-04-8	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, Deutschland
Chloroform, p.a.	67-66-3	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
CM-Sepharose, Fast flow, in Ethanol	9012-36-6	GE Healthcare, München, Deutschland
D(+) Saccharose	57-50-1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D(+) Lactosemonohydrat, purum	10039-26-6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Schweiz
DL-Dithiothreitol, 99,5 %	3483-12-3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Schweiz
D-Luciferin	2591-17-5	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
Dodecylsulfat, Natriumsalz (SDS)	151-21-3	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
DTT = Dithiothreitol = 1,4-Dithio-D,L-threitol	27565-41-9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Schweiz
EDTA, pH 8,0, ultra PURE	6381-92-6	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

EGTA = Titriplex VI, p.A.	67-42-5	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure, p.A. 100 % (Eisessig)	64-19-7	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, absolut	64-17-5	BioSolve BV, Valkenswaard, Niederlande
Ethanol, technisch	78-93-3	ZCL, HHU, Düsseldorf, Deutschland
Ethidiumbromidlösung, 1 % in H_2O	1239-45-8	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glaskugeln	G-8772	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glorix (Haushaltsbleiche)	7681-52-9	Unilever Nederland B.V., Rotterdam, Niederlande
Glucose x H_2O	50-99-7	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Glutaraldehyd	111-30-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Schweiz
Glycerin, Rotipuran >99,5 %, p.A.	56-81-5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hellmanex II, alkalischer Reiniger	7778-53-2	Hellma GmbH & Co. KG Müllheim, Deutschland
HEPES, <99,5 %	7365-45-9	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isoamylalkohol, z.A.	123-51-3	Mallinckrodt Baker B.V., Griesheim, Deutschland
Kaliumacetat, z.A.	127-08-2	Mallinckrodt Baker B.V., Griesheim, Deutschland
Kaliumchlorid, p.A.	7447-40-7	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	7778-77-0	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, Deutschland
Kaliumnitrat, p.A.	7757-79-1	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin monosulfate	25389-94-0	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
Lithiumacetat x 2 H_2O	6108-17-4	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Lugolsche Lösung	7553-56-2	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid x 6 H_20	7791-18-6	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, Deutschland

Magnesiumsulfat x 7 H_2O, z.A.	10034-99-8	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol (technisch)	67-56-1	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methylenblau	61-73-4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Murashige & Skoog Medium (Basal Salt Mixture)	entfällt	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
Natriumchlorid	7647-14-5	Mallinckrodt Baker B.V., Griesheim, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat x H_2O, p.A.	10049-21-5	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	1310-73-2	Mallinckrodt Baker B.V., Griesheim, Deutschland
Paraquatdichlorid = Methylviologen = 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid x H_2O	1910-42-5	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pepton aus Sojabohnenmehl (papainisch verdaut)	91079-46-8	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phenol (TE-Puffer gesättigt oder H_2O gesättigt)	108-95-2	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Phytagel	71010-52	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Rinderserumalbumin (*Albumin bovine Fraction V*)	9048-46-8	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
RNase (*from bovine pancreas*)	entfällt	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Salicylsäure, Natriumsalz	54-21-7	Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgien
Silicagel orange, mit Indikator (Trockengel)	1327-36-2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, p.a. (Tris)	77-86-1	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	9002-93-1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	9005-64-5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zinksulfat x 7 H_2O	7446-20-0	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

6.2 Oligonukleotid-Primer

In den folgenden Tabellen sind die für die Kartierung der Mutanten *rimb1* und *rimb6* verwendeten Oligonukleotid-Primer nach Anwendung getrennt aufgelistet. T_m bezeichnet die Schmelztemperatur des Oligonukleotid-Primers.

Tab. 6.2.I: Primer für die Kartierung der *rimb*-Mutanten in alphabetischer Reihenfolge, sortiert nach einzelnen Chromosomen. INDEL für *„Insertion/Deletion“*, SNP für *„single nucleotide polymorphism“*, CAPS für *„cutting amplified polymorphic sequences“* mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease.

Primer	Sequenz	Art	Lokalisation
AtSO392-A	TTTGGAGTTAGACACGGATCTG	INDEL	Chromosom 1
AtSO392-S	GTTGATCGCAGCTTGATAAGC	INDEL	Chromosom 1
cer450704 Fw	AAGTTCAGTGCTCCTAGCTC	INDEL	Chromosom 1
cer450704 Rev	CATGACTTCCATCATTCATC	INDEL	Chromosom 1
cer450870 rev	CTTCTTCTATGCCAAAGACC	INDEL	Chromosom 1
cer450870 fw	ATGAGTTTGAGTGGTGCCGC	INDEL	Chromosom 1
cer451062 Fw	GATCTGCCCATTGATGTTG	INDEL	Chromosom 1
cer451062 Rev	CTGTCAAGTCAGAGCACC	INDEL	Chromosom 1
cer451062-F	GATCTGCCCATTGATGTTG	INDEL	Chromosom 1
cer451062-R	CTGTCAAGTCAGAGCACC	INDEL	Chromosom 1
cer458887 fw	GTATTCAAGTGGCTATAGAG	INDEL	Chromosom 1
cer458887 rev	TTATTTCTGTTCACCGGTTC	INDEL	Chromosom 1
cer459075-A	GCCTTGTAGAGATGAAGAAC	INDEL	Chromosom 1
cer459075-S	AAGAAGACAAAGCTCTGCAG	INDEL	Chromosom 1
cer461080 Rev	TTTGGAGTCTCCACCATCTC	INDEL	Chromosom 1
cer461080Fw	GAGAAGAACCTGTTGAGATG	INDEL	Chromosom 1
cer464642 fw	TAGTGAGCACCTACGTCC	INDEL	Chromosom 1
cer464642 rev	TGTACTAACTGTTTCGGCAC	INDEL	Chromosom 1
cer464658 Fw	TACACGAGCATTGTTTGCAG	INDEL	Chromosom 1
cer464658 Rev	CACACAATGCTATAAAGCAC	INDEL	Chromosom 1
cer471950 fw	CTAGAATAGAACACAATTGTATG	CAPS BfaI	Chromosom 1
cer471950 rev	GTTTCGGATGACGTGGATTAG	CAPS BfaI	Chromosom 1
cer473053 Fw	GATTTCTCAGTGACTAATAC	CAPS XmiI	Chromosom 1
cer473053 Rev	CAAGAATCACGGAAAAGCTG	CAPS XmiI	Chromosom 1
cer473577 Fw	CAAGTAAGAAATATCAGAAATG	CAPS Bst1107I	Chromosom 1
cer473577 Rev	CTTTTTCCGTACATATAGTAG	CAPS Bst1107I	Chromosom 1
cer473726 fw	CATGCGAAATACAAATCG	SNP	Chromosom 1
cer473726 rev	CGCAACTAATGTGATGTAAGAG	SNP	Chromosom 1
cer474246 Fw	GGCAATACCTACAACACGCA	SNP	Chromosom 1
cer474246 Rev	GCCTCTGCTAATGAACTTC	SNP	Chromosom 1
cer474250 Fw	CGACGATTTCTCAGTGACTA	SNP	Chromosom 1
cer474250 Rev	CAAGAATCACGGAAAAGC	SNP	Chromosom 1
cer475714 Fw	CCAATGTGCCCCGAAGATTTG	CAPS HindIII	Chromosom 1
cer475714 Rev	CATCTGTAAATATCAACTGTCG	CAPS HindIII	Chromosom 1

cer480599 fw	CAGAGCCATAGTTTTGGAGG	CAPS BfaI	Chromosom 1
cer480599 rev	TGCCACGTAGAGATGCTTCG	CAPS BfaI	Chromosom 1
cer480645 Fw	CTCGTAAGACAATAAACACC	INDEL	Chromosom 1
cer480645 Rev	GGCACACGACATCAACATGC	INDEL	Chromosom 1
cer481833 fw	CTCCTCTAAAGGATCTCGTC	CAPS HinfI	Chromosom 1
cer481833 fw 2.x	CTAGCAGATAACTCAGCACG	CAPS HinfI	Chromosom 1
cer481833 rev	GCGTGTGTTTGTTTATGTG	CAPS HinfI	Chromosom 1
cer481873 Fw	CTTTTCCTCCTGTCCATGTG	INDEL	Chromosom 1
cer481873 Rev	TCCAAAGTGATTCATTACATG	INDEL	Chromosom 1
cer481943 fw	CTCGAGGTCTGATCAGAATC	CAPS Hpy188III	Chromosom 1
cer481943 rev	ATTGCTTCTATATTTGACAGGC	CAPS Hpy188III	Chromosom 1
cer92219-A	AACTCCAACTCTACATAGCC	INDEL	Chromosom 1
cer92219-S	GTTCTGGTAGAGATACGTTC	INDEL	Chromosom 1
F21M12 fw	TTACTTTTTGCCTCTTGTCATTG	INDEL	Chromosom 1
F21M12 rev	GGCTTTCTCGAAATCTGTCC	INDEL	Chromosom 1
F5M6-80841 fw	CACCATAGTTCCATCAATG	CAPS MsbI	Chromosom 1
F5M6-80841 rev	GCTATAGCAAACATCACACG	CAPS MsbI	Chromosom 1
nga111-F	CTCCAGTTGGAAGCTAAAGGG	INDEL	Chromosom 1
nga111-R	TGTTTTTTAGGACAAATGGCG	INDEL	Chromosom 1
nga280-F	GGCTCCATAAAAAGTGCACC	INDEL	Chromosom 1
nga280-R	CTGATCTCACGGACAATAGTGC	INDEL	Chromosom 1
T12O21-40985 fw	AGTTACTATCATTCATGGATGC	CAPS MspI	Chromosom 1
T12O21-40985 rev	GTGCTCAATGTGATCTGC	CAPS MspI	Chromosom 1
cer 461704 fw	TGGGCAGAAGATCTGTACTC	INDEL	Chromosom 2
cer 461704 rev	TTGGACAGAGATCTTGCCTG	INDEL	Chromosom 2
cer449005 fw	CTTTCATGCGGAAGTGAGTG	INDEL	Chromosom 2
cer449005 rev	TCCTCGTGCTTGGTTTGAC	INDEL	Chromosom 2
cer451559 fw	GGAGATGAGGAGTGAATCAC	INDEL	Chromosom 2
cer451559 fw	GGAGATGAGGAGTGAATCAC	INDEL	Chromosom 2
cer451559 rev	CTTGAGGCAATGAACATCG	INDEL	Chromosom 2
cer451559 rev	CTTGAGGCAATGAACATCG	INDEL	Chromosom 2
cer451817 fw	CCT AGC CTT CTT TTG ACC	INDEL	Chromosom 2
cer451817 rev	AAG CTT CTG ACT CAA CTC TC	INDEL	Chromosom 2
cer452046 fw	ATTGAGTGCATTCCTTCAC	INDEL	Chromosom 2
cer452046 rev	GATTAGGGAAGGAACTCAG	INDEL	Chromosom 2
cer452729 fw	CTACTTTTCAGTCTTCCGC	INDEL	Chromosom 2
cer452729 rev	GTTGGGCAGTACATAATCC	INDEL	Chromosom 2
cer452991-F	ACACTTCCCTTGATCACCAC	INDEL	Chromosom 2
cer452991-R	GTTCGTTTGATCGAAGGACC	INDEL	Chromosom 2
cer458709 fw	AGCAGAGTCTTGTTGGTG	INDEL	Chromosom 2
cer458709 rev	CGGTTACGTAGAGTAAGC	INDEL	Chromosom 2
nga1126 fw	CGCTACGCTTTTCGGTAAAG	INDEL	Chromosom 2
nga1126 rev	GCACAGTCCAAGTCACAACC	INDEL	Chromosom 2

cer452410 fw	TTCTCAACACCACCTCTG	INDEL	Chromosom 3
cer452410 rev	AAGACAAAATCTGAGGCG	INDEL	Chromosom 3
cer456766 fw	CTCCACCAAATCCTCCTC	INDEL	Chromosom 3
cer456766 rev	AGCTGAAGAGTGGTCTCG	INDEL	Chromosom 3
cer457693-A	CAAGCTCTCGAATAGAGATG	INDEL	Chromosom 3
cer457693-S	CGCTTCTGGTTTTCACATCC	INDEL	Chromosom 3
cer459593 fw	TATCATGACAGCCAGCCAC	INDEL	Chromosom 3
cer459593 rev	GTGAGGGACACAATTCGTC	INDEL	Chromosom 3
cer464712 fw	TTGAGGATGCAAGAGAGTC	INDEL	Chromosom 3
cer464712 rev	GAGGTACGTGAATGAACAC	INDEL	Chromosom 3
M1 fw	CAAGAAAAACCGAATTCACG	INDEL	Chromosom 3
M1 rev	AGAACTAGAATTTCCATGTC	INDEL	Chromosom 3
M2 fw	AAATAGACCCCACGAAGTCG	INDEL	Chromosom 3
M2 rev	GAGAGAAAGAGAGATGACG	INDEL	Chromosom 3
cer449525 fw	GCCATTCTGAACTATCTACG	INDEL	Chromosom 4
cer449525 rev	ACACAAACACGTGGACTGAC	INDEL	Chromosom 4
cer451720A	TGCAAACGCAGCAACATCAG	INDEL	Chromosom 4
cer451720S	CTGATATACGGACTACGGAG	INDEL	Chromosom 4
cer453574A	TGTCACTGCCCTTTACTCCG	INDEL	Chromosom 4
cer453574S	CTATTGCCAAGGGACTTGAG	INDEL	Chromosom 4
cer453870 #2 Fw	GGTTCCAAATTCCAACCACT	INDEL	Chromosom 4
cer453870 Fw	TCCAAATTCCAACCACT	INDEL	Chromosom 4
cer453870 Rev	TGCAATGCGATCACTAGCC	INDEL	Chromosom 4
cer453912 Fw 2.x	GGAGATTGAATGATATGCG	INDEL	Chromosom 4
cer453912 Rev 2.x	CGTCATTCTTCTGCTCATG	INDEL	Chromosom 4
cer453912-A	CATTCTTCTGCTCATGAATC	INDEL	Chromosom 4
cer453912-S	TGATATGCGTGGATGTACC	INDEL	Chromosom 4
cer453916 Fw	CTTCTATCTTTCGATAATAGAGTC	INDEL	Chromosom 4
cer453916 Rev	GGCAAACCTGAACTTGAC	INDEL	Chromosom 4
cer453973-A	AAAGGATGAGCTTCTCTCTG	INDEL	Chromosom 4
cer453973-S	CCTGAATATAACTCACAGAG	INDEL	Chromosom 4
cer453988 fw	GTTTCCGTAAAAGTCGAAC	INDEL	Chromosom 4
cer453988 rev	CGATTTATTTAATGATTCGG	INDEL	Chromosom 4
cer453995 fw	CTAGTGTTCTGTTTCTGATGTG	INDEL	Chromosom 4
cer453995 rev	AGGGAATACCCGAAGAC	INDEL	Chromosom 4
cer453997 fw	AGATCGACGTATAAGCTATCC	INDEL	Chromosom 4
cer453997 rev	ATGCACATGTATGCTGTG	INDEL	Chromosom 4
cer454003 fw	GTCATCGTATTACTTATGATAACTTTG	INDEL	Chromosom 4
cer454003 rev	TAACACTGGATATGACATTTATATG	INDEL	Chromosom 4
cer454004 fw	GCTAGCTAGATCTCTTCATTGTC	INDEL	Chromosom 4
cer454004 rev	AGTGTCCTGTAAGGCCC	INDEL	Chromosom 4
cer454005 Fw	GACATGACATAGCTAGCTAGATC	INDEL	Chromosom 4
cer454005 Rev	GTCTTAAGATCGCATGAAG	INDEL	Chromosom 4

cer460581 Fw	TGATAGGTTTCAGATACAGC	INDEL	Chromosom 4
cer460581 Rev	CATGGATGATAGACCACATTG	INDEL	Chromosom 4
cer461279 fw	CGGTAAGTCTCAAAAACAGAG	INDEL	Chromosom 4
cer461279 rev	CGTAATAGACCAGTAAAGAGCAG	INDEL	Chromosom 4
cer462299 fw	GTCCACTATATATGCCACGTAT	CAPS Hpy188I	Chromosom 4
cer462299 rev	TTACTTGCAAGTATTTCTATACCAC	CAPS Hpy188I	Chromosom 4
cer462437 fw	CTCAGAGGCAGAATCTCG	CAPS Hpy188I	Chromosom 4
cer462437 rev	TGAAGATTAGATTCTCTTCCATC	CAPS Hpy188I	Chromosom 4
cer462453 fw	TTCGACTCGATGTGTCAC	INDEL	Chromosom 4
cer462453 rev	TGCCAAACGGATTTAGC	INDEL	Chromosom 4
cer465859 fw	GAGGATTGACTTCCCAAAG	INDEL	Chromosom 4
cer465859 rev	GTGGTTAATGAATCATGCAG	INDEL	Chromosom 4
cer465870 fw	CCACCTAAAACAGTGTCAAC	INDEL	Chromosom 4
cer465870 rev	GTATTATTAAAGAAGATCGGACG	INDEL	Chromosom 4
cer465876 Fw	CACACTACGTGTCGTTTCTAC	CAPS Hpy188I	Chromosom 4
cer465876 Rev	GAAGAAGAAGCCATTGTAGATC	CAPS Hpy188I	Chromosom 4
cer466296 fw	ATGAGTCATTGTCCTATCGG	INDEL	Chromosom 4
cer466296 rev	TTAGCTGCCCATGATGAC	INDEL	Chromosom 4
cer466512 fw	CCGAAACCACATAATGTAATA	INDEL	Chromosom 4
cer466512 rev	TAGATATCATTTTGGTTGGG	INDEL	Chromosom 4
cer466515 Fw	TCTCTGCTCATATGCCACAC	INDEL	Chromosom 4
cer466515 Rev	AATGGTGAACCTCACCGTAG	INDEL	Chromosom 4
nga1107-F	GCGAAAAAACAAAAAATCCA	INDEL	Chromosom 4
nga1107-R	CGACGAATCGACAGAATTAGG	INDEL	Chromosom 4
nga8-F	TGGCTTTCGTTTATAAACATCC	INDEL	Chromosom 4
nga8-R	GAGGGCAAATCTTTATTTCGG	INDEL	Chromosom 4
PERL0780798-9914985 fw	CTGTCGTTTACCTCTTAGCATT	CAPS Bsp143I	Chromosom 4
PERL0780798-9914985 rev	CAAGTGATCACAGCTTCAAC	CAPS Bsp143I	Chromosom 4
cer454685-A	AAATTCGGATTCGAGGCAAG	INDEL	Chromosom 5
cer454685-S	ATATTGTAAAACGGAGAAAG	INDEL	Chromosom 5
cer455033-A	ATGGAACAACTAGCATTAGC	INDEL	Chromosom 5
cer455033-S	GGATGTTAGTCATGTCACTG	INDEL	Chromosom 5
MBK5 fw	GAGCATTTCACAGAGACG	INDEL	Chromosom 5
MBK5 rev	ATCACTGTTGTTTACCATTA	INDEL	Chromosom 5
MCO15-A	ACGAGGTAAAAGGTCGGTCC	INDEL	Chromosom 5
MCO15-S	TAACCGAGCGAGGGCTACAG	INDEL	Chromosom 5
nga139-A	AGAGCTACCAGATCCGATGG	INDEL	Chromosom 5
nga139-S	GGTTTCGTTTCACTATCCAGG	INDEL	Chromosom 5
nga249 fw	GGATCCCTACTGTAAAATCCC	INDEL	Chromosom 5
nga249 rev	TACCGTCAATTTCATCGCC	INDEL	Chromosom 5

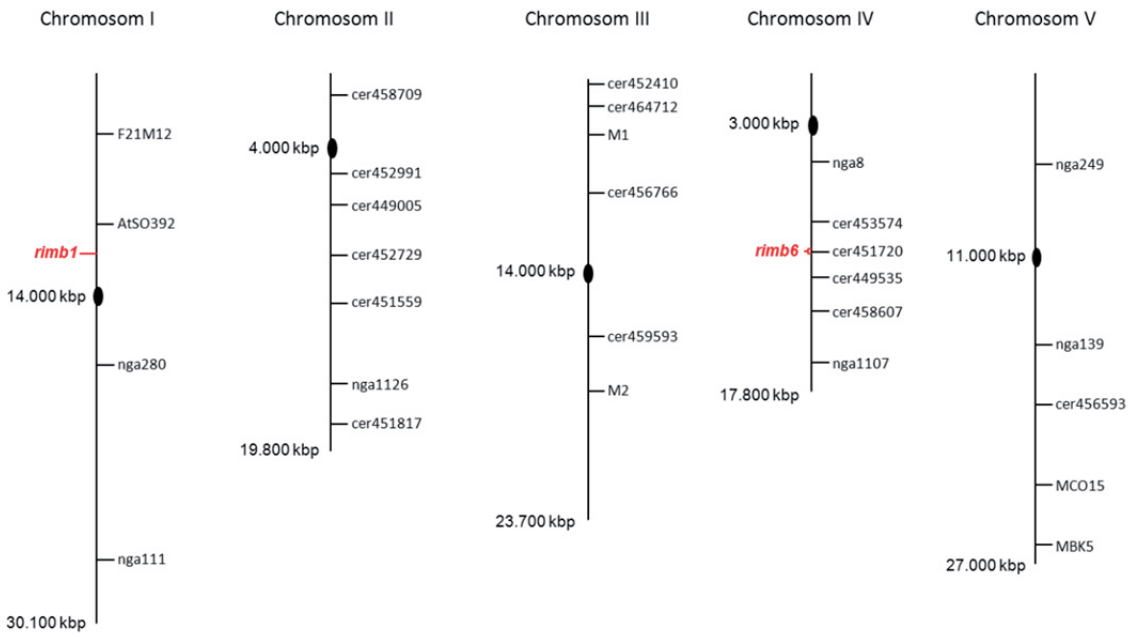


Abb. 6.2.I: Übersicht der verwendeten Marker für die Kartierung des Chromosomenarms und Lokalisation der Region. Die Lage der Mutante *rimb1* und der Bereich, in dem *rimb6* lokalisiert, ist zusätzlich eingezeichnet. Die Zeichnung wurde angepasst von Dr. I. Heiber übernommen.

Tab. 6.2.II: Verwendete allgemeine Primer. LB für „*left border*", RB für „*right border*".

Primer	Sequenz	T_m [°C]	Primer für…
Luc-RT1	ATTGACAAGGATGGATGGCTAC	58.4	Luciferasegen
Luc-RT3	AGACCTTTCGGTACTTCGTC	57.3	Luciferasegen
SAIL - LB3	TAGCATCTGAATTTCATAACCAATCTCGATACAC	70,6	SAIL T-DNA
GABI - o8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	59,3	GABI T-DNA
FLAG - RB4	TCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGAC	73,2	FLAG T-DNA (RB)
FLAG - LB4	CGTGTGCCAGGTGCCCACGGAATAGT	78,8	FLAG T-DNA (LB)
SAIL-RB3	CATGGCATATGCTAGCATGC	64.1	SAIL T-DNA (RB)
SAIL-LB3	TTCATAACCAATCTCGATACAC	58.0	SAIL T-DNA (LB)
INRA-LB	GCCAGGTGCCCACGGAATAG	70.8	FLAG T-DNA (RB)
INRA-RB	CGGGTTGGGGTTTCTACAGGAC	69.4	FLAG T-DNA (LB)
pJET1.2 Fw	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	69,0	pJet1.2 fw (Fermentas)
pJET1.2 Rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	68,7	pJet1.2 rev (Fermentas)
M13-F(-20)	GTAAAACGACGGCCAG	57.6	M13 fw (TOPO Cloning)
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	50.6	M13 rev (TOPO Cloning)
Oligo-dT_{16}	TTTTTTTTTTTTTTTN	44.5	cDNA Synthese

Tab. 6.2.III: Genspezifische Primer für Sequenzierungen der Mutante *rimb1*. Schwarz umrandet sind die Primer für *CEO1.* Unterstrichen sind Primer, welche für den Mutationsnachweis verwendet wurden. Prom. für Promotor.

Primer	Sequenz	T_m [°C]	Primer für…
At1g32200 Fw	CATGAAGCATATGAGAAAGC	57,5	At1g32200
At1g32200 Rev	AAGGAAGGAAGAGATCTCC	56,3	At1g32200
At1g32220 fw	GACGTCGTTTATCAAGCG	59,4	At1g32220
At1g32220 rev	GCCTACCTACGATTACTCTCGT	60,2	At1g32220
At1g32220 2.x Fw	CGATGATCTGCAATCATAAGT	59,2	At1g32220
At1g32220 2.x rev	ACTTATGATTGCAGATCATCG	59,2	At1g32220
At1g32.220.1 cDNA fw	ATGACTTCGTTTCTTAGTTTCTCC	60,6	At1g32220 cDNA
At1g32.220.1 cDNA rev	TCACGCTCTCATTTTTGC	60,1	At1g32220 cDNA
At1g32220 Fw Prom	CTACTCATCAGCACAGGGA	58,9	At1g32220 Prom.
CEO1-Rko	CATTGGGGAGATTAGACAGC	61,1	At1g32230 (*CEO1*)
At1g32230–2.fw	GAAGCCAAGATCGTCAAG	58,4	At1g32230 (*CEO1*)
At1g32230 part#2 fw	TGTTCATAATGTTACTTACTGATGG	58,6	At1g32230 (*CEO1*)
At1g32230 part#2 rev	CACCAACTCCAAGTCCTTG	60,8	At1g32230 (*CEO1*)
At1g32230 part#2 fw2	GGAATGATATTACAGGATCATAGGTCTC	63,6	At1g32230 (*CEO1*)
At1g32230 part#2rev2	GGCATACCTAACGTTTGCATC	63,1	At1g32230 (*CEO1*)
At1g32230 – 1. fw	GTTGACTGACCGACTTGTAG	57,3	At1g32230 (*CEO1*)
At1g32230 – 2. fw	GAAGCCAAGATCGTCAAG	58,4	At1g32230 (*CEO1*)
At1g32230 – 1. rev	GAATCCATCTTCACACCTAC	55,9	At1g32230 (*CEO1*)
At1g32230 – 2. rev	ACACAAATGTGAGGCATC	56,7	At1g32230 (*CEO1*)
R1HAt1g32300 fw	GCGGACCTTATCTAGTATTGT	56,5	At1g32300
R1Hat1g32300 rev	ACAATACTAGATAAGGTCCGC	56,5	At1g32300
R1HAt1g32350 fw	GGATTGGCTGAGAAGTAGAC	57,9	At1g32350
R1HAt1g32350 rev	CAATTTTTTAACATCATTATATAATATTAG	55,3	At1g32350
LOL1 - S	AAGTGAGGAAATGGGAGAA	58,7	At1g32540 (*LOL1*)
LOL1 - A	TCTTGATCGAAGAGAGAGTG	57,2	At1g32540 (*LOL1*)
LOL1-2 fw	CACCATATCCAACACCTC	56,0	At1g32540 (*LOL1*)
LOL1-2 rev	CTTCCTCTATATTGCTCATAACTC	56,9	At1g32540 (*LOL1*)
AT1G32760.1 Fw	CGTCTCTCTTTCACTCAATC	56,5	At1g32760
AT1G32760.1 Rev	CAAACAAAGAACGTATCTCTACC	58,4	At1g32760
R1H Atg32760 fw	GCACACAAGTTTAATTGATAGTTT	57,9	At1g32760
R1H Atg32760 rev	GGAAGATCCATATCAATGATAAG	58,0	At1g32760

Tab. 6.2.IV: Für die qPCR verwendete Primer.

Primer	Sequenz	T_m [°C]	Primer für…
At1g36060.1 qPCR fw	GTCAGCGCCACAACAACATTCC	70,8	qPCR *Rap2.4a*
At1g36060.1 qPCR rev	AACATCCGAAGTCGGTGAACCC	70,1	qPCR *Rap2.4a*
At1g32230 qPCR fw	TTCCTCCTCAATTGGAGTCAAACC	68,1	qPCR *CEO1*
At1g32230 qPCR rev	AACCAACACTGTTTGCACTTCCTG	68,1	qPCR *CEO1*
At3g11630 qPCR fw	TTTACTTTCGTCTGCCCAACAGAG	67,2	qPCR *2-CPA*
At3g11630 qPCR rev	TCTCAAATTCTGAATGCCGGTCAC	70,0	qPCR *2-CPA*

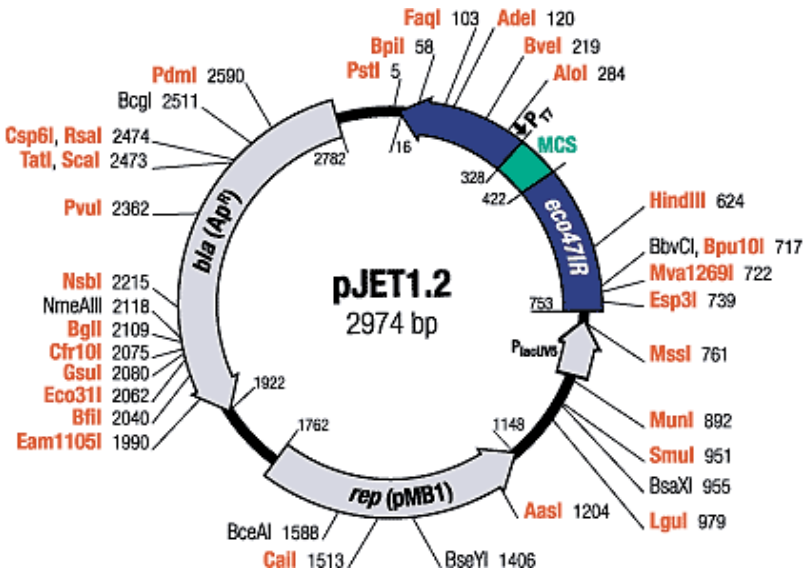
Tab. 6.2.V: Genspezifische Primer für Sequenzierungen der Mutante *rimb6*. Prom. für Promotor, fw für *„forward“*, rev für *„reverse“*.

Primer	Sequenz	T_m [°C]	Primer für…
At4g17070 Fw	GAGTCACTGTACTCAGTTTCG	56,5	At4g17070
At4g17.070 2.x fw	CGAAGATAAGTCCAGATGTC	56,2	At4g17070
At4g17070 cDNA Fw	TCATGAACCGGTTTCTTCTT	61,1	At4g17070 cDNA
At4g17070 cDNA Rev	ATGACATATTACTTCTCTCTTCCTTT	58,5	At4g17070 cDNA
At4g17070 Promo. Rev	CATGGTGATCGGTGAC	56,2	At4g17070 Prom.
At4g17070 Rev	ACACTCTCTCTTCTCTTTCTCTC	56,7	At4g17070
At4g17070 2.x rev	CAATCATCTGCCATGAAAG	59,2	At4g17070
At4g17770 fw#1	CTGTTGCAGACATTGTATCTAC	56,4	At4g17770
At4g17770 fw#2	CGTCACGAGAAGCATC	55,9	At4g17770
At4g17770 fw#2#2	GCGTCACGAGAAGCATCAC	64,9	At4g17770
At4g17770 rev#1	TCAAGATCTTGTATAAAGCTACG	56,9	At4g17770
At4g17770 rev#1#2	CATATCTTCACGCATACCATC	59,5	At4g17770
At4g17770 rev#2	GTCACCACTCTTCTTATTTAGTG	56,2	At4g17770
At4g17770 rev#2#2	GAACCAAATGCCCCCTTAAC	64,1	At4g17770
At4g17810.1 fw	CATGGTCCAACGAAAGAG	59,2	At4g17810
At4g17810.1 rev	CAAAGCATGAAATCGAATG	59,1	At4g17810
At4g17840 fw#1	ATGTCTTCATCAGGATCATTTC	59,4	At4g17840
At4g17840 fw#2	GAGCTCTTCTCCAACTGAAC	58,2	At4g17840
At4g17840 rev#1	TGTAGACATGCAAAGTGGTAC	57,7	At4g17840
At4g17840 rev#2	GTTCAGTTGGAGAAGAGCTC	58,2	At4g17840
At4g17850 fw	CACATATGACTTAAACGAATCTG	57,8	At4g17850
At4g17850 rev	GTTACTTGAATATCCTGCCTC	56,9	At4g17850
At4g17870.1 fw	GAAACGTGAGTATATTTGTTTTCA	58,7	At4g17870
At4g17870.1 rev	CAAAATAACCTTGCACGTC	58,2	At4g17870
At4g17880 - S	GTGAGATGATTGCCAGAAC	58,1	At4g17880
At4g17880-A-Prom	TCCAATAACGAAGCCAAC	58,6	At4g17880 Prom.
At4g17880-S No2	GAGAGACAGAGGAGAGAAGTAAG	57,1	At4g17880 cDNA
At4g17880.1cDNA-S	TCATGGACATTCTCCAACT	57,9	At4g17880 cDNA
At4g17880.1 cDNA-A	ATGTCTCCGACGAATGTT	58,0	At4g17880 cDNA
At4g17890.1 cDNA fw	ATGGCTTCTTCTTCTGCT	56,6	At4g17890 cDNA
At4g17890.1 cDNA rev	TTACAGCATTCTGTCTTGAATA	56,6	At4g17890 cDNA
At4g17890 fw	GTTGGCTTCGTTATTGGA	58,6	At4g17890
At4g17895#1 fw	CCTAAAGATAATGCCAAAAAG	57,1	At4g17895
At4g17895#1 rev	AAGAACTCATTCCCACCTAC	57,1	At4g17895
At4g17895#2 fw	CAGATATGAAGTTCCATGTCAC	58,5	At4g17895
At4g17895#2 rev	CATCTATTCTAGTGACCTGCG	59,0	At4g17895
At4g17895#3 fw	CTAAGATATGGCATCACTTTG	56,4	At4g17895
At4g17895#3 rev	ACCAGAACTACTAGTATGCACG	57,6	At4g17895
At4g17905 Fw	GTATGTATGTATAAATTTCTCAAAGTG	56,0	At4g17905
At4g17905 Rev	AGGTATGTTCCACTCTTGC	56,6	At4g17905

At4g17920 fw	CACTACCTACAACATCTATAACCA	56,5	At4g17920
At4g17920 rev	GGTATATGAGAAGTCTCACGG	57,7	At4g17920
At4g17940 fw	GTCAGATAATCGTACGGTAGAA	57,4	At4g17940
At4g17940 rev	CCTATATTCAACGAATTATCCAC	58,0	At4g17940
At4g17950 1.x fw	GCTTTTGTATAGTTTAGAATTTCG	57,0	At4g17950
At4g17950 1.x rev	CTAATGTGATGCTTCGTCA	57,3	At4g17950
At4g17950 2.x fw	CCAAGAAGCAAGCAATG	57,9	At4g17950
At4g17950 2.x rev	ACTAACTAGATCGTCCCTCG	57,4	At4g17950
At4g17950#1-3.fw	TTATTGAGGACTGTTGCCA	59,3	At4g17950
At4g17950#1-3.rev	CACGCCTCATGTCATTG	59,8	At4g17950
At4g17950#1-4.fw	GAATACAGATTGCGCGTG	60,5	At4g17950
At4g17950#1-4.rev	ACTAACTAGATCGTCCCTCGTC	60,2	At4g17950
At4g17980 fw	GATAGACGTTCACAACTAGTTCTTC	59,0	At4g17980
At4g17980 rev	TTAGTTAAATATTAGCTTTCGACAAC	57,9	At4g17980
At4g18100 fw	CTACCGAATGTGAGAGACTC	56,3	At4g18100
At4g18100 rev	CGTGAAAGAAATCTTATTGG	56,4	At4g18100
At4g18170 2.x fw	CGTCCACTATATATGCCACG	60,4	At4g18170
At4g18170 2.x rev	GGGTATTGGTAGTTGTAGAGATC	57,2	At4g18170
At4g18170 fw	GAGAACGAGAGACGAAGAC	56,5	At4g18170
At4g18170 rev	GCGAAAATATGTATCCAACG	59,5	At4g18170

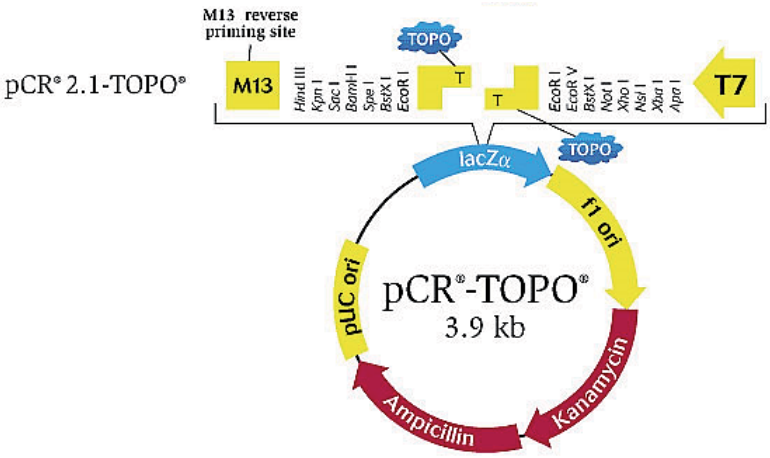
Alle Primer wurden mit dem „Design Tool“ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) (*http://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool?prod_typ e=STANDARD*) erstellt und überprüft.

6.3 Verwendete Plasmide



Genetische Komponenten des Plasmids pJET1.2:

rep (pMB1)	Gen für die Plasmidreplikation
Replication start	Replikationsstartpunkt
bla (Ap^R)	β-Lactamase Gen kodierend, für die Ampicillin-Resistenz
eco47IR	Gen für die positive Selektion (tödlich wenn exprimiert)
P_{lacUV5}	Modifizierter P_{lac} Promotor für das Gen *eco47IR*
T7 Promotor	T7 RNA-Polymerase Promotor
MCS (multiple cloning site)	Multiple Klonierungsstelle
Insertion site	Lokus der PCR-Fragment Insertion
pJET1.2 forward sequencing primer	Primer Bindestelle für Sequenzierung (vorwärts)
pJET1.2 reverse sequencing primer	Primer Bindestelle für Sequenzierung (rückwärts)



Genetische Komponenten des Plasmids pCR®-TOPO:

Ampicillin	Gen für die Ampicillin-Resistenz
Kanamycin	Gen für die Kanamycin-Resistenz
pUC ori	Plasmid Replikationsursprung (pUC19 Plasmid)
f1 ori	Bacteriophagen Replikationsursprung
lacZα	Gen für β-Galactosidase mit Klonierungsstelle (MCS)

Die Plasmidkarten wurden von den Websiten der Firma Invitrogen (pCR2.1-TOPO) bzw. der Firma Fermentas (pJet1.2) entnommen und zeigen die verwendeten Plasmide, wie sie zur Klonierung und anschließenden Sequenzierung eingesetzt wurden.

6.4 T-DNA Linien

In den folgenden Tabellen sind die für die Kartierung der Mutante *rimb1* und *rimb6* verwendeten T-DNA Insertionslinien aufgeführt.

Tab. 6.4.I: T-DNA Linien für die Mutante *rimb1* und Lokalisation im entsprechenden Gen. Gelb hinterlegte T-DNA Linien inserieren in das gleiche Gen. Dick umrandet die T-DNA für *CEO1/rcd1*.

T-DNA	Gen	Lokalisation im Gen
SALK_026111	At1g32210 oder At1g32220	im Promotor beider Gene
SALK_104469	At1g32210 oder At1g32220	im Promotor beider Gene
SALK_116432	At1g32230	1. Exon
SALK_022404C	At1g32330	1. Intron
SALK_011253C	At1g32360	Promotor
SALK_011648	At1g32530	Exon
SALK_087521	At1g32560	1. Intron
SALK_017464C	At1g32560	2. Exon
SALK_016801C	At1g32580	2. Exon
SALK_017005C	At1g32640	Exon

Tab. 6.4.II, nächste Seite: T-DNA Linien für die Mutante *rimb6* und Lokalisation der Insertion im entsprechenden Gen. Gelb hinterlegte T-DNA Linien inserieren in das gleiche Gen. Dick umrandete Gene liegen im Bereich des kartierten Areals.

T-DNA	Gen	Lokalisation im Gen
SALK_079916	At4g17070	Promotor
SALK_103307	At4g17070	1. Exon
SALK_107201	At4g17070 oder At4g17080	im Promotor beider Gene
SALK_056011	At4g17740	Promotor
FLAG_284G03	At4g17760 oder At4g17750	im Promotor der Gene, näher an At4g17760
FLAG_372C10	At4g17765	Promotor
FLAG_520D10	At4g17770	1. Exon
FLAG_237E04	At4g17785	Promotor
SALK_152649	At4g17788	nach der *„coding sequence“*
FLAG_630B03	At4g17800	Promotor
SAIL_24_B09	At4g17810	Promotor
SALK_038129	At4g17830	Promotor (evtl. nach At4g11740)
SALK_095745	At4g17850	2. Exon
SALK_100404	At4g17860	Promotor
SALK_052158	At4g17880	Promotor
SALK_046087	At4g17890	Promotor
SALK_064177	At4g17895	1. Exon
SALK_139889	At4g17900	nach der *„coding sequence“*
FLAG_129E02	At4g17905	Exon
SAIL_363_H01	At4g17908	Exon
SALK_087864	At4g17910	Promotor
SALK_ 150576C	At4g17920	Promotor
FLAG_492H02	At4g17930	Promotor
SAIL_715_A02	At4g17940	Promotor (evtl. in At2g45330)
SAIL_ 228_H10	At4g17950 oder At4g17940	nach den *„coding sequences“*
SALK_142690 (BX)	At4g17950	2. Exon
GABI_302B03.01	At4g17980	3. Exon
GABI_302B03.02	At4g17980	3. Exon
GABI_302B03.03	At4g17980	3. Exon
SALK_098943	At4g18010	5. Exon
SAIL_326_C07	At4g18020	7. Intron
SALK_114304	At4g18050	Promotor
GABI_296H07.07	At4g18100	nach der *„coding sequence“*
SAIL_879_F12	At4g18100	Promotor
FLAG_443C02	At4g18110	Exon
SAIL_781_D09	At4g18120	1. Exon
SALK_092529C	At4g18130	1. Exon
SALK_151923C	At4g18140	4. Exon
SALK_036298	At4g18150	Promotor
SALK_007497	At4g18170	Promotor
SALK_092786	At4g18170	nach der *„coding sequence“*
GABI_321B11.07	At4g18250	1. Intron
SAIL_768_A04	At4g18260	Promotor
FLAG_407H12	At4g18270	1. Intron

6.5 Literaturverzeichnis

Acevedo-Hernández G. J., León P., Herrera-Estrella L. R. (2005) Sugar and ABA responsiveness of a minimal *RBCS* light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4 ***Plant J*** 43: 506-519

Ahlfors R., Lång S., Overmyer K., Jaspers P., Brosché M., Tauriainen A., Kollist H., Tuominen H., Belles-Boix E., Piippo M., Inzé D., Tapio Palva E., Kangasjärvi J. (2004) *Arabidopsis* RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses ***Plant Cell*** 16: 1925-1937

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

Alscher R. G. (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants ***Physiol Plant*** 77: 457-464

Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction ***Annu Rev Plant Biol*** 55: 373-399

Aravind L. (2001) The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation ***Trends Biochem Sci*** 26: 273-275

Aravind P., Prasad M. N. V. (2005) Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism ***Plant Physiol Biochem*** 43: 107-116

Armengaud P., Zambaux K., Hills A., Sulpice R., Pattison R. J., Blatt M. R., Amtmann A. (2009) EZ-RHIZO: integrated software for the fast and accurate measurement of root system architecture ***Plant J*** 57: 945-956

Arvidsson S., **Kwasniewski M.**, **Riaño-Pachón D. M., Müller-Röber B.** (2008) QuantPrime - a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR ***BMC Bioinformatics*** 9: 465

Asada K. (1992) Ascorbate Peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants ***Physiol Plant*** 85: 235-241

Asada K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons ***Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*** 50: 601-639

Asada K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions ***Plant Phys*** 141: 391-396

Asada K., Kiso K., Yoshikawa K. (1974) Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination ***J Biol Chem*** 249: 2175-2181

Baier M., Dietz K.-J. (1996) Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases ***Plant Mol Biol*** 31: 563-564

Baier M., Dietz K.-J. (1997) The plant 2-Cys Peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants ***Plant J*** 12: 179-190

Baier M., Dietz K.-J. (1999) Protective function of chloroplast 2-Cysteine Peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis* ***Plant Phys*** 119: 1407-1414

Baier M., Dietz K.-J. (2005) Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology ***J Exp Bot*** 56: 1449-1462

Baier M., Ströher E., Dietz K.-J. (2004) The acceptor availability at photosystem I and ABA control nuclear expression of 2-Cys Peroxiredoxin-A in *Arabidopsis thaliana* ***Plant Cell Physiol*** 45: 997-1006

Ball L., Accotto G.-P., Bechtold U., Creissen G., Funck D., Jimenez A., Kular B., Leyland N., Mejia-Carranza J., Reynolds H., Karpinski S., Mullineaux P. M. (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis* ***Plant Cell*** 16: 2448-2462

Baroli I., Melis A. (1998) Photoinhibitory damage is modulated by the rate of photosynthesis and by the photosystem II light-harvesting chlorophyll antenna size ***Planta*** 205: 288-296

Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants ***C R Acad Sci Paris, Sciences de la vie*** 316: 1194-1199

Beeor-Tzahar T., Ben-Hayyim G., Holland D., Faltin Z., Eshdat Y. (1995) A stress-associated citrus protein is a distinct plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase ***FEBS Letters*** 366: 151-155

Belles-Boix E., Babiychuk E., Van Montagu M., Inzé D., Kushnir S. (2000) CEO1, a new protein from *Arabidopsis thaliana*, protects yeast against oxidative damage ***FEBS Letters*** 482: 19-24

Benaroudj N., Lee D. H., Goldberg A. L. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals ***J Biol Chem*** 276: 24261-24267

Berberich T., Uebeler M., Feierabend J. (1998) Cloning of a cDNA encoding a Thioredoxin Peroxidase (TPx) Homolog from Winter Rye (*Secale cereale* L.) (Accession No. AF076920). (PGR98-167) ***Plant Physiol*** 118: 711

Berman H. M., Westbrook J., Feng Z. , Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. (2000) The protein data bank ***Nucleic Acids Res*** 28: 235-242

Bertani G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* ***J Bacteriol*** 62: 293-300

Bethke P. C., Jones R. L. (2001) Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species ***Plant J*** 25: 19-29

Bolwell G. P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses ***Curr Opin Plant Biol*** 2: 287-294

Bonardi V., Pesaresi P., Becker T., Schleiff E., Wagner R., Pfannschmidt T., Jahns P., Leister D. (2005) Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases ***Nature*** 437: 1179-1182

Bossi F., Cordoba E., Dupré E., Santos Mendoza M., San Román C., León P. (2009) The *Arabidopsis* ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of ist own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling ***Plant J*** 59: 359-374

Bouchez D., Camilleri C., Caboche M. (1993) A binary vector based on Basta resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. ***C R Acad Sc. Paris, Sciences de la vie*** 316: 1188-1193

Bouton S., Leboeuf E., Mouille G., Leydecker M.-T., Talbotec J., Granier F., Lahaye M., Höfte H., Truong H.-N. (2002) QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis* ***Plant Cell*** 14: 2577-2590

Bréhélin C., Meyer E. H., de Souris J.-P., Bonnard G., Meyer Y. (2003) Resemblance and dissemblance of *Arabidopsis* type II peroxiredoxins: Similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity ***Plant Phys*** 132: 2045-2057

Buchanan B. B., Schürmann P., Decottignies P., Lozano R. M. (1994) Thioredoxin: A multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine ***Arch Biochem Biophys*** 314: 257-260

Buettner G. R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α-Tocopherol, and ascorbate ***Arch Biochem Biophys*** 300: 535-543

Calderwood D. A., Shattil S. J., Ginsberg M. H. (2000) Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling ***J Biol Chem*** 275: 22607-22610

Capitani G., Marković-Housley Z., DelVal G., Morris M., Jansonius J. N., Schürmann P. (2000) Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts ***J Mol Biol*** 302: 135-154

Cho Y.-H., Yoo S.-D., Sheen J. (2006) Regulatory functions of nuclear Hexokinase1 complex in glucose signaling ***Cell*** 12: 579-589

Conklin P. L., Williams E. H., Last R. L. (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant ***Proc Natl Acad Sci USA*** 93: 9970-9974

Couturier J., Ströher E., Albetel A. N., Roret T., Muthuramalingam M., Tarrago L., Seidel T., Tsan P., Jacquot J. P., Johnson M. K., Dietz K.-J., Didierjean C., Rouhier N. (2011) *Arabidopsis* chloroplastic Glutaredoxin C5 as a model to explore the molecular determinants for iron-sulfur cluster binding into glutaredoxins ***J Biol Chem*** Article accepted

Danon A., Sánchez Coll N., Apel K. (2006) Cryptochrome-1-dependent execution of programmed cell death induced by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana* ***PNAS*** 103: 17036-17041

Del Río L. A., Sandalio L. M., Yáñez J., Gómez M. (1985) Induction of a manganese-containing superoxide dismutase in leaves of *Pisum sativum* L. by high nutrient levels of zinc and manganese ***J Inorg Biochem*** 24: 25-34

Demmig-Adams B., Adams W. III (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis ***TIPS*** 1: 21-26

Denness L., McKenna J. F., Segonzac C., Wormit A., Madhou P., Bennett M., Mansfield J., Zipfel C., Hamann T. (2011) Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and Jasmonic Acid-dependent process in *Arabidopsis* ***Plant Physiol*** 156: 1364-1374

Dertinger U., Schaz U., Schulze E.-D. (2003) Age-dependence of the antioxidative system in tobacco with enhanced glutathione reductase activity or senescence-induced production of cytokinins ***Phys Plant*** 119: 19-29

Dietz K.-J. (2003) Plant peroxiredoxins ***Annu Rev Plant Biol*** 54: 93-107

Dietz K.-J., Horling F., König J., Baier M. (2002) The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and ist regulation ***J Exp Bot*** 53: 1321-1329

Dietz K.-J., Vogel M. O., Viehhauser A. (2010) AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling ***Protoplasma*** 245: 3-14

Dong C.-J., Liu J.-Y (2010) The *Arabidopsis* EAR-motif-containing protein RAP2.1 functions as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control ***BMC Plant Biol*** 10: 47

Drotar A., Phelps P., Fall R. (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells ***Plant Sci*** 42: 35-40

Droux M., Miginiac-Maslow M., Jacquot J.-P., Gadal P., Crawford N. A., Kosower N. S., Buchanan B. (1987) Ferredoxin-thioredoxin reductase: A catalytically active dithiol group links photoreduced ferredoxin to thioredoxin functional in photosynthetic enzyme regulation ***Arch Biochem Biophys*** 256: 372-380

Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence ***J Mol Biol*** 300: 1005-1016

Epple P., Mack A. A., Morris V. R. F., Dangl J. L. (2003) Antagonistic control of oxidative stress-induced cell death in *Arabidopsis* by two related, plant-specific zinc finger proteins ***PNAS*** 100: 6831-6836

Escoubas J. M., Lomas M., Laroche J., Falkowski P. G. (1995) Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool ***PNAS*** 92: 10237-10241

Esmon C. A., Tinsley A. G., Ljung K., Sandberg G., Hearne L. B., Liscum E. (2006) A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses ***PNAS*** 103: 236-241

Eun S.-O., Lee Y. (1997) Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid ***Plant Physiol*** 115: 1491-1498

Evans N. H., McAinsh M. R., Hetherington A. M., Knight M. R. (2004) ROS perception in *Arabidopsis thaliana*: the ozone-induced calcium response ***Plant J*** 41: 615-626

Fahrenholzt S. R., Doleiden F. H., Tozzolo A. M., Lamola A. A. (1974) On the quenching of singlet oxygen by α-Tocopherol ***Photochem Photobiol*** 20: 505-509

Fey V., Wagner R., Bräutigam K., Wirtz M., Hell R., Dietzmann A., Leister D., Oelmüller R., Pfannschmidt T. (2005) Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana* ***J Biol Chem*** 280: 5318-5328

Finkelstein R. R., Wang M. L., Lynch T. J., Rao S., Goodman H. M. (1998) The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein ***Plant Cell*** 10: 1043-1054

Fleury C., Mignotte B., Vayssière J.-L. (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling ***Biochim*** 84: 131-141

Flohé L., Günzler W. A., Ladenstein, R. (1976) Glutathione Peroxidase. In Glutathione: Metabolism and Function (Arias I. M. & Jakoby W. B., eds.) ***Raven Press,*** New York

Flügge U. I., Heldt H. W. (1984) The phosphate-triose phosphate-phosphoglycerate translocator of the chloroplast ***TIBS*** 9: 530-533

Foyer C. H., Halliwell B. (1976) The presence of glutathione and Glutathione reductase in chloroplast: A proposed role in ascorbic acid metabolism ***Planta*** 133: 21-25

Foyer C. H., Mullineaux P. M. (Eds.) (1994) Causes of photooxidative stress and ameliorarion of defense systems in plants. ***CRC Press,*** Boca Raton

Foyer C. H., Noctor G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses ***Plant Cell*** 17: 1866-1875

Foyer C. H., Noctor G. (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications ***Antioxid Redox Signal*** 11: 861-889

Foyer C., Spencer C. (1986) The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves ***Planta*** 167: 369-375

Fragata M., Bellemare F. (1980) Model of singlet oxygen scavenging by α-Tocopherol in biomembranes ***Chem Physics Lipids*** 27: 93-99

Frederick S. E., Newcomb E. H. (1969) Cytochemical localization of Catalase in leaf microbodies (Peroxisomes) ***J Cell Biol*** 43: 343-353

Frei B., England L., Ames B. N. (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma ***PNAS*** 86: 6377-6381

Fridovich I. (1974) Superoxide dismutases ***Adv Enzymol Relat Areas Mol Bio*** 41: 35-97

Fryer M. J., Ball L., Oxborough K., Karpinski S., Mullineaux P. M., Baker N. R. (2003) Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves ***Plant J*** 33: 691-705

Galvez-Valdivieso G., Mullineaux P. M. (2010) The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus ***Physiol Plant*** 138: 430-439

Gelhaye E., Rouhier N., Navrot N., Jacquot J. P. (2005) The plant thioredoxin system ***Cell Mol Life Sci*** 62: 24-35

Giersch C., Robinson S. P. (1987) Regulation of photosynthetic carbon metabolism during phosphate limitation of photosynthesis in isolated spinach chloroplasts ***Photosynth Res*** 14: 211-227

Gomez L. D., Noctor G., Knight M. R., Foyer C. H. (2004) Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione ***J Exp Bot*** 55: 1851-1859

Grene Alscher R., Erturk N., Heath L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants ***J Exp Bot*** 53: 1331-1341

Halliwell B. (1984) Chloroplast metabolism. The structure and function of chloroplasts in green plant cells ***Oxford University Press,*** *Oxford*

Halliwell B. (1987) Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts ***Chem Phys Lipids*** 44: 327-340

Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview ***Methods Enzymol*** 186: 1-88

Havaux M., Niyogi K. K. (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism ***PNAS*** 96: 8762-8767

Heiber I. (2007) Regulation of the cellular antioxidant defence system: Signals and signal transduction in chloroplast-to-nucleus communication ***Dissertation*** Universität Bielefeld

Heiber I., Ströher E., Raatz B., Busse I., Kahmann U., Bevan M. W., Dietz K.-J., Baier M. (2007) The redox imbalanced mutants of *Arabidopsis* differentiate signaling pathways for redox regulation of chloroplast antioxidant enzymes ***Plant Physiol*** 143: 1774-1788

Heldt H. W. (2003) Pflanzenbiochemie, ***Spektrum Akademischer Verlag GmbH***, Heidelberg, Berlin

Hesketh J. E., Villette S. (2002) Intracellular trafficking of micronutrients: from gene regulation to nutrient requirements ***PNAS*** 61: 405-414

Hofmann B., Hecht H.-J., Flohé L. (2002) Peroxiredoxins ***Biol Chem*** 383: 347-364

Holmgren A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems ***J Biol Chem*** 264: 13963-13966

Hopkins H. G. (1921) On an autoxidisable constituent of the cell ***Biochem J*** 15: 286-305

Horling F., König J., Dietz K.-J. (2002) Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins ***Plant Physiol Biochem*** 40: 491-499

Hossain M. A., Asada K. (1984) Purification of Dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme ***Plant Cell Physiol*** 25: 85-92

Hossain M. A., Nakano Y., Asada K. (1984) Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide ***Plant Cell Physiol*** 25: 385-395

Huijser C., Kortsee A., Pego J., Weisbeek P., Wisman E., Smeekens S. (2000) The *Arabidopsis* SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4: involvement of abscisic acid in sugar responses ***Plant J*** 23: 577-585

Inzé D., Van Montagu M. (1995) Oxidative stress in plants ***Curr Opin Biotech*** 6: 153-158

Jander G., Norris S. R., Rounsley S. D., Bush D. F., Levin I. M., Last R. L. (2002) *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era ***Plant Physiol*** 129: 440-450

Jaspers P., Blomster T., Brosché M., Salojärvi J., Ahlfors R., Vainonen J. P., Reddy R. A., Immink R., Angenent G., Turck F., Overmyer K., Kangasjärvi J. (2009) Unequally redundant RCD1 and SRO1 mediate stress and developmental responses and interact with transcription factors ***Plant J*** 60: 268-279

Jaspers P., Overmyer K., Wrzaczek M., Vainonen J. P., Blomster T., Salojärvi J., Reddy R. A., Kangasjärvi J. (2010) The RST and PARP-like domain containing SRO protein family: analysis of protein structure, function and conservation in land plants ***BMC Genomics*** 11: 170

Juszczuk I., Malusà E., Rychter A. M. (2001) Oxidative stress during phosphate deficiency in roots of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) ***J Plant Physiol*** 158: 1299-1305

Kanwischer M., Porfirova S., Bergmüller E., Dörmann P. (2005) Alterations in Tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress ***Plant Phys*** 137: 713-723

Kanzok S. M., Fechner A., Bauer H., Ulschmid J. K., Müller H.-M., Botella-Munoz J., Schneuwly S., Schirmer R. H., Becker K. (2001) Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster* ***Science*** 291: 643-646

Karpinski S., Escobar C., Karpinska B., Creissen G., Mullineaux P. M. (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress ***Plant Cell*** 9: 627-640

Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Kim K., Agarwal M., Fu X., Huang A., Zhu J.-K. (2006) The plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in *Arabidopsis* ***PNAS*** 103: 18816-18821

Kelly G. J., Latzko E. (1979) Soluble Ascorbate Peroxidase: detection in plants and use in vitamin C estimation ***Naturwissensch*** 66: 617-619

Kiddle G., Pastori G. M., Bernard S., Pignocchi C., Antoniw J., Verrier P. J., Foyer C. H. (2003) Effects of leaf ascorbate content on defense and photosynthesis gene expression in *Arabidopsis thaliana* ***Antioxid Redox Signal*** 5: 23-32

König J., Baier M., Horling F., Kahmann U., Harris G., Schürmann P., Dietz K.-J. (2002) The plant-specific function of 2-Cys Peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux ***PNAS*** 99: 5738-5743

König J., Lotte K., Plessow R., Brockhinke A., Baier M., Dietz K.-J. (2003) Reaction mechanism of plant 2-Cys Peroxiredoxin ***J Biol Chem*** 278: 24409-24420

Krupková E., Immerzeel P., Pauly M., Schmülling T. (2007) The TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT2 gene of *Arabidopsis* encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development ***Plant J*** 50: 735-750

Laloi C., Stachowiak M., Pers-Kamczyc E., Warzych E., Murgia I., Apel K. (2007) Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana* ***PNAS*** 104: 672-677

Lee K. P., Kim C., Landgraf F., Apel K. (2007) EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana* ***PNAS*** 104: 10270-10275

Leslie C. A., Romani R. J. (1988) Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid ***Plant Physiol*** 88: 833-837

Leterrier M., Corpas F. J., Barroso J. B., Sandalio L. M., del Río L. A. (2005) Peroxisomal Monodehydroascorbate reductase. Genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions ***Plant Physiol*** 138: 2111-2123

Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. (1994) H_20_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response ***Cell*** 79: 583-593

Lim Y. S., Cha M. K., Kim H. K., Uhm T. B., Park J. W., Kim K., Kim I. H. (1993) Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo ***Biochem Biophys Res Commun*** 192: 273-280

Lin R.-C., Park H.-J., Wang H.-Y. (2008) Role of *Arabidopsis* RAP2.4 in regulating light-and ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance ***Mol Plant*** 1: 42-57

Locke J. M., Bryce J. H., Morris P. C. (2000) Contrasting effects of ethylene perception and biosynthesis inhibitors on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) ***J Exp Bot*** 51: 1843-1849

Manfield I. W., Jen C.-H., Pinney J. W., Michalopoulos I., Bradford J. R., Gilmartin P. M., Westhead D. R. (2006) *Arabidopsis* co-expression tool (ACT): web server tools for microarray-based gene expression analysis ***Nucl Acids Res*** 34: W504-509

McCord J. M., Fridovich I. (1969) Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein) ***J Biol Chem*** 244: 6049-6065

Mehler A. H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents ***Arch Biochem Biophys*** 33: 65-77

Meyer A. J. (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling ***J Plant Physiol*** 165: 1390-1403

Mochizuki N., Tanaka R., Tanaka A., Masuda T., Nagatani A. (2008) The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in *Arabidopsis* ***PNAS*** 105: 15184-15189

Morell S., Follmann H., Häberlein I. (1995) Identification and localization of the first glutaredoxin in leaves of a higher plant ***FEBS Letters*** 369: 149-152

Moulin M., McCormac A. C., Terry M. J., Smith A. G. (2008)Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation ***PNAS*** 105: 15178-15183

Munné-Bosch S. (2005) The role of α-Tocopherol in plant stress tolerance ***J Plant Phys*** 162: 743-748

Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures ***Physiol Plant*** 15: 473-497

Nakano Y., Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts ***Plant Cell Physiol*** 22: 867-880

Niki T., Mitsuhara I., Seo S., Ohtsubo N., Ohashi Y. (1998) Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of Pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves ***Plant Cell Physiol*** 39: 500-507

Nishiyama Y., Yamamoto H., Allakhverdiev S. I., Inaba M., Yokota A., Murata N. (2001) Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery ***EMBO J*** 20: 5587-5594

Noctor G., Arisi A.-C. M., Jouanin L., Kunert K. J., Rennenberg H., Foyer C. H. (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants ***J Exp Bot*** 49: 623-647

Noctor G., Foyer C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control ***Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*** 49**:** 249-279

Obayashi T., Hayashi S., Saeki M., Ohta H., Kinoshita K. (2009) ATTED-II provides coexpressed gene networks for *Arabidopsis* ***Nucl Acids Res*** 37: D987-991

Obayashi T., Kinoshita K., Nakai K., Shibaoka M., Hayashi S., Saeki M., Shibata D., Saito K., Ohta H. (2007) ATTED-II: a database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in *Arabidopsis* ***Nucl Acids Res*** 35: D863-869

Ogawa T., Pan L., Kawai-Yamada M., Yu L.-H., Yamamura S., Koyama T., Kitajima S., Ohme-Takagi M., Sato F., Uchimiya H. (2005) Functional analysis of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding protein conferring resistance to Bax and abiotic stress-induced plant cell death ***Plant Phys*** 138: 1436-1445

op den Camp R. G. L., Przybyla D., Ochsenbein C., Laloi C., Kim C., Danon A., Wagner D., Hideg É., Göbel C., Feussner I., Nater M., Apel K. (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis* ***Plant Cell*** 15: 2320-2332

Orozco-Cárdenas M. L., Narváez-Vásquez J., Ryan C. A. (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate ***Plant Cell*** 13: 179-191

Oswald O., Martin T., Dominy P. J., Graham I. A. (2000) Plastid redox state and sugars: Interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression ***PNAS*** 98: 2047-2052

Overmyer K., Tuominen H., Kettunen R., Betz C., Langebartels C., Sandermann H. Jr., Kangasjärvi J. (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death ***Plant Cell*** 12: 1849-1862

Parsonage D., Youngblood D. S., Sarma G. N., Wood Z. A., Karplus P. A., Poole L. B. (2005) Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin ***Biochem*** 44: 10583-10592

Pesaresi P., Pribil M., Wunder T., Leister D. (2011) Dynamics of reversible protein phosphorylation in thylakoids of flowering plants: The roles of STN7, STN8 and TAP38 ***Biochim Biophys Acta*** 1807: 887–896

Pesaresi P., Schneider A., Kleine T., Leister D. (2007) Interorganellar communication ***Curr Opin Plant Biol*** 10: 600-606

Pfaffl M. W. (2004) A-Z of quantitative PCR, Chapter 3: Quantification strategies in real-time PCR, ***International University Line***, La Jolla

Pfannschmidt T., Allen J. F., Oelmüller R. (2001) Principles of redox control in photosynthesis gene expression ***Phys Plant*** 112: 1-9

Pfannschmidt T., Nilsson A., Allen J. F. (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression ***Nature*** 397: 625-628

Pfannschmidt T., Schütze K., Fey V., Sherameti I., Oelmüller R. (2003) Chloroplast redox control of nuclear gene expression - a new class of plastid signals in interorganellar communication ***Antioxid Redox Signal*** 5: 95-101

Piñas-Fernández A., Strand Å. (2008) Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses ***Curr Opin Plant Biol*** 11: 509-513

Pluthero F. G. (1993) Rapid purification of high-activity *Taq* DNA polymerase ***Nucl Acids Res*** 21: 4850-4851

Poole L. B., Ellis H. R. (1996) Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins ***Biochem*** 35: 56-64

Popescu S. C., Popescu G. V., Bachan S., Zhang Z., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S. P. (2009) MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays ***Genes Dev*** 23: 80-92

Popescu S. C., Popescu G. V., Bachan S., Zhang Z., Seay M., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S. P. (2007) Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays ***PNAS*** 104: 4730-4735

Porra R. J. (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b* ***Photosynth Res*** 73: 149-156

Price A. H., Taylor A., Ripley S. J., Griffiths A., Trewavas A. J., Knight M. R. (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium ***Plant Cell*** 6: 1301-1310

Rao M. V., Davis K. R. (2001) The physiology of ozone-induced cell death ***Planta*** 213: 682-690

Reichheld J.-P., Vernoux T., Lardon F., Van Montagu M., Inzé D. (1999) Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress ***Plant J*** 17: 647-656

Rentel M. C., Knight M. R. (2004) Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis* ***Plant Phys*** 135: 1471-1479

Rizhsky L., Davletova S., Liang H., Mittler R. (2004) The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis* ***J Biol Chem*** 279: 11736-11743

Robinson J. M., Ercetin M., Gunesekera B., Stab B., Gillaspy G. (2004) Isolation and characterization of mutants defective in Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase (5PTase) genes in *Arabidopsis thaliana* ***ASPB Plant Biology 2004 Meeting***, Lake Buena Vista (Poster)

Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms ***Annu Rev Plant Biol*** 57: 675-709

Rosso M. G., Li Y., Strizhov N., Reiss B., Dekker K., Weisshaar B. (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics ***Plant Mol Biol*** 53: 247-259

Rouhier N., Gelhaye E., Jacquot J. P. (2002) Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar ***J Biol Chem*** 277: 13609-13614

Rouhier N., Gelhaye E., Jacquot J.-P. (2004) Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems ***Cell Mol Life Sci*** 61: 1266-1277

Rouhier N., Gelhaye E., Sautiere P.-E., Brun A., Laurent P., Tagu D., Gerard J., de Fay E., Meyer Y., Jacquot J.-P. (2001) Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either Glutaredoxin or Thioredoxin as a proton donor ***Plant Phys*** 127: 1299-1309

Rouhier N., Lemaire S. D., Jacquot J.-P. (2008) The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for Glutaredoxins and glutathionylation ***Annu Rev Plant Biol*** 59: 143-166

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual ***Cold Spring Harbor Laboratory Press***, Cold Spring Harbor, New York

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors ***PNAS*** 74: 5463-5467

Sarry J.-E., Montillet J.-L., Sauvaire Y., Havaux M. (1994) The protective function of the xanthophyll cycle in photosynthesis ***FEBS Letters*** 353: 147-150

Sasaki T., Mori I. C., Furuichi T., Munemasa S., Toyooka K., Matsuoka K., Murata Y., Yamamoto A. (2010) Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter ***Plant Cell Physiol*** 51: 354-365

Sato M., Nakaharaa K., Yoshii M., Ishikawab M., Uyeda I. (2005) Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses ***FEBS Letters*** 579: 1167-1171

Sattler S. E., Gilliland L. U., Magallanes-Lundback M., Pollard M., DellaPenna D. (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination ***Plant Cell*** 16: 1419-1432

Schaedle M., Bassham J. A. (1977) Chloroplast Glutathione reductase ***Plant Physiol*** 59: 1011-1012

Scheibe R. (1994) Lichtregulation von Chloroplastenenzymen ***Naturwissensch*** 81: 443-448

Schmid M., Davison T. S., Henz S. R., Rape U. J., Demar M., Vingron M., Scholkopf B., Weigel D., Lohmann J. U. (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development ***Nature Gen*** 37: 501-506

Schröder E., Littlechild J. A., Lebedev A. A., Errington N., Vagin A. A., Isupov M. N. (2000) Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution ***Structure*** 8: 605-615

Schürmann P., Jacquot J.-P. (2000) Plant thioredoxin systems revsited ***Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*** 51: 371-400

Schwanz P., Polle A. (2001) Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pendunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO_2 concentrations. ***J Exp Bot*** 52: 133-143

Seo M. S., Kang S. W., Kimi K., Baines I. C., Lee T. H., Rhee S. G. (2000) Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate ***J Biol Chem*** 275: 20346-20354

Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C., Clarke J. D., Cotton D., Bullis D., Snell J., Miguel T., Hutchison D., Kimmerly B., Mitzel T., Katagiri F., Glazebrook J., Law M., Goff S. A. (2002) A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system ***Plant Cell*** 14: 2985-2994

Shaikhali J. (2006) Transcription of 2-Cys PrxA gene from *Arabidopsis thaliana*: Redox and ABA regulation ***Dissertation*** Universität Bielefeld

Shaikhali J., Heiber I., Seidel T., Ströher E., Hiltscher H., Birkmann S., Dietz K.-J., Baier M. (2008) The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes ***BMC Plant Biology*** 8: 48

Shi H., Kim Y. S., Guo Y., Stevenson B., Zhu J.-K. (2003) The *Arabidopsis* SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion ***Plant Cell*** 15: 19-32

Sies H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions ***Free Radical Biol Med*** 27: 916-921

Smirnoff N. (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection ***Phil Trans R Soc Lond B*** 355: 1455-1464

Staswick P. E., Su W., Howell S. H. (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant ***PNAS*** 89: 6837-6840

Storz P., Döppler H., Toker A. (2005) Protein Kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species ***Mol Cell Biol*** 25: 8520-8530

Strand A., Asami T., Alonso J., Ecker J. R., Chory J. (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX ***Nature*** 421: 79-83

Susek R. E., Ausubel F. M., Chory J. (1993) Signal transduction mutants of A*rabidopsis* uncouple nuclear *CAB* and *RBCS* gene expression from chloroplast development ***Cell*** 74: 787-799

Swarbreck D., Wilks C., Lamesch P., Berardini T. Z., Garcia-Hernandez M., Foerster H., Li D., Meyer T., Muller R., Ploetz L., Radenbaugh A., Singh S., Swing V., Tissier C., Zhang P., Huala E. (2007) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation ***Nuc Acids Res*** 36: D1009-D1014

Syros T., Yupsanis T., Omirou M., Economou A. (2004) Photosynthetic response and peroxidases in relation to water and nutrient deficiency in *Gerbera* ***Env Exp Bot*** 52: 23-31

Tanaka T., Hosoi F., Yamaguchi-Iwai Y., Nakamura H., Masutani H., Ueda S., Nishiyama A., Takeda S., Wada H., Spyrou G., Yodoi J. (2002) Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis ***EMBO J*** 21: 1695-1703

Teotia S., Lamb R.S. (2009) The paralogous genes RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 and SIMILAR TO RCD ONE1 have partially redundant functions during *Arabidopsis* development **Plant Physiol** 151: 180-198

Till B. J., Burtner C., Comai L., Henikoff S. (2004) Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases ***Nucl Acids Res*** 32: 2632-2641

Trotter E. W., Grant C. M. (2003) Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems ***EMBO reports*** 4: 184-188

Ursini F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K. D., Roveri A., Schomburg D., Flohé L. (1995) Diversity of glutathione peroxidase ***Meth Enzymol*** 252: 38-53

Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. (1997) Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C_3 plants ***EMBO J*** 16: 4806-4816

Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G. V., Provart N. J. (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets ***PLoS ONE*** 2: e718

Yamamoto, H. Y. (1979) Biochemistry of the violaxanthin cycle ***Pure Appl Chem*** 51: 639-648

Yang C.-Y., Wu C.-H., Jauh G. Y., Huang J.-C., Lin C.-C., Wang S. (2008) The LLA23 protein translocates into nuclei shortly before desiccation in developing pollen grains and regulates gene expression in *Arabidopsis* ***Protoplasma*** 233: 241-254

Yu S.-W., Andrabi S. A., Wang H., Kim N. S., Poirier G. G., Dawson T. M., Dawson V. L. (2006) Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death ***PNAS*** 103: 18314-18319

6.6 Elektronische Quellen

Programm/Datenbank	Anwendung
ImageJ 1.43 *http://rsbweb.nih.gov/ij/*	Skaliertes Messen von Flächen und Längen
EZ Rhizo 0.0 *http://www.ez-rhizo.psrg.org.uk/*	Analyse der Wurzelmorphologie
AxioVision 4.7.2 *http://www.zeiss.com/C12567BE0045ACF1/Contents-Frame/B955891346FEE6F8C1256A87004ABDF9*	Digitale Aufnahme und Bearbeitung mikroskopischer Bilder
BioEdit 3.3.19 *http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html*	Sequenzanalyse und -bearbeitung
Chromas lite 2.01 *http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html*	Auswertung von Sequenzdaten
T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool *http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress*	Übersicht genspezifischer T-DNA Linien
Design Tool *http://www.sigmaaldrich.com/configurator/servlet/DesignTool?prod_type=STANDARD*	Design und Testen von Primern
Translate nucleotides *http://hcv.lanl.gov/content/sequence/TRANSLATE/translate.html*	Übersetzung DNA zu Protein
Reverse Complement *http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html*	Berechnung der *„Reverse Complement“* DNA Basenfolge
NEBcutter V2.0 *http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php*	Schnittstellenfinder für Restriktionsenzyme
ClustalW2 *http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html*	Abgleich von Protein- und DNA-Sequenzen
NCBI *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/*	Datenbank - NCBI *„National Center for Biotechnology Information“*
TAIR *http://www.arabidopsis.org/*	Datenbank - TAIR *„The Arabidopsis Information Resource“*
eFP Browser *http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi*	Interaktions- und Arraydatenbank
Quantprime *http://www.quantprime.de/*	Design von Primern für die qPCR
Arabidopsis Coexpression Data Mining Tools (ACT) *http://www.arabidopsis.leeds.ac.uk/act/index.php*	Arraydatenbank - Positiv und negativ korrelierte Gene

6.7 Danksagung

Danke an…

…Prof. Dr. Baier für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die interessante Themenstellung.

…Prof. Dr. Zeier für die Übernahme des Gutachtens.

…die Kollegen in Bielefeld für die Einführung in die Methoden der molekularen Botanik und die Pflanzenphysiologie.

…die Kollegen in Düsseldorf für die praktischen Hilfen, Diskussionen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

….alle anderen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere meine Eltern.

6.9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und bei keiner anderen Institution eingereicht wurde. Diese Arbeit wird zum ersten Mal eingereicht.

Düsseldorf, 07.11.2011