

**Charakterisierung der PDX Proteine in *Arabidopsis thaliana*
und *Ginkgo biloba***

Dissertation

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jan Erik Leuendorf

aus Berlin

April 2011

Die in der vorgelegte Doktorschrift beschriebenen Arbeiten und Ergebnisse wurde im Zeitraum November 2006 bis April 2011 unter der Leitung von Professor Dr. Hanjo Hellmann in der Angewandten Genetik am Institut für Biologie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Professor Dr. Hanjo Hellmann

2. Gutachter: Professor Dr. Thomas Schmülling

Disputation am 31.5.2011

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Prof. Hanjo Hellmann bedanken. Ich habe unter seiner Leitung unglaublich viel gelernt und dank seiner Hilfe auch vieles zum guten Abschluß bringen können. Vielen Dank!

Danken möchte ich auch Prof. Thomas Schmülling, der mir die Möglichkeit geboten hat, meine Doktorarbeit in der Angewandten Genetik in Berlin zum Ende zu bringen. Darüber hinaus wäre ohne seine engagierte Leitung das Institut nicht so umfangreich mit den verschiedensten Analysegeräten ausgestattet, wovon ich in meiner Arbeit sehr profitiert habe.

Ebenfalls ein großes Dankeschön an Prof. Wolfgang Schuster, ohne den die Bildschirme im Institut auf Testbild liefen. Weiterhin möchte ich mich für die Hilfe bei den Methoden Blue Native Page und Größenausschlußchromatographie bedanken, die in meine Arbeit sehr wichtige Ergebnisse lieferten.

Vielen Dank auch den Mitarbeitern der Angewandten Genetik sowie dem neuen aber auch ganz besonders dem alten 109er Team. Es war eine ganz besondere Zeit. Ich habe hier große Unterstützung bekommen und neben dem riesigen Haufen Arbeit, den wir zusammen gemeistert haben, auch eine Menge Spaß gehabt.

Ganz herzlich möchte ich meiner Familie danken, die in dieser Zeit wundersamerweise etwas größer geworden ist. Es war nicht immer leicht, aber ich bin froh, daß ich es dank Eurer Hilfe geschafft habe.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vitamin B6	1
1.1.1	Entdeckung und Struktur von Vitamin B6	1
1.1.2	Funktion von Vitamin B6	2
1.1.2.1	PLP-abhängige Enzyme	2
1.1.2.2	Antioxidative Wirkung und weitere Funktionen von Vitamin B6	4
1.1.3	Vitamin B6 Derivate	5
1.2	Vitamin B6 Biosynthese	6
1.2.1	Die <i>de novo</i> Vitamin B6 Biosynthese	7
1.2.1.1	Der DXP-abhängige Syntheseweg	7
1.2.1.2	Der DXP-unabhängiger Syntheseweg	8
1.2.2	Der <i>salvage</i> Syntheseweg	9
1.3	Vitamin B6 Biosynthese in <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
1.3.1	Funktion der <i>Arabidopsis thaliana</i> PDX Proteine	10
1.3.2	Expression, Lokalisation und Interaktionsmuster der AtPDX Proteine	11
1.3.3	<i>Arabidopsis</i> PDX <i>loss-of-function</i> Mutanten	14
1.3.4	Der <i>salvage</i> Syntheseweg in <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
1.4	Zielsetzung der Arbeit und Arbeitsablauf	16
2	Material und Methoden	19
2.1	Materialien	19
2.2	Verwendete Organismen	19
2.2.1	Verwendete Bakterien- und Hefe-Stämme	19
2.2.2	Verwendete Pflanzenspezies	20
2.3	Verwendete Vektoren	21
2.4	Untersuchte Gene	21
2.5	Anzucht und Transformation der verwendeten Organismen	22
2.5.1	Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	22
2.5.2	Transformation elektrokompenter <i>A. tumefaciens</i> und <i>E. coli</i> Zellen	22
2.5.3	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	23
2.5.4	Aminosäuren	23
2.5.5	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	23
2.5.6	Antibiotika bzw. Herbizide	24
2.6	Molekularbiologische Methoden - DNA/RNA	25
2.6.1	<i>E. coli</i> Plasmid-DNA Minipräparation	25
2.6.2	Aufreinigung von DNA aus Pflanzenmaterial	25
2.6.2.1	Schnelle Aufreinigung von DNA (Weigel und Glazebrook 2001)	25
2.6.2.2	Aufreinigung für saubere DNA (Fulton et al. 1995)	25

2.6.3	Aufreinigung von RNA aus Pflanzenmaterial	26
2.6.3.1	RNA Aufreinigung für semiquantitative RT-PCR	26
2.6.3.2	RNA Aufreinigung für cDNA Synthese und quantitative Real Time PCR	26
2.6.3.3	RNA Aufreinigung von <i>A. thaliana</i> Pflanzenmaterial für Northern Blot	26
2.6.3.4	RNA Aufreinigung von <i>G. biloba</i> Pflanzenmaterial für Northern Blot	27
2.6.4	Polymerase Ketten Reaktion	27
2.6.5	Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion	28
2.6.6	Quantitative <i>Real Time</i> PCR	28
2.6.7	Agarosegelelektrophorese	29
2.6.8	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen	29
2.6.9	Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA	29
2.6.10	Northern Blot	30
2.6.11	Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde und Hybridisierung	30
2.6.12	Generierung der DNA Konstrukte	30
2.6.12.1	Klassische Klonierung	30
2.6.12.2	Gatewayklonierung	31
2.6.12.3	Generierung der binären Expressionskonstrukte	31
2.7	Molekularbiologische Methoden – Protein	33
2.7.1	Proteinaufreinigung aus Pflanzenmaterial	33
2.7.2	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> und Aufreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen	33
2.7.2.1	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> für GST-Fusionsproteine	34
2.7.2.2	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> für HIS-Fusionsproteinen	34
2.7.2.3	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	34
2.7.2.4	Aufreinigung von HIS-Fusionsproteinen	35
2.7.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	37
2.7.4	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese	37
2.7.5	Coomassiefärbung von Proteingelen	38
2.7.6	Western Blot	38
2.7.7	Immunodetektion	38
2.7.8	Ponceaufärbung von PVDF Proteinmembranen	39
2.7.9	Blue Native Page	39
2.8	Interaktionsstudien und Komplexanalyse	40
2.8.1	Pulldown (Affinitätsaufreinigung)	40
2.8.2	Yeast Two-Hybrid Assay	41
2.8.3	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation, Split-YFP Analyse.	41
2.8.4	Größenausschlusschromatographie; FPLC Analyse	42
2.9	Untersuchung pflanzlicher Parameter	43
2.9.1	Pflanzenanzucht und Pflanzentransformation	43
2.9.2	Analyse der untersuchten <i>Arabidopsis thaliana</i> Insertionslinien	44
2.9.3	Analyse des Frischgewichtes von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	45
2.9.4	Wurzellängenwachstumsassay	45
2.9.5	Hitzeschock	45
2.9.6	Phänotypische Analyse der <i>Arabidopsis thaliana</i> Samen- bzw. Embryonenentwicklung	45
2.9.7	Lokalisationsstudien von AtPDX1.2 und At5g65840	46
2.9.8	Messung der Vitamin B6 Gehalte und Metabolitprofiling	46

3	Ergebnisse	49
3.1	Analyse von AtPDX1 und AtPDX2 Überexpressionspflanzen	49
3.1.1	Phänotypische Analyse von <i>AtPDX1</i> und <i>AtPDX2</i> überexprimierenden Pflanzen	49
3.1.2	Analyse der <i>AtPDX</i> Expression in <i>P35S:myc:AtPDX</i> Pflanzenlinien	53
3.1.3	Funktionalitätsanalyse der <i>P35S:myc:AtPDX</i> Konstrukte	55
3.1.4	Effekt der <i>P35S:myc:AtPDX</i> Expression auf den Vitamin B6 und Metabolit Gehalt von <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
3.2	Interaktion und Komplexbildung der AtPDX Proteine	63
3.2.1	<i>In planta</i> Interaktionen von AtPDX1 Proteinen	63
3.2.2	Bildung von hochmolekularen AtPDX1 Proteinkomplexen	65
3.3	Charakterisierung von <i>Ginkgo biloba</i> PDX1	70
3.3.1	<i>Ginkgo biloba</i> PDX1 Expressionsanalyse	70
3.3.2	Funktionalität von GbPDX1; Komplementation der <i>rsr4-1</i> Mutante	71
3.3.3	GbPDX1 Interaktionsanalyse	74
3.4	Funktionale Charakterisierung des <i>Arabidopsis thaliana</i> PDX1.2 Proteins	75
3.4.1	Spezifische Induktion der Expression von <i>AtPDX1.2</i> bei erhöhten Temperaturen	75
3.4.2	Charakterisierung einer <i>AtPDX1.2</i> Nullmutante	77
3.4.3	Phänotypische Analyse der Samen von heterozygoten <i>atpdx1.2-1</i> Pflanzen	81
3.4.4	Analyse der Lokalisation von AtPDX1.2	83
3.5	Charakterisierung neuer Interaktionspartner der AtPDX1 Familie	86
3.5.1	Interaktionsanalyse	86
3.5.2	Charakterisierung von At5g65840	89
4	Diskussion	93
4.1	<i>Gain-of-function</i> Mutanten: Ein Ansatz der Funktionsbeschreibung der <i>Arabidopsis thaliana</i> PDX Protein-Familie.	93
4.1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> reagiert hypersensitiv auf die ektopische Expression von <i>AtPDX1.3</i>	94
4.1.2	Veränderungen in der <i>AtPDX1</i> Expression führen zu Effekten im Vitamin B6 Gehalt von <i>P35S:myc:AtPDX</i> Pflanzen	96
4.1.3	Die veränderte Metabolitgehalte weisen auf einen photorespiratorischen Defekt und stressbedingte Reaktionen in den <i>P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}</i> Pflanzen hin.	98
4.1.4	Phänotypischer Effekt der ektopischen Expression von <i>AtPDX1.3</i>	101
4.2	Interaktion und Komplexbildung der AtPDX Proteine: Hinweise auf eine zu Bakterien, Pilzen und Archaeen ähnlich aufgebaute pflanzliche PLP Synthase	103
4.2.1	Nachweis von hochmolekularen AtPDX Komplexen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	103
4.2.2	Hinweise auf die Komposition von AtPDX1 Komplexen	104
4.3	Funktionelle Redundanz von AtPDX1 Proteinen	107
4.4	Charakterisierung des <i>Ginkgo biloba</i> PDX1 Proteins	110
4.5	Funktionale Charakterisierung des <i>Arabidopsis thaliana</i> PDX1.2 Proteins	113
4.5.1	Hinweise auf eine embryospezifische Aktivität des AtPDX1.2 Proteins	113
4.5.2	Die Funktion von AtPDX1.2 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	116

4.6	Charakterisierung des AtPDX1 Interaktors At5g65840	119
4.6.1	Allgemeine Beschreibung des At5g65840 Proteins	119
4.6.2	Möglicher funktioneller Zusammenhang von At5g65840 und den AtPDX1 Proteinen	120
5	Zusammenfassung	125
6	Summary	127
7	Literaturverzeichnis	129
8	Abkürzungsverzeichnis	141
9	Abbildungsverzeichnis	143
10	Tabellenverzeichnis	145
11	Erfolgte Publikationen	147
12	Anhang	149

1 Einleitung

1.1 Vitamin B6

1.1.1 Entdeckung und Struktur von Vitamin B6

Vitamin B6 wurde in den 1930er Jahren im Zusammenhang mit Untersuchungen an „Pellagra“, einer humanen Hautkrankheit, gefunden (György 1934; Kuhn und Wendt 1938). Zunächst als *rat pellagra prevention factor* (György 1934) bezeichnet, wurde es nach der Aufklärung der Struktur 1939, aufgrund der Ähnlichkeit zu Pyridin, in Pyridoxin umbenannt (György und Eckardt 1939). Weitere Studien zeigten, daß zu dem physiologisch aktiven Vitamin B6 nicht nur Pyridoxin, sondern auch dessen Derivate Pyridoxal und Pyridoxamin zu zählen sind (Snell et al. 1942; Snell 1944). So umfaßt der heute geläufige Begriff Vitamin B6 eine Gruppe von Pyridoxinderivaten, die sich in den Substituenten an 4' Position folgendermaßen unterscheiden: Pyridoxin (PN) trägt eine Hydroxylgruppe (CH₂-OH), Pyridoxal (PL) eine Aldehydgruppe (CH-O) und Pyridoxamin (PM) eine Aminogruppe (CH₂-NH₂) (Abbildung 1.1). Desweiteren können die Vitamin B6 Derivate auch als phosphorylierte Versionen vorliegen.

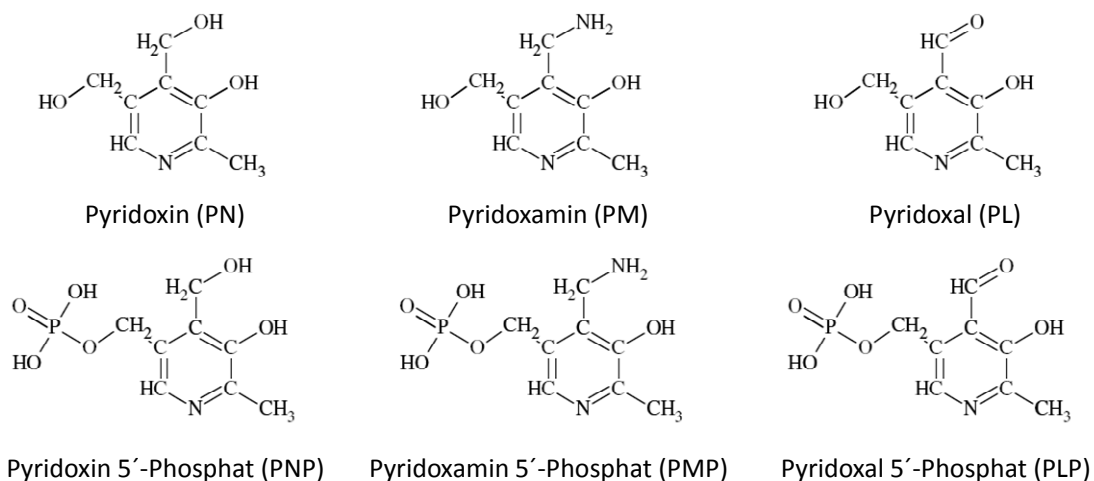


Abbildung 1.1: Strukturelle Darstellung der Vitamin B6 Derivate. Pyridoxin, Pyridoxamin und Pyridoxal in ihrer unphosphorylierten sowie phosphorylierten Form, verändert nach Mooney und Hellmann (2010).

1.1.2 Funktion von Vitamin B6

1.1.2.1 PLP-abhängige Enzyme

Nach der Entdeckung von Vitamin B6 wurden in den ersten Studien ausschließlich über die Funktion der Pyridoxinderivaten im tierischen Wachstum berichtet (György 1934; Snell et al. 1942). Seit diesen frühen Untersuchungen ist die wahre Bedeutung von Vitamin B6 besser erkannt worden und es konnte aufgeklärt werden, daß Vitamin B6 in deutlich mehr Prozessen eine wichtige Rolle spielt. So erfüllt z.B. Vitamin B6 in Form von Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP) seine primäre Funktion als Kofaktor für viele essentielle enzymatische Reaktionen in diversen Stoffwechselwegen und ist damit unverzichtbar für alle Organismen. Dies ist insbesondere hervorzuheben, da nur Pflanzen, Pilze, Archaeen und einige Bakterien die Fähigkeit besitzen, Vitamin B6 selbst herzustellen. Tierische Organismen, der Mensch eingeschlossen, können dagegen Vitamin B6 nicht neu synthetisieren und sind auf dessen Aufnahme durch die Nahrung angewiesen.

Enzyme, welche PLP als Kofaktor benötigen, faßt man aufgrund ihrer hohen Anzahl zu einer eigenen PLP-abhängigen Enzymgruppe zusammen. Zu ihnen gehören über 140 verschiedene Enzyme, die nach dem „*Enzyme Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*“ (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme) zu 5 von 6 Enzymklassen gehören (Oxidoreduktasen EC1, Transferasen EC 2, Hydrolasen EC 3, Lyasen EC 4, bzw. Isomerasen EC 5).

Die überwiegende Mehrheit der PLP-abhängigen Enzyme erfüllt ihre Funktion im Aminosäuremetabolismus und wird beispielsweise bei Transaminierungs-, Racemisierungs-, Decarboxylierungs-, β/γ -Eliminierungs- sowie Austauschreaktionen benötigt (Drewke und Leistner 2001; Eliot und Kirsch 2004). Trotz der Vielfalt liegt bei allen diesen Reaktionen ein Grundprinzip vor: PLP-abhängige Enzyme binden den Kofaktor PLP, in der Regel an eine konservierte ϵ -Aminogruppe eines katalytischen Lysinrestes, und formen so eine Schiff'sche Base oder internes Aldimin. Durch eine Verdrängung des Lysinrestes mittels einer Substrataminosäure kann diese im Weiteren durch die Bildung eines externen Aldimins kovalent an PLP gebunden werden (Abbildung 1.2 A). Hierbei agiert der protonierte Pyridinring von PLP als Elektronenfalle und stabilisiert die negative Ladung am α -C-Atom der Aminosäure. Abhängig von der Spezifität des Enzyms folgen die oben genannten Reaktionen. Zum Beispiel wandeln Transaminasen α -Ketosäuren zu Aminosäuren um, während

Racemasen den Schritt von D- zu L-Aminosäuren katalysieren (Grogan 1988). In anderen Reaktionen wie Eliminierungs- oder Austauschreaktionen können die Seitenketten (R) der Aminosäuren durch andere Substituenten ersetzt (Abbildung 1.2 B) oder abgespalten werden (Abbildung 1.2 C). Die letztgenannte Reaktion kann z.B. auch eine Decarboxylierungsreaktion sein, bei der CO_2 von der Aminosäure abgespalten wird.

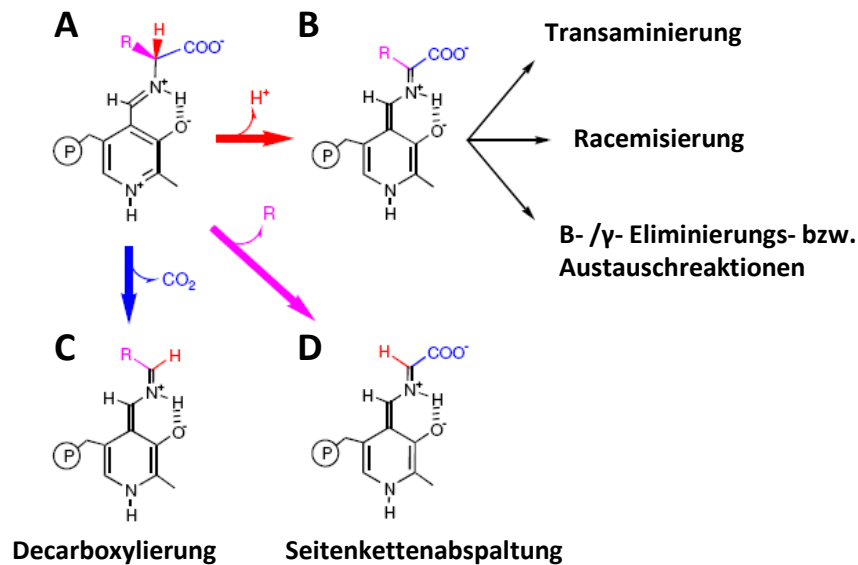


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der verschiedenen im Aminosäuremetabolismus von PLP-abhängigen Enzymen katalysierten Reaktionen. PLP-abhängige Enzyme bilden mit PLP eine Schiff'sche Base aus (internes Aldimin). Eine Substrat-Aminosäure kann dann durch Bildung eines externen Aldimins durch PLP gebunden werden (**A**). Je nach Spezifität der Enzyme kann nun die gebundene Aminosäure durch Transaminierung, Racemisierung, Eliminierung (**B**), Decarboxylierung (**C**) und Seitenkettenabspaltung (**D**) verändert werden. P-Phosphatrest, R-Seitenkette; verändert nach Percudani und Peracchi (2009)

PLP-abhängige Enzyme sind auch am Fettsäuremetabolismus beteiligt. Hier spielt das Enzym δ -6-Desaturase eine wichtige Rolle bei der Umsetzung von Linolsäure zu γ -Linolsäure (Nakamura und Nara 2004; Cabrini et al. 2005). Dieser Schritt ist limitierend bei der Synthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und damit auch für die Bildung von Phospholipiden. Die Komposition von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren in Phospholipiden ist letztlich verantwortlich für die Fluidität von Zellmembranen (Stubbs und Smith 1984).

Andere Enzyme wie die PLP-abhängige Glykogen- und Glukan-Phosphorylase zeigen, daß PLP auch eine wichtige Rolle beim Glykogen und Stärkeabbau spielt (Palm et al. 1990; Helmreich 1992). Die Enzyme vermitteln die Freisetzung von Glukose-1-P beim Abbau von Glykogen

bzw. Stärke und sind somit unmittelbar in die Regulierung des Energiehaushaltes bei tierischen und pflanzlichen Organismen involviert.

Darüber hinaus sind PLP-abhängige Enzyme in der Hämoglobin Bildung bzw. in der Chlorophyllbiosynthese aktiv. Bei beiden Biosynthesewegen ist die Bildung von δ -Aminolävulinatsäure als direkte Synthesevorstufe der reaktionsbestimmende Schritt. In Säugern und Vögeln wird δ -Aminolävulinatsäure durch das Enzym δ -Aminolävulinat Synthase gebildet. In Pflanzen und Algen wird die Säure durch Glutamat-1-semialdehyd 2,1-Aminomutase gebildet (Cheltsov et al. 2003). Beide genannten Enzyme benötigen PLP als Kofaktor.

Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung von PLP-abhängigen Enzymen ist die pflanzliche Biosynthese des Phytohormons Ethylen. Hierbei wird 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC), die direkte Vorstufe von Ethylen, von der Aminocyclopropan-carbonsäure Synthase (ACS) aus S-Adenosylmethionin gebildet (Rottmann et al. 1991).

1.1.2.2 Antioxidative Wirkung und weitere Funktionen von Vitamin B6

Neben der Funktion als Kofaktor für enzymatische Reaktionen erfüllt Vitamin B6 auch eine direkte Rolle als Antioxidant (Bilski et al. 2000; Chen und Xiong 2005; Denslow 2005). Es konnte gezeigt werden, daß Vitamin B6 im Vergleich zu Vitamin C und E eine ähnliche oder sogar höhere antioxidative Wirksamkeit aufweist (Daub und Ehrenshaft 2000; Bilski et al. 2002). Dies ist bemerkenswert, da man diese Aktivität bei strukturell ähnlichen Pyridinderivaten bisher nicht beobachten konnte. Im Speziellen bietet Vitamin B6 einen besonders effektiven Schutz vor Singulett-Sauerstoff. Diese reaktive Sauerstoffspezies ist energiereich und wird z.B. in lichtabhängigen Reaktionen von sogenannten Photosensitizern, wie z.B. bei Pflanzen den zelleigenen Chlorophyllen aus dem *light-harvesting antenna complex* der Photosynthese oder anderen chemischen Verbindungen, wie beispielsweise Rose Bengal und Cercosporin gebildet (Triantaphylides und Havaux 2009). Singulett-Sauerstoff ist ein besonders starkes Oxidationsmittel und ist für viele photooxidative Schäden in Pflanzen verantwortlich (Triantaphylides et al. 2008). Singulett-Sauerstoff dient außerdem pflanzlichen Zellen zur Pathogenabwehr und wird von ihnen selber zu diesem Zweck mit Hilfe von z.B. Phytoalexinen freigesetzt (Flors und Nonell 2006). In welcher Weise Vitamin B6 als Antioxidant schützend fungiert ist im Detail noch nicht bekannt. Zur Zeit wird diskutiert, ob Vitamin B6 direkt als Radikalfänger gegen Singulett-Sauerstoff aktiv wirkt

(Bilski et al. 2000). Möglicherweise vermindert Vitamin B6 die Produktion von Singulett-Sauerstoff, beispielsweise durch Reduktion von photoaktiviertem Cercosporin und verhindert unter Bildung von Peroxiden die Anreicherung von Singulett-Sauerstoff.

Zusätzlich zu der antioxidativen Aktivität ist Vitamin B6 nicht nur als Kofaktor direkt an Stoffwechselwegen beteiligt, sondern wird z.B. in *Saccharomyces cerevisiae*, aber auch in anderen Organismen, als direkte Vorstufe für die Thiamin (Vitamin B1) Biosynthese verwendet (Rodriguez-Navarro et al. 2002; Nosaka 2006). Vitamin B1 ist als Kofaktor wichtig für die Verwertung von Zucker als Energiequelle, im Speziellen jedoch bei der Vergärung von Zuckern. Es hat sich sogar gezeigt, daß Hefestämme mit einem intrazellulär erhöhten Vitamin B1 sowie Vitamin B6 Gehalt besonders geeignet für industriellen Fermentationsanlagen sind, wie sie z.B. in der Bioethanolgewinnung eingesetzt werden (Stambuk et al. 2009).

Ein Einsatz von Vitamin B6 in der Humanmedizin wird ebenfalls diskutiert, da das Vitamin eine mögliche positive Wirkung bei Erkrankungen wie zum Beispiel *diabetis melitus*, Bluthochdruck, Depressionen und Schizophrenie besitzt (siehe Übersicht in Mooney et al. 2009 sowie Hellmann und Mooney 2010).

Die hier in Auszügen dargestellte Funktion von PLP-abhängigen Enzymen sowie die aufgeführte direkte antioxidative Funktion zeigen deutlich, welch breites Aktionsspektrum das Vitamin B6 in den unterschiedlichsten Stoffwechselwegen bzw. zellulären Prozessen umfaßt und wie essentiell das Vorhandensein von PLP für lebende Organismen ist.

1.1.3 Vitamin B6 Derivate

Während die Funktion von PLP sehr gut erfaßt ist, gibt es zusätzlich noch eine ganze Reihe weiterer Vitamin B6 Derivate, deren Funktion nur ansatzweise oder noch nicht bekannt sind. Zu ihnen gehören z.B. N-Hexanoylpyridoxamin (HAPM), N-Nonandioylpyridoxamin Monoamid (NDAPM), N-Pentanedioylpyridoxamin Monoamid (PDAPM), N-Formylpyridoxamin (FAPM). Das bekannteste Beispiel ist 4'-O-Methylpyridoxin, das sogenannte Ginkgotoxin. Es wird von den Bäumen *Ginkgo biloba* (Leistner und Drewke 2010) bzw. verschiedenen *Albizia* Spezies (Fiehe et al. 2000) gebildet und ist ein nicht funktionales Vitamin B6 Derivat. 4'-O-Methylpyridoxin inhibiert die Phosphorylierung von Pyridoxal durch eine kompetitive Hemmung des Enzyms PDXK aus dem Vitamin B6 *salvage* Syntheseweg (siehe Abschnitt 1.2.2). Man spricht beim Ginkgotoxin auch von einem Antivitamin. Die

Aufnahme des Toxins kann bei Menschen zu epileptischen Krämpfen, neuronalen Störungen und zu einem sehr komplexen Krankheitsbild, dem sogenannten *Gin-nan-sitotoxismus*, führen (Wada et al. 1985).

Eine weiteres Vitamin B6 Derivat ist die glykosylierte Form 5'-O-(β -D-Glucopyranosyl) Pyridoxin. Glykosyliertes Vitamin B6 konnte unter anderem in Sojabohnen, Reis und *Ginkgo* nachgewiesen werden (Suzuki und Uchida 1998; Scott et al. 2000; Opassiri et al. 2004) und macht in vielen Früchten und Gemüse 5-80% des gesamt Vitamin B6 Gehaltes aus (Gregory und Ink 1987). Es wird angenommen, daß die glykosylierten Formen als Speicherform dienen, die mobilisiert werden können, wenn Vitamin B6 von der Pflanze gebraucht wird.

Ein weiteres, nicht funktionales Vitamin B6 Derivat ist 4-Pyridoxin Säure, welche als katabolisches Produkt aus der Oxidation von PN zu PL bzw. aus der Transamination von PM zu PL gebildet wird (Stanulovic et al. 1976) .

1.2 Vitamin B6 Biosynthese

Es gibt grundsätzlich verschiedene Wege des Vitamin B6 Aufbaus. Zum einen wird Vitamin B6 *de novo* neu synthetisiert und zum anderen gibt es den *salvage* Aufbauweg, eine Art Recyclingweg, indem aufgenommene Pyridoxinderivate in PLP umgewandelt werden (Abbildung 1.3).

Man unterscheidet bei den *de novo* Aufbauwegen den Deoxyxylose-5-Phosphat-(DXP) abhängigen Weg, welcher bei Eubakterien wie *Escherichia coli* vorliegt und den DXP-unabhängigen Weg, der in Archaeen, in Eukaryoten und in einigen Bakterien wie *Bacillus subtilis* vorkommt. Es ist besonders interessant festzustellen, daß die beiden *de novo* Aufbauwege jeweils in unterschiedlichen Organismen auftreten und nicht parallel ablaufen (Ehrenshaft et al. 1999a). Wie bereits erwähnt, gibt es jedoch auch Organismen wie den Menschen, die keine Neusynthese mehr betreiben und die auf eine direkte Aufnahme von Vitamin B6 durch die Nahrung angewiesen sind.

Im Gegensatz zu der Neusynthese ist der *salvage* Syntheseweg bisher in allen untersuchten Organismen mit Ausnahme von Archaeobakterien gefunden worden, unabhängig davon, ob sie einen der beiden *de novo* Syntheseweg nutzen können oder nicht (Tanaka et al. 2005). Im Folgenden werden die *de novo* und *salvage* Biosynthesewege im Detail beschrieben.

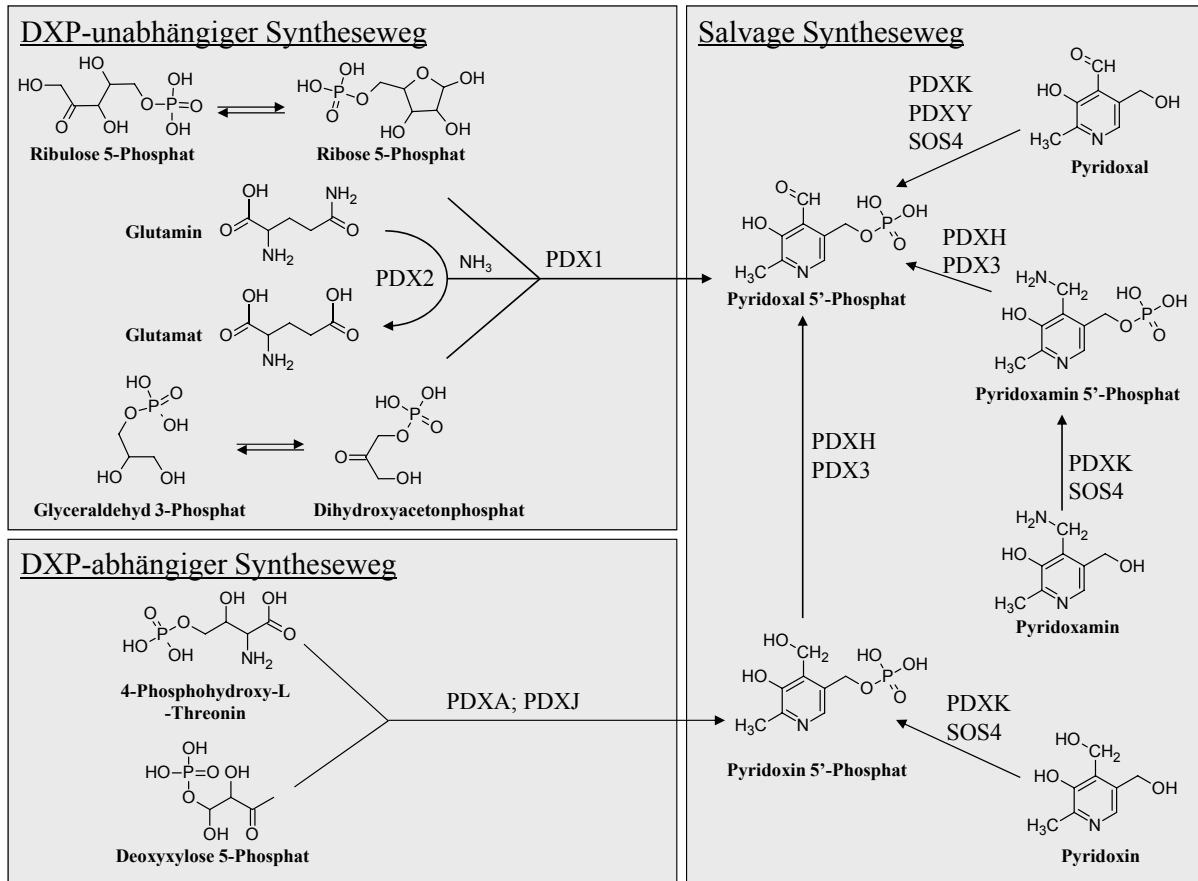


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Vitamin B6 Biosynthesewege. *De novo* DXP-unabhängiger sowie DXP-abhängiger Biosyntheseweg und *salvage* Syntheseweg; verändert nach Mooney et al. (2009).

1.2.1 Die *de novo* Vitamin B6 Biosynthese

1.2.1.1 Der DXP-abhängige Syntheseweg

Der Vitamin B6 *de novo* DXP-abhängige Syntheseweg ist am besten in *E. coli* charakterisiert worden. Es konnte gezeigt werden, daß die beiden *E. coli* Enzyme PDXJ und PDXA für die Synthese von Vitamin B6 in Form von Pyridoxin 5'-Phosphat (PNP) verantwortlich sind (Abbildung 1.3). Die beiden Enzyme verwenden 4-Phosphohydroxy L-Threonin (4HPT) und DXP, die wiederum beide Vorstufen aus der Isoprenoid bzw. Thiamin Biosynthese sind (Zhao und Winkler 1996; Cane et al. 1998; Laber et al. 1999). 4HPT wird durch eine Oxidations- sowie Transaminierungsreaktion aus D-Erythrose 4-Phosphat gebildet und DXP wird durch die Aktivität der DXP-Synthase aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd 3-Phosphat aufgebaut (Sprenger et al. 1997). Bei der Vitamin B6 Synthese katalysiert nun das Enzym PDXA die Oxidation von 4HPT zu 3-Amino 1-Hydroxyaceton 1-Phosphat (AHAP) und PDXJ formt PNP

aus den Zwischenprodukten AHAP und DXP. PDXA bildet bei der Synthesereaktion strukturell ein Proteindimer aus, welches an der Interaktionsfläche eine Bindungsfläche für 4HPT formt (Sivaraman et al. 2003), während PDXJ sich im Gegensatz dazu zu einem Oktamer aus vier Dimeren organisiert. An den Interaktionsflächen der PDXJ Dimere werden Taschen ausgebildet, in dem DXP und das frei gewordene AHAP zu PNP umgewandelt wird (Franco et al. 2001). Im Anschluß daran kann über den *salvage* Syntheseweg (siehe 1.2.2) PNP durch die Aktivität von PDXH zu PLP oxidiert werden (Notheis et al. 1995) (Abbildung 1.3).

1.2.1.2 Der DXP-unabhängiger Syntheseweg

Der zweite bekannte *de novo* Vitamin B6 Syntheseweg ist der DXP-unabhängige Weg. Dieser Syntheseweg ist weit verbreitet und sein Vorhandensein konnte bereits in Pflanzen, Pilzen, dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* und diversen Bakterien wie *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus* sowie *Thermotoga maritima* nachgewiesen werden. Der Vitamin B6 Aufbau beruht in diesem Syntheseweg auf der Aktivität der beiden Proteine PDX1 und PDX2 (steht für Pyridoxin Biosynthese Proteine und diese sind ortholog zu *B. subtilis* YaaD und YaaE, *G. stearothermophilus* PDXS und PDXT, *S. cerevisiae* SNZ und SNO) (Ehrenshaft et al. 1999a; Burns et al. 2005; Tambasco-Studart et al. 2005; Zhu et al. 2005; Gengenbacher et al. 2006; Zein et al. 2006). PDX1 und PDX2 Proteine synthetisieren PLP aus den Vorstufen Ribose 5-Phosphat bzw. Ribulose 5-Phosphat, Glycerinaldehyd 3-Phosphat bzw. Dihydroxyacetonphosphat und Glutamin (Tambasco-Studart et al. 2005) (Abbildung 1.3). Hierbei agiert PDX2 als Glutaminase (Raschle et al. 2005; Gengenbacher et al. 2006; Tambasco-Studart et al. 2007), die Glutamin zu Glutamat hydrolysiert und dadurch Stickstoff für den PLP-Heterozyklus zur Verfügung stellt. PDX1 arrangiert im Anschluß dann mit Stickstoff und den C3 sowie C5 Körpern über diverse Zwischenschritte die Bildung des Ringschlusses (Burns et al. 2005; Hanes et al. 2008). Detaillierte Kristallisationsstudien in *P. falciparum*, *B. subtilis*, *G. stearothermophilus* und *S. cerevisiae* haben gezeigt, daß beide Proteine einen hochmolekularen Synthesekomplex ausbilden (Strohmeier et al. 2006; Zein et al. 2006; Flicker et al. 2007; Neuwirth et al. 2009). Hierbei formen die PDX1 Proteine ein Dodekamer, das aus zwei kronenförmigen ineinander verzahnt angeordneten Hexameren besteht (Abbildung 1.4 c). An den 12 PDX1 Proteinen des Dodekamerkomplexes sind an der Außenseite weitere 12 PDX2 Proteine einzeln gebunden und bilden so eine zahnradähnliche Struktur aus (Abbildung 1.4 e).

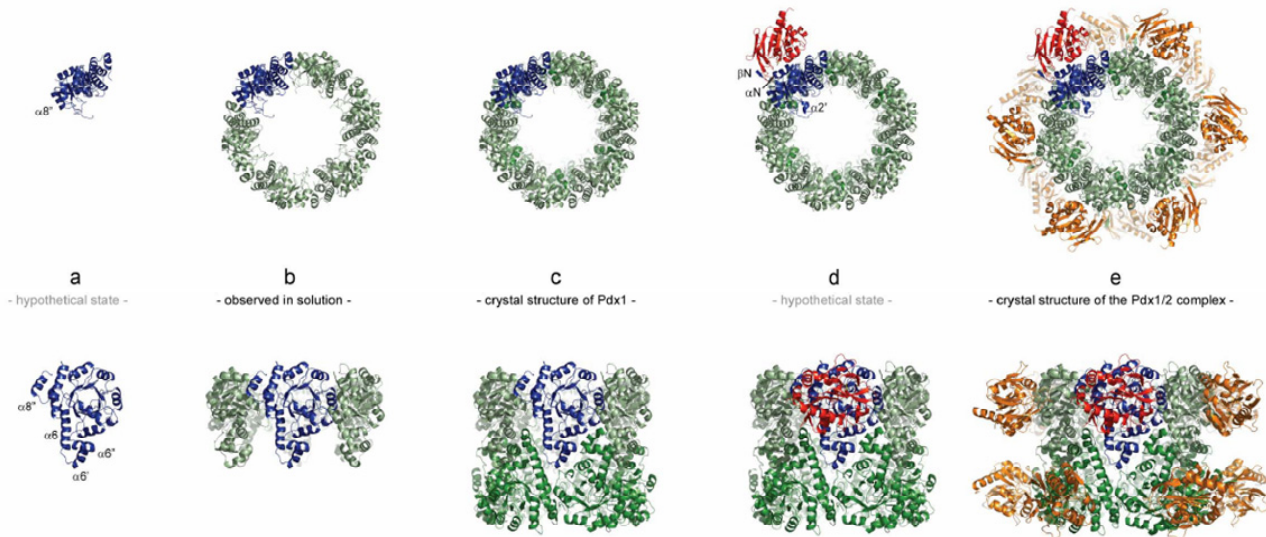


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Assemblierung des PLP-Synthasekomplexes in *B. subtilis*. Dargestellt ist die Proteinstruktur des PDX1 Monomers (blau; **a**), Hexamers (**b**), Dodekamers (**c**) und des PDX1 Dodekamers (blau/grün; **e**) mit 12 weiteren einzeln gebundenen PDX2 Proteinen (rot/orange; **e**). Die Proteinkomplexstruktur ist in der Aufsicht (Abbildung oben) und Seitenansicht (Abbildung unten) gezeigt; nach Strohmeier et al. (2006).

1.2.2 Der *salvage* Syntheseweg

Neben der Neusynthese über die *de novo* Synthesewege können die Vitamin B6 Derivate über den *salvage* Syntheseweg in ihre phosphorylierte Form sowie auch in PLP überführt werden. Die Umwandlung wird durch die Aktivität von Kinasen und Oxidasen ermöglicht. In *E. coli* konnte gezeigt werden, daß hierfür eine Oxidase PDXH und zwei verschiedene Kinasen PDXK bzw. PDXY aktiv sind (Abbildung 1.3). Die beiden Kinasen PDXY und PDXK unterscheiden sich dabei in ihrer Substratpräferenz. PDXK phosphoryliert unspezifisch alle drei unphosphorylierten Vitamin B6 Derivate (PN/PL/PM), hingegen wandelt PDXY spezifisch nur PL zu PLP um. Das Vorhandensein von zwei Kinasen im *salvage* Weg scheint allerdings auf Prokaryoten beschränkt zu sein. Bisherige Studien deuten darauf hin, daß Eukaryoten nur eine aktive PN/PL/PM Kinase besitzen (Safo et al. 2006). PDXH agiert im *salvage* Weg als PNP/PMP Oxidase und ist so für die Bildung von PLP aus PNP/PMP verantwortlich (Yang et al. 1996; Yang et al. 1998). Kristallisationsstudien haben gezeigt, daß die beiden Kinasen aus *E. coli* als Dimere agieren, bei denen jedes Protein einzeln eine aktive Reaktionsdomäne besitzt (Safo et al. 2004; Safo et al. 2006). PDXH agiert ebenfalls als Dimer und benötigt für die Aktivität den Kofaktor Flavinmononukleotid (FMN) (di Salvo et al. 2003).

1.3 Vitamin B6 Biosynthese in *Arabidopsis thaliana*

1.3.1 Funktion der *Arabidopsis thaliana* PDX Proteine

Die Vitamin B6 Biosynthese in *Arabidopsis thaliana* ist durch diverse Studien gut untersucht worden. Wie bei allen anderen analysierten Pflanzen wird auch in *A. thaliana* PLP direkt durch den DXP-unabhängigen *de novo* Syntheseweg gebildet. Im Gegensatz zu den ebenfalls gut erforschten Organismen *B. subtilis*, *P. falciparum* oder *C. nicotiana*, die je ein PDX1 und ein PDX2 Protein besitzen, existieren in *A. thaliana* drei PDX1 Proteine und ein PDX2 Protein, welche als AtPDX1.1 (*At2g38230*), AtPDX1.2 (*At3g16050*), AtPDX1.3 (*At5g01410*) und AtPDX2 (*At5g60540*) bezeichnet wurden (Tambasco-Studart et al. 2005). Die AtPDX1 Proteine weisen eine stark konservierte Aminosäuresequenz auf. AtPDX1.1 ist mit AtPDX1.3 zu 89,0 %, AtPDX1.2 ist mit AtPDX1.3 zu 61,3 % und AtPDX1.1 ist zu 59,7 % identisch mit AtPDX1.2 (Tabelle 1.1). Durch *in vitro* Aktivitäts- und Hefe- Komplementationsstudien konnte nachgewiesen werden, daß die Proteine AtPDX1.1, AtPDX1.3 sowie AtPDX2 in der Vitamin B6 Biosynthese aktiv sind. AtPDX1.2 zeigte dagegen in diesen Studien keine Aktivität und es wird angenommen, daß dieses Protein keine aktive Rolle in der Biosynthese spielt. Auch konnte bisher keine andere Funktion für AtPDX1.2 nachgewiesen werden.

Tabelle 1.1: Vergleich der Aminosäuresequenz von AtPDX1 Proteinen in Ähnlichkeit (grau unterlegt) und Identität; angegebene Werte in Prozent. Analyse der Sequenzen mit dem MatGat v2.0 Programm unter Verwendung der Blossum62 Matrix (Campanella et al. 2003).

	AtPDX1.1	AtPDX1.2	AtPDX1.3
AtPDX1.1		59,7	89,0
AtPDX1.2	79,0		61,3
AtPDX1.3	96,4	80,6	

Wie bereits erwähnt, beruht die Aktivität der PDX1 Proteine auf der Umwandlung von C3 und C5 Körpern sowie von Stickstoff zu PLP (siehe 1.2.1.). Tambasco-Studart et al. (2005) konnte durch *in vitro* Aktivitätsstudien zeigen, daß dies sogar dann der Fall ist, wenn kein AtPDX2 Protein vorliegt und Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle zur Verfügung steht. Allerdings konnte auch nachgewiesen werden, daß bei Glutamin als alleiniger Stickstoffquelle nur dann PLP synthetisiert werden kann, wenn AtPDX2 zusätzlich zu den AtPDX1 Proteinen anwesend ist. Weiterführende und vergleichende Studien zeigten darüber hinaus, daß die AtPDX1 Proteine unter bestimmten Bedingungen eine Substratspezifität bei

den verwendeten C3 und C5 Körpern zeigten. Im direkten Vergleich dazu wurde in allen Versuchen bei Zugabe von Ribose 5-Phosphat deutlich mehr und schneller PLP gebildet, als bei zugegebenem Ribulose 5-Phosphat. Bei den C3 Körpern zeigten die Proteine nur dann eine Substratpräferenz, wenn Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle verwendet wurde. Bei der Zugabe von Glycerinaldehyd 3-Phosphat und in Abwesenheit von AtPDX2 konnte so eine bis zu ca. 30 % höhere PLP-Synthaseaktivität im Vergleich zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gezeigt werden. Durch Zugabe von AtPDX2 war es möglich bei Verwendung von DHAP die Synthaseaktivität wieder anzugleichen (Tambasco-Studart et al. 2007). Das Zusammenspiel von AtPDX2 Proteinen mit den AtPDX1 Proteinen scheint also einen großen Einfluß auf die Nutzung von DHAP als Substrat für die Bildung von PLP zu haben. AtPDX1 hat auch einen Einfluß auf die Aktivität von AtPDX2. Das zeigt sich in der generell angenommenen Hauptfunktion von AtPDX2 als Glutaminase. So konnte für AtPDX2 eine AtPDX1 abhängige Aktivität nachgewiesen werden (Tambasco-Studart et al. 2007). Während bei Abwesenheit von AtPDX1 das AtPDX2 Protein nur eine recht schwache Glutaminase-Grundaktivität aufweist, ist die katalytische Aktivität in Anwesenheit von AtPDX1, eine 1:1 Stöchiometrie vorausgesetzt, um das 4-fache erhöht. Die signifikante Erhöhung konnte nur durch die Vitamin B6 biosynthetisch aktiven AtPDX1 Proteine erzielt werden. Bei Zugabe von AtPDX1.2 stieg die Glutaminaseaktivität dagegen nicht an (Tambasco-Studart et al. 2005).

1.3.2 Expression, Lokalisation und Interaktionsmuster der AtPDX Proteine

Die *AtPDX* Gene werden, mit Ausnahme von *AtPDX1.2*, in der Pflanze in allen Organen gut exprimiert. Die biosynthetisch aktiven Proteine AtPDX1.1, AtPDX1.3 und AtPDX2 zeigen in Transkriptanalysen deutlich überlappende Expressionsmuster an und sind stark in Blättern, Blüten, Stängel, aber nur schwach in der Wurzel exprimiert (Leuendorf 2006; Wagner et al. 2006). Insgesamt wird *AtPDX2* jedoch deutlich schwächer transkribiert als *AtPDX1.1* und *AtPDX1.3* (www.bar.utoronto.ca/efp [*eFP-Browser*]; Titiz et al. 2006). Das überlappende Expressionsmuster der letztgenannten Gene geht mit einer vergleichbaren enzymatischen Aktivität einher und die bisherigen Studien deuten auf eine starke funktionale Redundanz von AtPDX1.1 und AtPDX1.3 hin. Allerdings weisen beide Gene in bestimmten Organen Expressionsunterschiede auf. So konnte in Promotor:GUS Studien gezeigt werden, daß *AtPDX1.1* nicht aber *AtPDX1.3* im Endosperm von jungen Samen exprimiert wird (Leuendorf 2006; Wagner et al. 2006). Ein weiterer Unterschied zwischen *AtPDX1.1* und *AtPDX1.3* ist in

der generellen Expressionsstärke zu sehen. So wird *AtPDX1.3* insgesamt stärker exprimiert als *AtPDX1.1* (Titiz et al. 2006). *AtPDX1.2* jedoch wird im Gegensatz zu den biosynthetisch aktiven AtPDX Proteinen nur sehr schwach in den oberirdischen Pflanzenorganen exprimiert. Die stärkste Expression von *AtPDX1.2* ist in der Wurzel und dort in der Wurzelspitze zu finden (Leuendorf 2006; Wagner et al. 2006). Weiterhin konnte für *AtPDX1.2* eine stressinduzierte Expression beobachtet werden. Hier ist besonders die durch Hitze und durch das Herbizid Norflurazon induzierte Expression zu erwähnen, welche eine Erhöhung der Transkriptionsrate von bis zum 18-fachen des Normalniveaus zur Folge hat (*eFP-Browser*; Leuendorf 2006).

Die subzelluläre Lokalisation der AtPDX1 und AtPDX2 Proteine wird kontrovers beschrieben. Während in allen Arbeiten mit transienten und stabilen Lokalisationsstudien mittels AtPDX *green fluorescent protein* (GFP) Fusionsproteinen von einer cytosolischen Lokalisation der Proteine gesprochen wird (Chen und Xiong 2005; Tambasco-Studart et al. 2005; Denslow et al. 2007), gehen Chen und Xiong (2005, 2009) ebenfalls von einer Membran-assoziierten Lokalisation des AtPDX1.3 sowie des AtPDX2 Proteins aus. Hierbei wurde die Lokalisation in der Kernhüllmembran und der äußeren Chloroplastenmembran beschrieben. Eine Membran gebundene Lokalisation wird ebenfalls für das AtPDX2 Protein von Denslow et al (2007) beschrieben und unterstützt die Arbeiten von Chen und Xiong insoweit, daß eine Assoziation der AtPDX Proteine mit der äußeren Chloroplasten- und Kernmembran wahrscheinlich erscheint.

Die AtPDX Proteine zeigen in durchgeführten Interaktionsstudien unter Verwendung des Yeast two Hybrid (Y2H) System und *in vitro* Pulldown Ansätzen ein interessantes Bindungsbild. AtPDX1 Proteine können demnach mit sich selbst, aber auch untereinander mit jedem anderen AtPDX1 Protein interagieren (Abbildung 1.5). Darüber hinaus können nur die biosynthetisch aktiven AtPDX1 Proteine, AtPDX1.1 und AtPDX1.3, an AtPDX2 binden, während AtPDX1.2 keine Interaktion mit AtPDX2 zeigt (Leuendorf 2006; Wagner et al. 2006) (Abbildung 1.5). Dies ist insofern hervorzuheben, da hier erneut ein Unterschied zwischen den Vitamin B6 biosynthetisch aktiven AtPDX1 Proteinen und dem AtPDX1.2 Protein zu finden ist. Zusätzlich zu der Fähigkeit untereinander binden zu können zeigen AtPDX1 Proteine in Y2H Interaktionsscreens ebenfalls Bindungen mit anderen, zum Teil bisher

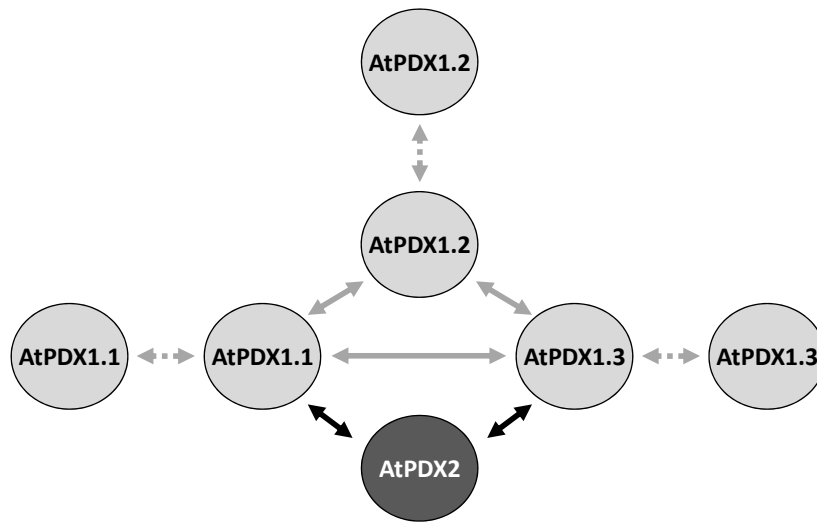


Abbildung 1.5: Übersicht der Interaktionen zwischen den AtPDX Proteinen, wie sie durch Interaktionsstudien mit dem Yeast two Hybrid System und mit *in vitro* Pulldownansätzen nachgewiesen werden konnten. Graue Pfeile symbolisieren AtPDX1 homomere (gestrichelt) bzw. heteromere Interaktion (durchgezogen), schwarze Pfeile symbolisieren die AtPDX1 AtPDX2 Interaktion.

uncharakterisierten, Proteinen an (Leuendorf 2006; Liese 2007; Rueschhoff 2010). Eine Auswahl an gefundenen Bindungspartnern ist in Tabelle 1.2 gezeigt. Allerdings fehlen bisher eine Bestätigung sowie eine Aufklärung des funktionellen Hintergrundes der Proteininteraktionen und so bleibt es unklar, ob die Bindungen eine biologische Relevanz haben.

Tabelle 1.2: Beispiele putativer AtPDX1 Interaktoren gefunden in verschiedenen Y2H Screens

Putativer Interaktor	Identifiziert durch
1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure-Synthase 10 (AtACS10, At1g62960)	Y2H Screen gegen das AtPDX1.1 Protein (Leuendorf 2006)
uncharakterisiertes exprimiertes Protein (At5g65840)	Y2H Screen gegen das AtPDX1.1 und AtPDX1.2 Protein (Leuendorf 2006; Liese 2007)
uncharakterisiertes Zink-bindende Oxidoreduktase (At3g28670)	Y2H Screen gegen das AtPDX1.3 Protein (Rueschhoff 2010)

1.3.3 *Arabidopsis* PDX *loss-of-function* Mutanten

Loss-of-function Studien anhand von Insertionsmutanten in *A. thaliana* bestätigen zusätzlich zu den beschriebenen *in vitro* Aktivitätsstudien die Wichtigkeit der AtPDX Enzyme für die Vitamin B6 Biosynthese und damit letztlich für die pflanzliche Entwicklung. Die analysierten *AtPDX1.1* und *AtPDX1.3* Insertionsmutanten (*atpdx1.1*, *atpdx1.3*; Tabelle 2.2) zeigen ein verlangsamtes Wachstum des Triebes und der Wurzel (Chen und Xiong 2005; Titiz et al. 2006). Außerdem zeigen sie einen leicht verminderten Vitamin B6 Gehalt (Titiz et al. 2006) sowie erhöhte Sensibilitäten gegenüber Photo-, Osmo- und Salzstress. Hierbei zeigt die *atpdx1.3* Mutante im Vergleich zu der *atpdx1.1* Mutante konstant einen ausgeprägteren Phänotyp. Ebenfalls kann nur in der *atpdx1.3* Mutante ein geringerer Chlorophyll und Vitamin B6 Gehalt gemessen werden. Kreuzt man allerdings die beiden Insertionsmutanten miteinander, so ist im doppelt homozygoten Stadium (*atpdx1.1* +/+, *atpdx1.3* +/+) ein embryonal letaler Phänotyp zu beobachten. Doppelmutanten, die noch wenigstens ein funktionales *AtPDX1* Allel tragen, sind dagegen lebensfähig. Im Vergleich zu den *atpdx1.1* bzw. *atpdx1.3* Einzelmutanten zeigt die *atpdx1.1* +/-, *atpdx1.3* +/- Doppelmutante die deutlich stärkeren Defekte im Wachstum, der Vitamin B6 Biosynthese, sowie erhöhte Stresssensitivität und einen verringerten Chlorophyllgehalt. Die *atpdx1.1* +/+, *atpdx1.3* +/- Doppelmutante ist ebenfalls kleinwüchsiger als die Einzelmutanten und weist einen geringeren Chlorophyllgehalt auf. Allerdings zeigt sie unter Gewächshausbedingungen einen höheren Vitamin B6 Gehalt als die *atpdx1.3* Einzelmutante (Titiz et al. 2006). Das *AtPDX1.3* Protein scheint demnach in der Vitamin B6 Biosynthese im Gegensatz zu dem *AtPDX1.1* Protein eine gewichtigere Rolle zu spielen.

Eine Analyse von *AtPDX1.2* Insertionsmutanten ist bisher nicht durchgeführt worden, da keine effektiven Insertionsmutanten verfügbar waren. Das Vorhandensein funktionaler *AtPDX1.2* Allele in der embryonal letalen *atpdx1.1/1.3* Doppelmutante macht aber deutlich, daß das *AtPDX1.2* Protein nicht die Funktion von *AtPDX1.1/1.3* übernehmen kann. Wie in den Aktivitätsstudien bereits angedeutet, erscheint es daher unwahrscheinlich, daß *AtPDX1.2* direkt an der Vitamin B6 Biosynthese beteiligt ist.

AtPDX2 wurde ebenfalls anhand einer T-DNA Insertionsmutante untersucht und es konnte im homozygoten Stadium vergleichbar zu den *atpdx1.1/1.3* Doppelmutanten ein embryonal letaler Phänotyp festgestellt werden (Tambasco-Studart et al. 2007). *Atpdx2* Mutanten bleiben in der embryonalen Entwicklung stehen und sterben anschließend ab. Der

embryonal letale Phänotyp läßt sich jedoch durch externe Zugabe von Vitamin B6 komplementieren, was bestätigt, daß die hier vorliegenden Defekte in der Embryonalentwicklung auf einen zu niedrigen Vitamin B6 Gehalt in den Mutanten zurückzuführen sind (Tambasco-Studart et al. 2007).

Eine weitere interessante Mutante der *de novo* unabhängigen Vitamin B6 Biosynthese ist die *reduced sugar response4-1 (rsr4-1)* Mutante, welche in einem EMS-Mutageneseansatz an *Arabidopsis* C24 Pflanzen gefunden wurde (Martin et al. 1997). Die *rsr4-1* Mutante trägt eine Punktmutation im *AtPDX1.3* Gen, die im Protein zu einem Aminosäureaustausch von Glycin (54) zu Serin führt (Wagner et al. 2006). Das Protein ist in der Konsequenz nicht mehr in der Lage mit den anderen Mitgliedern der AtPDX1 Familie oder mit dem AtPDX2 Protein zu interagieren. Phänotypisch zeigt die Mutante sehr ähnliche Merkmale wie die bekannten *atpdx1* Insertionsmutanten auf. Die Blätter der Mutante sind deutlich kleiner im Vergleich zum Wildtyp, was eine geringere Rosettengröße zur Folge hat. Die *rsr4-1* Mutante zeigt außerdem einen verspäteten Blühzeitpunkt und ein deutlich verkürztes Längenwachstum der Primärwurzel. Messungen der Metabolite zeigten außerdem, daß *rsr4-1* einen um ca. 25 % geringeren Chlorophyllgehalt und reduzierte Gehalte an Vitamin B6 aufweist. Durch Zugabe von Vitamin B6 kann das Wachstum der *rsr4-1* Mutante normalisiert werden (Wagner et al. 2006).

1.3.4 Der *salvage* Syntheseweg in *Arabidopsis thaliana*

In *A. thaliana* findet die Umwandlung der Vitamin B6 Derivate, vergleichbar zu *E. coli*, über den *salvage* Syntheseweg statt. Es sind bisher zwei verantwortliche Enzyme, die als Oxidase bzw. als Kinase wirken, charakterisiert worden. Das Protein AtPDX3/AtPPOX ist ein PDXH Homolog und vermittelt die Oxidation von PNP bzw. PMP zu PLP (Abbildung 1.3). Die Aktivität von AtPDX3/AtPPOX als PDXH Oxidase konnte durch die Komplementation der *S. cerevisiae pdx3* Mutante (PDXH Homolog) und der *E. coli pdxH* Mutante bestätigt werden (Gonzalez et al. 2007; Sang et al. 2007). Das zweite bisher bekannte Enzym, SOS4, ist ein PDXK Homolog und fungiert als PN/PL/PM Kinase, welche die Phosphorylierung zu PNP/PLP/PMP gewährleistet (Abbildung 1.3). Ein direkter Nachweis der Kinaseaktivität konnte hier ebenfalls über einen Komplementationsansatz in der *E. coli pdxk* Mutante nachgewiesen werden (Shi et al. 2002). Es konnte jedoch bisher in *A. thaliana* kein homologes Protein zu PDXK, der spezifischen *E. coli* PL Kinase, gefunden werden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit und Arbeitsablauf

Diverse Untersuchungen in *A. thaliana* und in anderen Organismen haben gezeigt, daß die PDX Proteine eine entscheidende Funktion in der Vitamin B6 Biosynthese erfüllen. Die Analysen konzentrierten sich bisher auf die Untersuchungen der Expression, der *in vitro* Vitamin B6 Syntheseaktivität sowie der Charakterisierung von *atpdx* Nullmutanten. Hierbei zeigten die AtPDX Proteine, mit Ausnahme von AtPDX1.2, eine direkte biosynthetische Aktivität und in der Untersuchung von *atpdx* Mutanten eine verminderte Produktion von Vitamin B6.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte als Fortführung zur bekannten Nullmutantenanalyse die Funktion der einzelnen AtPDX Proteine über einen *gain-of-function* Ansatz weiter untersucht werden. Hierfür sollten die *AtPDX* Gene unter der Kontrolle eines *P35S* Blumenkohl-Mosaik-Virus Promotors in *A. thaliana* überexprimiert werden, und die Auswirkungen anhand des Phänotyps, der Komposition der pflanzlichen Metabolite sowie des Vitamin B6 Gehaltes analysiert werden.

Anschließend sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit die AtPDX Proteine *in planta* miteinander interagieren und einen Synthasekomplex ausbilden können, wie er bereits für *P. falciparum*, *B. subtilis*, *G. stearothermophilus* und *S. cerevisiae* beschrieben wurde.

Im dritten Teil der Arbeit sollte die Vitamin B6 Biosynthese im Baum *G. biloba* anhand des GbPDX1 Proteins untersucht werden. Die Existenz von *G. biloba* wurde bereits schon in der Triasperiode nachgewiesen, weshalb der Baum oft als lebendes Fossil bezeichnet wird. Evolutionsgeschichtlich hat sich *G. biloba* relativ früh entwickelt und ist ein interessantes Untersuchungsobjekt um die Vitamin B6 Biosynthese in einem für Pflanzen evolutionär ursprünglichen Stadium zu analysieren. Der Baum ist ebenfalls attraktiv für die pharmazeutische Industrie, da er eine große Anzahl an wirkungsspezifischen Sekundärpflanzenstoffe bildet. Jedoch synthetisiert *G. biloba* das Antivitamin Ginkgotoxin, welches ein Vitamin B6 Derivat ist und in vielen Geweben des Baumes nachgewiesen werden konnte. Ein Verständnis der Zusammenhänge von der Vitamin B6 Biosynthese und der Bildung von Ginkgotoxin ist demnach wünschenswert. In einem Kooperationsprojekt wurde das *GbPDX1* Gen von der Gruppe Eckhard Leistner/Christel Drewke (Institut für Pharmazeutische Biologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, D) anhand von Sequenzhomologien identifiziert und kloniert. Nachfolgend wurde in der vorgelegten Arbeit

eine detaillierte Analyse der Expression, Interaktion sowie der Funktionalität des *GbPDX1* Gens angefertigt.

Wie schon erwähnt sind die *Arabidopsis* Proteine AtPDX1.1, AtPDX1.3 und AtPDX2 bereits durch diverse Arbeiten gut charakterisiert worden. Allerdings fehlen bisher Analysen der Funktion des AtPDX1.2 Proteins sowie eine Charakterisierung neuer Interaktoren, die auf bislang unbekannte Funktionen der AtPDX Proteine hinweisen könnten. In den beiden letzten Teilen dieser Arbeit wurde deshalb versucht sich, wie nachfolgend beschrieben, einer Charakterisierung des AtPDX1.2 Proteins sowie neuer Interaktoren anzunähern.

Für das AtPDX1.2 Protein ist bekannt, daß es nicht aktiv Vitamin B6 synthetisiert, jedoch stressabhängig exprimiert wird und mit den anderen AtPDX1 Proteinen interagieren kann. Die Zielsetzung dieser Untersuchung sollte hier die Erzeugung einer *loss-of-function* Mutante für AtPDX1.2 bzw. die Findung einer effektive T-DNA Insertionsmutante sein, deren Charakterisierung dann im Weiteren eine Bestimmung der biologischen Funktion für AtPDX1.2 ermöglichen könnte. Ebenfalls sollte durch organspezifische Lokalisationsstudien versucht werden, eine bestimmte Wirkungsstätte für das AtPDX1.2 Protein zu finden.

Für eine Analyse von neuen Interaktoren sollten die beiden bereits identifizierten Bindungspartner exprimiertes Protein (*At5g65840*) sowie die ACC-Synthase 10 (*AtACS10*, *At1g62960*) aus Y2H Screen Ansätzen mit dem AtPDX1.1 und dem AtPDX1.2 Protein auf ihre Bindungsfähigkeit zu den AtPDX Proteinen erneut untersucht und im Anschluß daran durch diverse Studien eine funktionelle Charakterisierung vorgenommen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die verwendeten Enzyme, Chemikalien sowie andere Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applichem (Darmstadt)	Millipore (Schwalbach)
Bio-Rad (München)	Merck (Darmstadt)
Bioline (Luckenwalde)	Peqlab (Erlangen)
Eppendorf (Hamburg)	Roth (Karlsruhe)
Fermentas (St. Leon-Rot)	Sarstedt (Nümbrecht)
GE Healthcare (München)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Greiner Bio-One (Frickenhausen)	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
Invitrogen (Karlsruhe)	
Radioaktives ³² P Isotop:	Hartmann Analytic (Braunschweig)

2.2 Verwendete Organismen

2.2.1 Verwendete Bakterien- und Hefe-Stämme

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Bakterien- und Hefe-Stämme

Organismus/Stamm	Genotyp	Firma/Referenz
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F- <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1</i>	(Hanahan 1983)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proABlacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R)]</i>	(Stratagene)
<i>E. coli</i> DH5α	F- Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-</i>	(Hanahan 1983; Grant et al. 1990)
<i>E. coli</i> DH10B	F- Φ80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 mcrA Δ(mrrhsdRMS-mcrBC) araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG</i>	(Grant et al. 1990)

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Bakterien- und Hefe-Stämme (2. Teil)

Organismus/Stamm	Genotyp	Firma/Referenz
<i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>pLysS</i>	<i>E. coli</i> B, F, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>gal</i> λ(DE3) [<i>pLysS</i> Cm ^R]	Stratagene, (Lopez et al. 1999)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101::pMP90	Gm ^R , Rif ^R ; pMP90 (pTiC58_T-DNA)	(Koncz und Schell 1986)
<i>A. tumefaciens</i> GV3101::pMP90RK	Gm ^R , Rif ^R , Km ^R ; pMP90RK (pTiC58_T-DNA)	(Hellens et al. 2000)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L40ccU3 (A-Stamm)	MATa, <i>his3-delta200</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112ade2LYS2::(lexAop)4-HIS3</i> , <i>URA::(lexAop)8-lacZ</i> , <i>GAL4</i> , <i>gal80</i>	(Goehler et al. 2004)

2.2.2 Verwendete Pflanzenspezies

Tabelle 2.2: Übersicht über die verschiedenen verwendeten Pflanzen aufgeführt nach Organismen, Ökotypen und Mutanten

Organismus	Ökotyp/Mutante	Identifikationscode/Referenz
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Wildtyp Col0	
	<i>atpdx1.1</i> , <i>pdx1.1-1</i>	N40665; JIC SM_3.22664 (Tissier et al. 1999; Titiz et al. 2006)
	<i>AtPDX1.2</i> T-DNA-Insertionslinie	GABI_468B06/-019015 (Rosso et al. 2003)
	<i>AtPDX1.2</i> T-DNA-Insertionslinie	N875564; SAIL_640_D11 (Sessions et al. 2002)
	<i>AtPDX1.2</i> T-DNA-Insertionslinie	N548199; SALK_148199.19.20.x (Alonso et al. 2003)
	<i>atpdx1.3</i> , <i>pdx1-1</i> , <i>pdx1.3</i>	N586418; SALK_086418 (Alonso et al. 2003; Chen und Xiong 2005; Titiz et al. 2006)
	<i>At5g65840</i> T-DNA-Insertionslinie	N518173; SALK_018173 (Alonso et al. 2003)
	Wildtyp Landsberg erecta	
	<i>AtPDX1.2</i> DS-Insertionslinie	N174646; JIC GT_5.712 (Sundaresan et al. 1995)
	Wildtyp C24	
<i>rsr4-1</i>	<i>AtPDX1.3</i> ^{G54S} Punktmutante (Wagner et al. 2006)	
<i>Nicotiana benthamiana</i>		
<i>Ginkgo biloba</i>		

2.3 Verwendete Vektoren

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten Vektoren

Vektor	Gatewaykompatibel bzw. klassische MCS	Referenz	Resistenz
<i>Klonierungsvektoren</i>			
<i>pDONR221</i>	GW	Invitrogen	Kan
<i>pCR2.1</i>	kl. MCS	Invitrogen	Kan/Carb
<i>E. coli Proteinexpressionsvektoren</i>			
<i>pDEST15</i>	GW	Invitrogen	Carb
<i>pET21b</i>	kl. MCS	Novagen	Carb
<i>Y2H Hefeexpressionsvektoren</i>			
<i>pACT2-GW</i>	GW	Clontech	Carb
<i>pBTM116 D9-GW</i>	GW	(Goehler et al. 2004)	Tet
<i>Binäre Pflanzenvektoren</i>			
<i>pCB302-1</i>	kl. MCS	(Xiang et al. 1999)	Kan
<i>pCB302-3</i>	kl. MCS	(Xiang et al. 1999)	Kan
<i>pGWB14</i>	GW	(Nakagawa 2002)	Kan/Hyg
<i>pGWB17</i>	GW	(Nakagawa 2002)	Kan/Hyg
<i>pGWB18</i>	GW	(Nakagawa 2002)	Kan/Hyg
<i>PPDX1.2pGWB18</i>	GW	modifiziert nach Nakagawa (2002)	Kan/Hyg
<i>PPDX1.3pGWB18</i>	GW	modifiziert nach Nakagawa (2002)	Kan/Hyg
<i>pK7WGF2</i>	GW	(Karimi et al. 2002)	Spec/Strep
<i>pK7FWG2</i>	GW	(Karimi et al. 2002)	Spec/Strep
<i>pK7FWG2 ohne P35S</i>	GW	modifiziert nach Karimi (2002)	Spec/Strep
<i>pE-SPYNE-GW</i>	GW	W. Dröge-Laser	Carb
<i>pE-SPYCE-GW</i>	GW	W. Dröge-Laser	Carb

2.4 Untersuchte Gene

Die untersuchten Gene werden in den Datenbanken „GenBank“, „DDBJ“, und „EMBL“ unter den nachfolgenden Akzessionsnummern geführt:

AtPDX1.1 (NM_129380), *AtPDX1.2* (NM_112475), *AtPDX1.3* (NM_112475), *AtPDX2* (NM_125447), *AtACS10* (NM_104974), *At5g65840* (NM_125981), *GbPDX1* (AAK18310)

2.5 Anzucht und Transformation der verwendeten Organismen

2.5.1 Anzucht von *E. coli* und *A. tumefaciens*

E. coli Bakterien und Agrobakterien wurden, wenn nicht speziell erwähnt, auf Fest- sowie Flüssig- LB-Medium (Tabelle 2.4) mit geeigneten Antibiotika (Tabelle 2.7) bei 37 °C bzw. 28 °C im Wärmeschrank oder im Schüttler kultiviert.

Tabelle 2.4: Wachstumsmedien für die Anzucht von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lubria Broth-Medium (LB-Medium)	25 % Difco™ LB Für die Verwendung als Festmedium wurde 1 % Agar hinzugegeben
Super Broth-Medium (SB-Medium)	32 g Trypton, 20 g Hefeextrakt 5 g NaCl 1,25 mL NaOH 4N
SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl Nach dem Autoklavieren zugegeben: 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose (separat autoklaviert)

2.5.2 Transformation elektrokompenter *A. tumefaciens* und *E. coli* Zellen

Die bei - 80 °C gelagerten elektrokompenten Zellen, hergestellt nach Sambrook und Russel (2001), wurden schnell auf Eis aufgetaut. Je 20 µL elektrokompenter *A. tumefaciens* bzw. *E. coli* Zellen wurden für eine Transformation genutzt und mit ca. 150 ng aufgereinigter Plasmid DNA vermengt. Der Ansatz inkubierte für 10-15 Minuten auf Eis und wurde mit 60 µL sterilem bi-destilliertem, kaltem Wasser komplettiert. Der Transformationsansatz wurde in vorgekühlte Küvetten (Peglab) überführt und mit einem Elektroschock von 2,5 kV (Bio-Rad *E. coli* Pulser) behandelt. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 500 µL kaltem SOC-Medium (Tabelle 2.4) versetzt und max. 1 ½ Stunden bei 28 °C (*A. tumefaciens*) bzw. 37 °C (*E. coli*) unter Schütteln angezogen. Der Transformationsansatz wurde zu 1/4 auf LB-Festmedium mit geeigneten Antibiotika ausplattiert.

2.5.3 Anzucht von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde auf YPD- oder selektiv für den Y2H Ansatz (siehe 2.8.2) auf SD-Fest und Flüssigmedium (Tabelle 2.5) mit geeigneten Aminosäuren (Tabelle 2.6) bei 30 °C im Wärmeschrank bzw. im Schüttler angezogen.

Tabelle 2.5: Wachstumsmedien für die Anzucht von *S. cerevisiae*

Bezeichnung (Referenz)	Zusammensetzung
YPD-Medium	1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Pepton Nach dem Autoklavieren zugegeben: 2 % (v/v) von einer separat autoklavierten 40 % (w/v) Glukose Lösung Für Festmedium wurde 1% Agar hinzu gegeben
SD-Medium	6,7 g Difco™ Yeast Nitrogene Base Amino Acids pro Liter Nach dem Autoklavieren zugegeben: 2 % (v/v) von einer separat autoklavierten 40 % (w/v) Glukose Lösung Für Festmedium wurde 2 % Agar hinzugegeben

2.5.4 Aminosäuren

Tabelle 2.6: Verwendete Aminosäuren und deren Konzentration im SD-Medium

Aminosäure	Konzentration der Stammlösungen (mg/mL)	Finale Konzentration im Medium (µg/mL)
Uracil	0,2	20
L-Tryptophan	1,0*	20
L-Histidin HCl	1,0*	20
L-Leucin	1,0*	100

Die Stammlösungen der Aminosäuren wurden in sterilem Wasser angesetzt, steril filtriert und dem autoklavierten SD-Medium kurz vor dem Gebrauch zugegeben (*Lagerung bei 4 °C).

2.5.5 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Methode von Gietz und Woods (2002). Hierfür wurde der Hefe A-Stamm bei 30 °C auf YPD-Festmedium über zwei Tage angezogen und damit eine 5 mL YPD-Flüssigkultur angeimpft. Nachdem die Vorkultur weitere 2 Tage unter Schütteln bei 30 °C dicht gewachsen war, wurde damit die 50 mL Hauptkultur angeimpft und auf eine optische Dichte von OD₆₀₀ 0,2 eingestellt. Die Hauptkultur inkubierte in einem Schikanekolben bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀

von 0,6-0,9. Nach Zentrifugation der Hauptkultur wurde das Zellpellet in 7 mL Mix 1 (0,1 M LiAc, 1,0 M Sorbitol, 5 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA) unter Schütteln resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, das erhaltene Zellpellet in 1 mL Mix 1 mit der Pipettenspitze resuspendiert und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde Lachsspermien Träger-DNA (10 mg/mL, Aldrich) in einem Heizblock bei 95 °C aufgeköcht und anschließend auf Eis gestellt. 1 µg der zu transformierenden Plasmid DNA wurde mit 15 µL Lachsspermien Träger-DNA, 700 µL Mix 2 (0,1 M LiAc, 40 % PEG, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) und 100 µL der aufbereiteten Hefezellen in einem 1,5 mL Mikrozentrifugengefäß vermischt. Dieser Ansatz inkubierte 30 Minuten bei 30 °C, wurde danach mit 30 µL DMSO versetzt und gut gevortext. Die Hefen wurden dann für 20 Minuten einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Der Transformationsansatz wurde drei Minuten bei 4000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in 200 µL sterilem destilliertem Wasser aufgenommen. Anschließend wurden die Hefezellen auf SD-Medium ausplattiert.

2.5.6 Antibiotika bzw. Herbizide

Tabelle 2.7: Verwendete Antibiotika bzw. Herbizide und deren Konzentration im Medium

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösungen (mg/mL)	Finale Konzentration im Medium (µg/mL)
Carbenicillin (Carb)	50	50
Chloramphenicol (Cm)	34 in EtOH abs.	34
Gentamycin (Gm)	25	25
Hygromycin (Hyg)	25	25
Kanamycin (Km)	50	50
Rifampicillin (Rif)	50 in DMSO	50
Spectinomycin (Spec)	30	30
Tetracyclin (Tet)	10 in EtOH abs.	10
Phosphinothricin (PPT)	10	10

Die Stammlösungen der Antibiotika bzw. Herbiziden wurden, wenn nicht anders bezeichnet, in sterilem Wasser angesetzt, steril filtriert und bei - 20 °C gelagert.

2.6 Molekularbiologische Methoden - DNA/RNA

2.6.1 *E. coli* Plasmid-DNA Minipräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte zum einen mit Hilfe des Invitac Plasmid Miniprep Kit und wurde nach Hersteller Angaben durchgeführt.

Zum anderen wurde Plasmid-DNA aus *E. coli* mit Hilfe eines Protokolls aufgereinigt, welches auf der Methode von Birnboim und Doly (1979) basiert. Hierfür wurde eine 2 mL *E. coli* Übernachtskultur bei 16000 rcf abzentrifugiert und das Zellpellet in 150 mL Lösung 1 (50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, 20 µg/mL RNase A) resuspendiert. Nach der Zugabe von 500 µL Lösung 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS v/v) und vorsichtiger Inversion wurde im Anschluss Lösung 3 (3 M KAc pH 5,2) hinzugegeben. Nach Invertieren und Inkubation für zehn Minuten auf Eis folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für fünf Minuten bei 16000 rcf. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Mikrozentrifugationsgefäß überführt und mit 0,8 Volumen Isopropanol vermischt. Der Ansatz wurde mind. 20 Minuten bei 16000 rcf abzentrifugiert und anschließend das Pellet mit 70 % Ethanol zweimal gewaschen. Nach abschließender Zentrifugation und Trocknung wurde das Pellet in 50 µL bidest. Wasser aufgenommen.

2.6.2 Aufreinigung von DNA aus Pflanzenmaterial

2.6.2.1 *Schnelle Aufreinigung von DNA (Weigel und Glazebrook 2001)*

Fisches Pflanzenmaterial wurde mit Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA, 0,5 % SDS v/v) versetzt, in der Schwingmühle zerkleinert und abzentrifugiert. Daraufhin wurde die DNA durch Isopropanol aus dem Überstand gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 95 % Ethanol wurde das Pellet in 1 x TE (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgenommen.

2.6.2.2 *Aufreinigung für saubere DNA (Fulton et al. 1995)*

Frisches Pflanzenmaterial wurde mit Aufreinigungspuffer, bestehend aus Extraktionspuffer (350 mM Sorbit; 100 mM Tris; 5 mM EDTA pH 8), Kernlysepuffer (200 mM Tris; 50 mM EDTA 2 M NaCl; 2 % CTAB), 5 %iger Sarcosyllösung (Verhältnis 2,5:2,5:1) und Natriumdisulfit (0,33 % w/v), in der Schwingmühle zerkleinert und eine Stunde bei 65 °C inkubiert. Im

Anschluß folgte eine Chlorophorm/Isoamylalkohol (24:1; v/v) Aufreinigung und eine Präzipitation der DNA mit Isopropanol. Das erhaltene DNA Pellet wurde zwei Mal mit 75 % Ethanol gewaschen und nach Trocknung in sterilem bidest. Wasser aufgenommen.

2.6.3 Aufreinigung von RNA aus Pflanzenmaterial

2.6.3.1 RNA Aufreinigung für semiquantitative RT-PCR

Für Expressionsanalysen mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die RNA aus *A. thaliana* Col0 Pflanzen aus verschiedenen Geweben extrahiert. Das Pflanzenmaterial wurde mit Wasser kurz abgespült, die Feuchtigkeit mit einem Papiertuch abgestreift, in flüssigem Stickstoff eingefroren und die RNA mit dem NucleoSpinRNA Plant Kit (Macherey-Nagel, D) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.6.3.2 RNA Aufreinigung für cDNA Synthese und quantitative Real Time PCR

Gesamt RNA aus *A. thaliana* Pflanzenmaterial (Wachstum im Kurztag) wurde nach der Methode von Brenner et al. (2005) extrahiert. Eine cDNA Synthese erfolgte von 5 µg Gesamt RNA durch Superscript™ III Reverse Transkriptase (Invitrogen) nach Herstellerangaben.

2.6.3.3 RNA Aufreinigung von *A. thaliana* Pflanzenmaterial für Northern Blot

0,5-2 g Pflanzenmaterial wurde im Mörser unter flüssigem Stickstoff zu Pulver zerrieben und in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegten 4 mL Phenol/Tris/HCl (1,0 M; pH 9,0) Gemisch (1:1; v/v) überführt. Die Suspension wurde mind. eine Minute gevortext, bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 1,5 mL 3 M Natriumacetat (pH 5,6) wurde die Lösung auf 15 mL mit 96 %igem Ethanol aufgefüllt, gemischt und für mind. eine Stunde bei - 20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes trocknete das Pellet bei Raumtemperatur und wurde dann in 600 µL sterilem bidest. Wasser aufgenommen. Anschließend präzipitierte die RNA erneut unter Zugabe von 200 µL 10 M LiCl bei 4 °C über Nacht. Nach erneuter Zentrifugation wurde das RNA Pellet zweimal in 70 %igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 40 µL sterilem bidest. Wasser aufgenommen.

2.6.3.4 RNA Aufreinigung von *G. biloba* Pflanzenmaterial für Northern Blot

Die Isolierung der RNA aus *G. biloba* Pflanzenmaterial erfolgte in Anlehnung an das Aufreinigungsprotokoll von (Wang et al. 2005). Hierzu wurden 5 g Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff im Mörser zu Pulver zerrieben, in Extraktionspuffer (2 % CTAB w/v, 100 mM Tris/HCl pH 7,4, 2 M NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 2 % Polyvinylpyrrolidone w/v, 4 % 2-Mercaptoethanol v/v) aufgenommen und zehn Minuten bei 65 °C inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend abgekühlt und mit Chlorophorm/Isoamylalkohol (24:1; v/v) versetzt. Nach Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen und eine Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1; v/v) Aufreinigung durchgeführt. Die wässrige Phase wurde erneut abgenommen und die RNA durch Mischen mit 1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2, 2 Volumen 95 % Ethanol mit folgender Inkubation in - 20 °C präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch vorsichtige Zentrifugation pelletiert und anschließend in 3 M Natriumacetat pH 5,6 aufgenommen, kurz geschwenkt und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 500 µL bidest. Wasser aufgenommen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und erneut mit einer Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1; v/v) aufgereinigt. Die wässrige Phase wurde mit 50 µL 3 M Natriumacetat pH 5,6 sowie 2 Volumen 95 % Ethanol versetzt und nach einer 1 stündigen Inkubation in - 70 °C abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 500 µL bidest. Wasser gelöst und mit 200 µL 10 M Lithiumchlorid vermischt. Das Gemisch inkubierte für mind. 30 Minuten bei 4 °C. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet zweimal in 70 %igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 30 µL bidest. Wasser aufgenommen.

2.6.4 Polymerase Ketten Reaktion

Die mittels Polymerase Ketten Reaktion (PCR) erfolgte Amplifikation von DNA Fragmenten wurde mit einem Standardmix (siehe Tabelle 2.8) sowie einem Cycler Standard Protokoll durchgeführt (Tabelle 2.9). Dieses Protokoll wurde je nach PCR Ansatz in der spezifische Primerannealingtemperatur und Elongationszeit variiert. Hierbei ist die *Taq* (Fermentas) Polymerase für Test PCR Ansätze verwendet und die *Pfu* (Stratagene) Polymerase, welche eine 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt und damit ein Korrekturlesen bewerkstelligt, zur fehlerfreien Vervielfältigung von DNA Fragmenten eingesetzt worden.

Tabelle 2.8: PCR Standardansätze für die *Taq* und *Pfu* Polymerase

<i>Taq</i> Standard PCR Ansatz			<i>Pfu</i> Standard PCR Ansatz		
10 x <i>Taq</i> Puffer	1 x	2 µL	10 x <i>Pfu</i> Puffer (Promega)	1 x	10 µL
MgCl ₂ 50 mM	2 mM	0,8 µL			
dNTP Mix, je 5 mM	0,15 mM	0,6 µL	dNTP Mix, je 5 mM	0,2 mM	4 µL
Oligonukleotide 5 µM	0,5 µM	2 µL	Oligonukleotide 5 µM	0,5 µM	10 µL
DNA Template	100 ng*	X	DNA Template	100 ng	X
<i>Taq</i> Polymerase (Fermentas, 1 U/µL)	0,5 Units	0,5 µL	<i>Pfu</i> Polymerase (Promega, 2-3 U/µL)	1,5 Units	0,5 µL
Steriles dest. H ₂ O		auf 20 µL	Steriles dest. H ₂ O		auf 100 µL

* Für PCR Reaktionen auf Flüssigkultur wurde 1 µL gewachsene Bakterienkultur verwendet

Tabelle 2.9: Cycler Standard Protokoll für PCR

Cycler Programm	Dauer des Schrittes	Temperatur	
Aufschmelzen des DNA Doppelstranges	3 Minuten	95 °C	
Aufschmelzen des DNA Doppelstranges	30 Sekunden	95 °C	15-25 Zyklen
Annealing der Oligonukleotide	45 Sekunden	55 °-65 °C	
Elongation durch die DNA-Polymerase	x Minuten	72 °C	
Finaler Elongationsschritt	8 Minuten	72 °C	

2.6.5 Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion

Die Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) wurde in dieser Arbeit für eine semiquantitative Analyse der Genexpression in *A. thaliana* genutzt. Die RT-PCR wurde mit einem One Step RT-PCR Kit (Qiagene) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Untersuchung der gewebespezifischen Expressionen wurde pro RT-PCR Ansatz 50 ng RNA eingesetzt.

2.6.6 Quantitative *Real Time* PCR

Für die quantitative Analyse der Genexpression in den *P35S:myc:AtPDX A. thaliana* Pflanzen wurde die quantitative *Real time* PCR (qRT-PCR) genutzt. Hierbei wurde die RNA nach dem Protokoll von Abschnitt 2.6.3.2 aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. In den 20 µL PCR-Reaktionsansatz wurde 0,2 µL der erhaltenen cDNA, 0,1 x SYBR Green I (Sigma Aldrich), 50 nM ROX (5-Carboxy-X-rhodamine, Sigma Aldrich), 2 mM MgCl (Sigma Aldrich), 0,01 U Immolase (Kat. Nr. 21047; Bioline) 400 µM dNTP-Mix (Fermentas) und genspezifische Primer in der finalen Konzentration von 300 nM eingesetzt. Für die Untersuchung des *AtPDX1* bzw. *AtPDX2* Gesamtexpressionslevel, die Expression von transgenem und endogenem *AtPDX*,

wurden die jeweiligen *AtPDX* spezifischen Primer qRTatPDXFW und qRTatPDXRW aus der Arbeit von Gonzales et al. (2007) verwendet (Anhang Tabelle 12.1). Um die Expression von endogenen *AtPDX1.3* mit der Expression von transgenen *myc:AtPDX1.3* in den beiden *P35S:myc:AtPDX1.3* Pflanzenlinien vergleichen zu können, wurden zwei verschiedene qRT-PCR Ansätze mit den Primerpaaren AtPDX1.33'UTRFW-AtPDX1.33'UTRRW (Anhang Tabelle 12.1) und qRTatPDX1.3RW-mycRW durchgeführt. Alle qRT-PCR Reaktionen wurden in technischen Triplikaten unter der Verwendung des qRT-PCR Protokolls (Tabelle 2.10), mit dem Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, D) durchgeführt. Von jeder transgenen Linie wurden zwei biologische Replikate parallel analysiert und die Expression anhand des Referenzgens *At3g25800*, die regulatorische Untereinheit 2A der Ser/Thr Protein Phosphatase (Czechowski et al. 2005) normalisiert. Die *AtPDX* Genexpression sowie Standardfehler (RQ^{\min} & RQ^{\max}) wurden mit der Applied Biosystems 7500 Software v2.0.3 ermittelt.

Tabelle 2.10: Cycler Standard Protokoll für qRT-PCR

Cycler Programm	Dauer des Schrittes	Temperatur	
Primäres Aufschmelzen des DNA Doppelstranges	10 Minuten	95 °C	
Aufschmelzen des Doppelstranges	5 Sekunden	95 °C	40 Zyklen
Annealing und Elongation	30 Sekunden	60 °C	

2.6.7 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Fragmenten in Agarosegelen erfolgte nach der Standardmethode von Sambrook und Russel (2001) in TBE Pufferbedingungen.

2.6.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und aus PCR-Ansätzen

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen wurde mit dem Nucleo Spin Kit (Machery & Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.9 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA

Für die Auftrennung der RNA wurde ein 1,2 %iges Agarosegel in 1 x MEN Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA pH 7,0)/20 % Formaldehyd verwendet. Für den Lauf wurde die RNA mit 1 Volumen Formamid, ½ Volumen Formaldehyd, ½ Volumen 1 x MEN und 0,2 µL Ethidiumbromidlösung versetzt, für 15 Minuten bei 55 °C denaturiert

und anschließend bis zur Auftragung auf Eis gelagert. Nach dem Auftragen der Proben wurde die RNA bei konstanter Amperzahl aufgetrennt.

2.6.10 Northern Blot

Der Transfer der RNA aus einem denaturierendem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Applichem) erfolgte in 10 x SSC Transferpuffer (1,5 M NaCl; 0,15 M Natriumcitrat pH 7,2 - mit Citrat eingestellt) über Saugkraft. Nach dem Transfer wurde zur Fixierung der RNA die Membran in noch feuchtem Zustand mit UV-Licht bestrahlt, was zur kovalenten Bindung zwischen Membran und RNA führte.

2.6.11 Herstellung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde und Hybridisierung

Die Herstellung von radioaktiv markierter DNA (Sonde) für die spezifische Detektion der zu untersuchenden mRNA von *GbPDX1*, *AtPDX1.1* und *AtPDX1.2*, erfolgte nach der Methode von Thomas (1980) mit 50 µCi α -[³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol) und einem Prime-It II Random Primer Labeling Kit (Stratagen) nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurde die DNA des gesamten *GbPDX1* Gens (930bp), eines *AtPDX1.1* Gen-Fragmentes (436 bp; Position cDNA Base 464-930) sowie eines *AtPDX1.2* Gen-Fragmentes (445 bp; Position cDNA Base 500-945) verwendet. Die radioaktiv markierte Sonde wurde mittels einer Sephadex G-50 Säule (GE-Healthcare) aufgereinigt. Für die Prä-Hybridisierung wurde die Membran für eine Stunde in Hybridisierungslösung (7 % SDS; 1 mM EDTA pH 8,0; 1 % BSA in 0,5 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,0) bei 65 °C geschwenkt. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit der bei 95 °C denaturierten Sonde und mit frischer Hybridisierungslösung bei 65 °C über Nacht. Nicht gebundene Sonden wurde mit je einem zwei-stündigen Waschschrift mit Waschlösung I (1 x SSC; 0,5 % SDS; 1 mM EDTA) und Waschlösung II (0,5 x SSC 0,5 % SDS 0,5 %, 1 mM EDTA) bei 65 °C entfernt. Die Detektion erfolgte mit einem Röntgenfilm bei - 80 °C.

2.6.12 Generierung der DNA Konstrukte

2.6.12.1 Klassische Klonierung

Bei der klassischen Klonierung wurden an die Gen- bzw. DNA-Fragmente spezielle Restriktionsschnittstellen mittels geeigneten Primern über PCR angefügt. Hiernach wurde das DNA-Fragment durch eine ungerichtete TA-Klonierung (Invitrogen) nach

Herstellerangaben in den Vektor *pCR2.1* vorkloniert und das Insert durch Kontrollsequenzierung mit Standard M13 Primern auf Richtigkeit überprüft. Aus diesem Vektor erfolgte dann der für die Klonierungsstrategie angepasste Restriktionsverdau und eine Ligation in den vorbereiteten Zielvektor (Tabelle 2.3, Anhang Abbildung 12.6) nach einem Standard Ligationsansatz (Tabelle 2.11) mit T4-DNA Ligase (Fermentas).

Tabelle 2.11: Standard Ligationsansatz

Ansatz	eingesetzte Menge
DNA-Fragment aus <i>pCR2.1</i>	300 ng
Geschnittener Zielvektor	200 ng
10 x T4 DNA Ligase Puffer (+ATP, Fermentas)	1,5 µL
T4 DNA Ligase (1 weiss U/µL, Fermentas)	1 µL
Steriles bidestilliertes Wasser	auf 15 µL aufgefüllt

2.6.12.2 Gatewayklonierung

An die zu klonierenden Gen- bzw. DNA-Fragmente wurden mittels zweistufiger PCR die *attachment-* oder Rekombinationsseiten (*attB-sites*) angefügt. Hierbei wurden spezielle Primer verwendet (Anhang Tabelle 12.1), die durch das Anhängen von Platzhalterbasen bzw. das Eliminieren des Stopcodons das Leseraster für eine N- bzw. C-terminale Fusionierung der Gene mit Epitopen (z.B. myc-Epitop) einstellen. Die so modifizierten DNA-Fragmente wurden im Anschluß über Gateway BP Klonierung in den Vektor *pDONR221* nach Herstellerangaben (Invitrogen) eingefügt. Der erhaltene Entry Klon wurde mit Standard M13 Primern auf Richtigkeit des inserierten DNA-Fragmentes hin überprüft und die Inserts im Anschluß daran in unterschiedliche Gateway-kompatible Zielvektoren (Tabelle 2.3, Anhang Abbildung 12.6) per LR Klonierung nach Herstellerangaben überführt.

2.6.12.3 Generierung der binären Expressionskonstrukte

1. *P35S:myc:AtPDX1, P35S:myc:AtPDX2, P35S:myc:At5g65840 und P35S:At5g65840:myc*

Die untersuchten *AtPDX* Gene sowie das *At5g65840* Gen standen aus vorangegangenen Arbeiten (Leuendorf 2006; Liese 2007) bereits im Gateway Vektor *pDONR221* für N- und C-terminale Fusionierungen zur Verfügung. Für die Überexpression von *AtPDX1*, *AtPDX2* und *At5g65840* in *A. thaliana* wurden die untersuchten Gene entsprechend dem Zielvektor über LR Gatewayklonierung in den binären Vektor *pGWB18* und im Fall von *At5g65840* auch in *pGWB17* kloniert (Abbildung 12.6). In beiden Vektoren stehen die Gene unter die Kontrolle

des 35S Blumenkohl Mosaik Virus Promotors (*P35S*), und sind translational mit einem myc-Epitop N-terminal (*pGWB18*) bzw. C-terminal (*pGWB17*) fusioniert.

II. *P35S:AtPDX1.3*

Für eine *AtPDX1.3* Überexpression ohne fusioniertem Epitop wurde das Gen in den binären Vektor *pGWB14* über Gatewayklonierung eingebracht. Hierbei wurde das *AtPDX1.3* Gen *full length*, d.h. mit geneigenem Stopcodon, eingebracht. In der Konsequenz wird das im *pGWB14* Vektor vorgesehene C-terminale HA-Epitop nicht translational mit dem *AtPDX1.3* Gen fusioniert (Tabelle 2.3, Anhang Abbildung 12.6).

III. *PPDX1.2:myc:AtPDX1.2* und *PPDX1.3:myc:AtPDX1.3*

Zur Untersuchung der genspezifischen Expression von *AtPDX1.2* und *AtPDX1.3* wurde der Vektor *pGWB18* folgend modifiziert: Der *P35S* Promotor wurde durch eine *XbaI/HindIII* Restriktion ausgeschnitten und gegen den *AtPDX1.2* (*PPDX1.2*, 1,8 kb) bzw. den *AtPDX1.3* Promotor (*PPDX1.3*, 1,1 kb) ausgetauscht (Tabelle 2.3, Anhang Abbildung 12.6). Hierfür sind die Promotorfragmente mit den Primern *PPDX1.2FW* und *PPDX1.2RW* (Anhang Tabelle 12.1) bzw. *PPDX1.3FW* und *PPDX1.3RW* (Anhang Tabelle 12.1) amplifiziert worden. Im Weiteren wurden die für N-terminale Fusionen vorbereiteten *AtPDX1.2* und *AtPDX1.3* Gene in die Vektoren *PPDX1.2pGWB18* und *PPDX1.3pGWB18* per Gatewaytechnik eingefügt.

IV. *PPDX1.2:AtPDX1.2pK7FWG2*

Für eine Untersuchung der organspezifischen subzellulären Lokalisation des *AtPDX1.2* Proteins wurde der Vektor *pK7FWG2* modifiziert (Tabelle 2.3, Anhang Abbildung 12.6). Der *P35S* Promotor wurde durch eine *HindIII/PstI* Restriktion ausgeschnitten und der Vektor nach Auffüllen bzw. Verdau der Basenüberhänge der Schnittstellen wieder religiert. Im Anschluß daran wurde ein *AtPDX1.2* Promotor:Gen Fragment (verwendete Primer *PPDX1.2FW* und *AtPDX1.2nSRW* sowie *attB1PPDX1,2FW* und *attB2AtPDX1,2nSRW* (Anhang Tabelle 12.1); Größe des amplifizierten Fragmentes war 2,8 kb) durch Gatewayklonierung in den promotorfreien *pK7FWG2* Vektor eingebracht.

V. *P35S:At5g65840:GFP*

Für die subzelluläre Lokalisation von *At5g65840* wurde ein *At5g65840:GFP* Fusionsprotein im binären Vektor *pK7FWG2* (Tabelle 2.3, Anhang Abbildung 12.6) generiert.

VI. P35S:GbPDX1

Das *G. biloba* GbPDX1 Expressionskonstrukt wurde im binären Vektor *pCB302-1* durch Klonierung von *GbPDX1* in *SmaI/BamHI* Schnittstellen der *pCB302-1* MCSII (Tabelle 2.3, Anhang Abbildung 12.6) generiert.

Alle binären Konstrukte wurden über Agrobakterien vermittelte Transformation in *A. thaliana* Pflanzen stabil eingebracht.

2.7 Molekularbiologische Methoden – Protein

2.7.1 Proteinaufreinigung aus Pflanzenmaterial

Für die Extraktion von Gesamtprotein aus *A. thaliana* bzw. *N. benthamiana* Blattgewebe wurde das Pflanzenmaterial in gekühlten Mörsern bzw. in einer Schwingmühle zusammen mit 4 °C kalten Aufschlusspuffer (100 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM MG132; 1 mM PMSF) zerkleinert und nachfolgend für mindestens 20 Minuten auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde im Anschluß abzentrifugiert, der Überstand in ein frisches Mikrozentrifugationsgefäß überführt und die enthaltene Proteinmenge nach Bradford bestimmt.

2.7.2 Heterologe Genexpression in *E. coli* und Aufreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen

In dieser Arbeit ist durch die Verwendung von GST-Fusionsproteinen bzw. His-Fusionsproteinen eine Möglichkeit geschaffen worden mit einer großen Menge an aufgereinigtem Protein zu arbeiten. Dafür wurden die bearbeiteten Gene über die Gateway Klonierungstechnik in den Vektor *pDEST15* (N-terminal GST) sowie über klassische Klonierung über *NdeI/XhoI* Schnittstellen in den Vektor *pET21b* (C-terminal 6xHis) eingebracht und in den *E. coli* Stamm BL21 (DE) pLysS transformiert. Resultierend können GST- und HIS-Fusionsproteine unter der Kontrolle des Lac-Operons, IPTG induzierbar, in *E. coli* überexprimiert und im Anschluß über reduzierte Glutathionagarose bzw. Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt werden. Bei der Größe des GST Epitopes von ca. 26 kDa sind Proteine der ungefähren Größe GST:AtPDX1.1/GST:AtPDX1.2/GST:AtPDX1.3 von 60 kDa, GST:AtPDX2 von 54,5 kDa, GST:At5g65840 von 55,5 kDa, zu erwarten. Bei der

Fusion mit einem 6-fach HIS Epitop vergrößern sich die zu fusionierten Proteine um ca. 1,5 kDa. Dies liegt daran, daß aufgrund der gewählten Klonierungsstrategie zusätzlich zu den angehängten 6 HIS Aminosäuren ein weiterer Spacerbereich mit angehängt wurde. Es sind hier Proteine der Größe AtPDX1.1:HIS/AtPDX1.3:HIS von 35 kDa und AtPDX1.2:HIS von 36 kDa zu erwarten.

2.7.2.1 Heterologe Genexpression in E. coli für GST-Fusionsproteine

Mit den *pDEST15* Konstrukten transformierte BL21 Zellen wurden in einer 5 mL Übernachtkultur (LB-Flüssigmedium, 2 % Glukose, Chloramphenicol, Carbenicillin) bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Mit dieser Übernachtkultur wurde eine größere Hauptkultur 20-50 mL 1:20 angeimpft. Die Bakterienkulturen wurden im Kolben auf dem Schüttler zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 kultiviert und mit 1 mM final IPTG induziert. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation wurden die Bakterienkulturen bei 4 °C und zehn Minuten 4000 rcf abzentrifugiert.

2.7.2.2 Heterologe Genexpression in E. coli für HIS-Fusionsproteinen

Die *AtPDX1:pET21b* tragenden Bakterien wurden in einer 10 mL Übernachtkultur (LB-Flüssigmedium, 2 % Glukose, Chloramphenicol, Carbenicillin) angezogen. Mit der Übernachtkultur wurde eine 100 mL Hauptkultur in SB-Medium (mit Chloramphenicol, Carbenicillin, 0,5 % Glycerin und 2 % Glucose; Tabelle 2.4) 1:20 angeimpft und im Schikanekolben bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 unter Schütteln angezogen. Hierauf erfolgte eine Induktion der Proteinexpression mit final 1 mM IPTG. Im Anschluß wurde die Kultur weitere 3-4 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden bei 4 °C und 4000 rcf abzentrifugiert.

2.7.2.3 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Das Zellpellet wurde in 1 mL GST-Lysepuffer (50 mM Tris pH 8, 250 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,2 % v/v, TritonX-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) resuspendiert und der Zellaufschluß erfolgte durch Sonifizierung. Das erhaltene Lysat inkubierte anschließend mind. 20 Minuten auf Eis und wurde zehn Minuten bei 16000 rcf abzentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit 50 µL Glutathionagarose in ein 1,5 mL Mikrozentrifugationsgefäß überführt und für eine

Stunde unter Schwenken inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch bei 4000 rcf abzentrifugiert, das Glutathionagarosepellet dreimal mit 1 mL Lysepuffer gewaschen und final 1:1 in Lysepuffer aufgenommen.

2.7.2.4 Aufreinigung von HIS-Fusionsproteinen

Das Aufschließen der Zellen erfolgte durch Sonifizierung in 5 mL HIS-Bindepuffer (0,5 M NaCl; 0,02 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4; 0,03 mM Immidazol). Das Zelllysate wurde mit einer Spatelspitze DNase versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde bei 16000 rcf abzentrifugiert und in ein frisches Sammelgefäß überführt. Die Aufreinigung von 50 mL Hauptkultur ergab ca. 10 mL aufgereinigtes Probevolumen aus welchem die HIS-Fusionsproteine mit Nickelaffinitätssäule *HisTrap™* HP (GE Healthcare) mittels Äkta purifier *fast protein liquid chromatography* (FPLC) im Anschluß herausgereinigt wurden. Das Aufreinigungsprogramm wurde mit einer stufenweise ansteigender Immidazol Konzentration durchgeführt und ist nachfolgend aufgeführt.

10 mL Proteinprobe wurden in die Probeschleife gegeben und auf die 1 mL *HisTrap™* HP Säule injiziert. Im direkten Anschluß wurde die Probeschleife mit 30 mL Bindepuffer gespült und es erfolgte ein 10 mL Waschschrift (A1) mit 85 % Bindepuffer/ 15 % Elutionspuffer (0,5 M NaCl; 0,02 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4; 0,5 mM Immidazol). Die spezifische Elution der HIS-Fusionsproteine erfolgte dann mit 50 % Bindepuffer/ 50 % Elutionspuffer in den 2 mL Elutionsfraktionen A2-A4. Die Durchführung der Aufreinigung wurde so designed, daß jedem neuen Schritt ein Vorwaschschrift der Pumpen und des Systems voraus ging. Ein Vorwaschschrift hat den Vorteil, daß die Säule unmittelbar mit den neuen Pufferbedingungen, hier z.B. veränderten Elutionspufferkonzentrationen, ausgesetzt wird und dadurch eine verzögerte bzw. verlängerte Elution der Proteine unterbunden werden kann. Das HIS-Fusionsprotein eluiert konzentrierter und kann so in wenigen Elutionsfraktionen gesammelt werden. Für die Kontrolle der Aufreinigung erfolgte eine Auftrennung der gesammelten Fraktionen auf einem SDS-Gel. Exemplarisch für die AtPDX:HIS Proteine ist in Abbildung 2.1 die Aufreinigung von AtPDX1.2:HIS mittels Nickelaffinitätssäule (Abbildung 2.1 A) abgebildet. Zusätzlich zeigt das abgebildete SDS-Gel (Abbildung 2.1 B) die verschiedenen Schritte der AtPDX1.2:HIS Proteinaufreinigung.

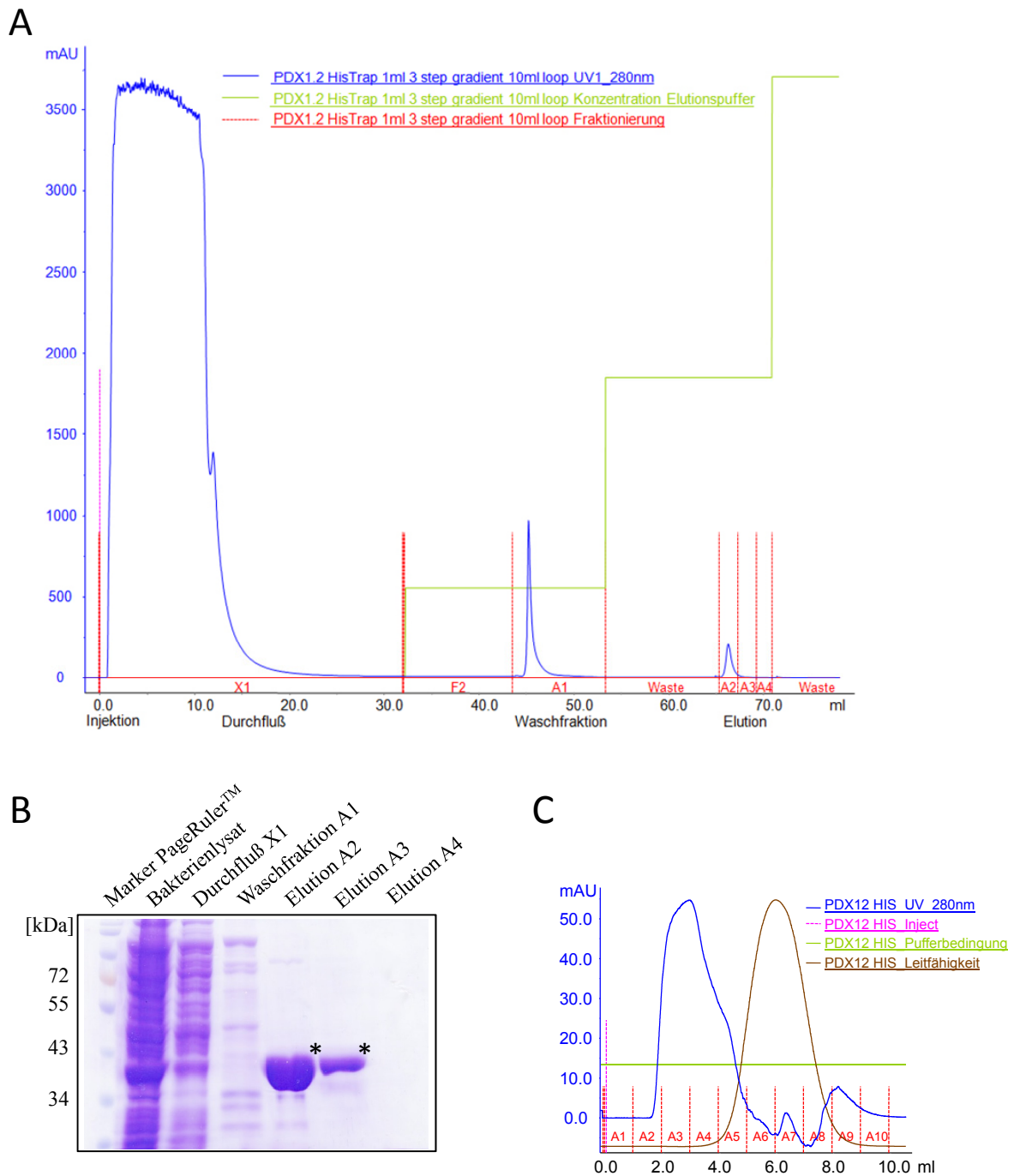


Abbildung 2.1: Aufreinigung von HIS-Fusionsprotein; Beispielhaft anhand von AtPDX1.2:HIS gezeigt. Aufreinigung mittels *fast protein liquid chromatography* über eine Nickelaffinitätsäule *HisTrap*[™] HP (GE Healthcare). **(A)** Chromatogramm der Aufreinigung mit stufenweise ansteigendem Elutionspuffer-Gradienten (grüne Linie) (Details siehe Beschreibung Methodik). Elution (A2-A4) der HIS:Fusionsproteine erfolgte mit 0,25 mM Imidazol. **(B)** 10 %iges SDS-Kontrollgel der HIS Aufreinigung, Coomassie gefärbt. **(C)** Entsalzung der Elutionsfraktionen A2/A3 über HiTrap Sephadex G25 Entsalzungssäule (GE Healthcare). In den beiden Chromatogrammen **(A)** und **(C)** gezeigte blaue Linie repräsentiert die über UV 280 nm detektierte Absorbance der Proteine in der relativen Größe mAU am Ausgang der Aufreinigungssäule. Sterne in **(B)** markieren die AtPDX1.2:HIS Proteinbande.

Nach der Kontrolle der Aufreinigung wurden die AtPDX:HIS Proteine aus der Elution A2 und A3 (Abbildung 2.1 B) vereinigt und 2 mL Proteinlösung über eine 5 mL HiTrap Sephadex G25 Säule (GE Healthcare) mit der *Äkta purifier* FPLC entsalzt (Abbildung 2.1 C). Dieser Vorgang wurde notwendig, da eine zu hohe Salzkonzentration die weitere Verwendung der Proteine im Blue Native Page (siehe 2.7.9) nicht zuläßt. Die Entsalzung erfolgte gegen Protein Aufschlußpuffer (100 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl). Aufgereinigte AtPDX:HIS Proteine wurden aus den Fraktionen A3 und A4 gesammelt (Abbildung 2.1 C) und für die Analyse im Blue Native Page weiter verwendet.

2.7.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Bradford-Reagenz. Für die Proteinmessung wurden die Proben mit einer 1:4 verdünnten Bradfordlösung (Bio-Rad) versetzt. Die Verdünnung der Proben lag dabei bei 1:1000 – 1:500. Anschließend wurden die Proben gevortext, jeweils zehn Minuten ruhen gelassen und danach photometrisch bei 595 nm gemessen. Als Referenz wurde eine Eichreihe mit 0 bis 2 mg/mL BSA verwendet.

2.7.4 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Die betrachteten Proteine wurden durch eine denaturierende SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese in ihrer Größe analysiert. Hierfür wurde SDS-Polyacrylamidgel (SDS-Gel) mit einem Sammel- und Trenngel von einer Acrylamid Konzentration von 4 % bzw. von 8-15 % verwendet. Ein Grundansatz für die Herstellung der Gele ist in Tabelle 2.12 gezeigt. Die SDS-Gele wurden mit dem Hoefer-Mighty-Small-II-System angefertigt. Die auspolymerisierten SDS-Gele wurden im Anschluß direkt verwendet oder bei 4 °C gelagert. Für den Lauf wurden die Proteinproben in Lämmli-puffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 2 % SDS w/v; 0,1 % Orange G w/v; 40 % Glycerin v/v, 5 % β -Mercaptoethanol v/v) aufgenommen und für mindestens zehn Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Nach kurzem Abkühlen wurden die Proben auf das SDS-Gel aufgetragen und mit SDS-Laufpuffer (1,5 % Glycin w/v, 0,3 % TRIS (v/v), 0,1 % SDS v/v) bei konstanter Stromstärke (20 mA pro Gel) für ca. 1,5 Stunden laufen gelassen. Die SDS-Gele wurden im Anschluß direkt mit Coomassie gefärbt oder für einen Westen Blot verwendet.

Tabelle 2.12: Ansätze für die Fertigung von SDS-Polyacrylamidgelen

50 mL Trenngel (ca. 5 Gele)	10 % Acrylamid	50 mL Sammelgel (ca. 5 Gele)	4 % Acrylamid
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	12,5 mL	1 M Tris/HCl, pH 6,8	1,875 mL
40 % Acryl-Bisacrylamid	12,5 mL	40 % Acryl-Bisacrylamid	2 mL
H ₂ O	24,5 mL	H ₂ O	16 mL
20 % SDS	250 µL	20 % SDS	75 µL
10 % APS	250 µL	10 % APS	75 µL
TEMED	25 µL	TEMED	12 µL

2.7.5 Coomassiefärbung von Proteingelen

Durch Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau können Proteine in Proteingelen sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden SDS-Gele zehn Minuten in Coomassie-Färbelösung (0,1 % Coomassieblau G-250 w/v, 50 % Methanol v/v, 10 % Eisessig v/v) geschwenkt und anschließend mehrere Stunden mit Entfärberlösung (5 % Methanol v/v, 9 % Eisessig v/v) gewaschen. Bei Bedarf wurde die Entfärberlösung ausgetauscht.

2.7.6 Western Blot

Für den Western Blot wurde das zu analysierende SDS-Gel in kaltem Blotpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris) mit einer passenden Immobilon -P Transfer Membran (PVDF Porengröße 0,45 µm; Millipore) in Laufrichtung belegt und mit Whatmanpapier von beiden Seiten abgedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgte mit dem *Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell System* von Bio-Rad bei konstanter Stromstärke (40 mA) und variierender Spannung über Nacht bei 4 °C.

2.7.7 Immunodetektion

Die Detektion von bestimmten Proteinen wurde nach einem Western Blot auf einer PVDF Membran mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Hierzu wurde die Membran für eine Stunde in mit 6 % fettfreier Trockenmilch in T-PBS-Puffer (137 mM NaCl; 27 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 17 mM KH₂PO₄; nach Kontrolle des pH-Wertes von 7,4 erfolgte die Zugabe von 0,1 % Tween-20 v/v) unter leichtem Schwenken eine Stunde geblockt. Nach Abschütten der Trockenmilchlösung wurde der spezifische primäre Antikörper (Tabelle 2.13) 1:1000 verdünnt, in 4 mL T-PBS Puffer aufgenommen und direkt auf die Membran gegeben. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation wurde der primäre Antikörper abgeschüttet und die

Membran zwei Mal fünf Minuten in T-PBS Puffer gewaschen. Der sekundäre HR-Peroxidase gekoppelte Antikörper (Tabelle 2.13) wurde 1:2000 in 4 mL T-PBS-Puffer aufgenommen, auf die Membran gegeben und ebenfalls zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgegossen und die Membran vier Mal in T-PBS Puffer zehn Minuten gewaschen. Hierauf folgte der Nachweis des sekundären HR-Peroxidase gekoppelten Antikörpers durch Chemolumineszenz. Dazu wurde auf die Membran in feuchtem Zustand mit den *ECL Western Blotting Detection System* Lösungen nach Herstellerangaben behandelt und nach Inkubation ein Film (Kodak X-Omat) für einen, je nach Intensität der Chemolumineszenz, variablen Zeitraum aufgelegt. Im Anschluss wurde der Film entwickelt und fixiert.

Tabelle 2.13: Verwendete Antikörper

Typ Antikörper	Wirtsorganismus	Referenz (Firma)
α -GFP	Kaninchen	Kat. # sc 8334; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGIE Y.INC
α -myc	Maus	Kat. # 05-724, Millipore
α -HA	Maus	Kat. # MMS 101P, HISS Diagnostics
α -Kaninchen IgG-HRP	Rind	Kat. # sc 2370; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGIE Y.INC
α -Maus IgG-HRP	Ziege	Kat. # sc 2005; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGIE Y.INC

2.7.8 Ponceaufärbung von PVDF Proteinmembranen

Für eine Kontrolle der Proteinbeladung auf einer PVDF Membran wurde eine Ponceau Färbung der Membran durchgeführt. Die PVDF Membran wurde hierfür in Ponceau Färbelösung (2 g Ponceau S; 1,83 M Trichloressigsäure; 1,37 M Sulfosalicylsäure) mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt und mit dest. Wasser abgespült bis ausschließlich die Proteinbanden zu sehen waren.

2.7.9 Blue Native Page

Die Methode der Blue Native Page (BNP) wurde zur nativen Auftrennung von Proteinen im Gel genutzt. Hierbei bleiben Proteinkomplexe intakt und können in ihrer nativen Größe studiert werden. Das denaturierende Natriumdodezylsulfat (SDS), welches in SDS-Gelen verwendet wird, um die Proteine negativ zu laden und so eine ladungsgerichtete, gröÙenselektive Auftrennung zur Anode zuzulassen, ist bei der Methode der BNP durch Coomassie (Serva Blue G250) ersetzt. Dieser negativ geladene Farbstoff ermöglicht ebenfalls einen ladungsgerichteten Lauf der Proteine, jedoch ohne diese zu denaturieren.

Die Durchführung der BNP erfolgte in Anlehnung an Wittig et al. (2006). Das Gradienten-Trenngel ist mit dem in Tabelle 2.14 gezeigten Standardprotokoll unter zu Hilfenahme eines Gradientenmischers angefertigt worden. Über dem Gradienten-Trenngel wurde ein niederprozentiges Vorlaufgel in gleichen Pufferbedingungen gegossen.

Tabelle 2.14: Übersicht Standardprotokoll zur Anfertigung von einem Gradienten-Trenngel für BNP

Gelgröße 20 x 20 cm 1 mm dünner Spacer	Trenngel 18 mL 5 % Acrylamid	Trenngel 18 mL 12 % Acrylamid	Vorlaufgel 15 mL 4 % Acrylamid
3 x Gelpuffer	6 mL	6 mL	5,1 mL
40 % Acylamid/Bisacrylamid	2,25 mL	5,4 mL	1,5 mL
75 % Glycerin	1,2 mL	4,2 mL	/
bidest. Wasser	8,55 mL	2,4 mL	8,4 mL
10 % APS	30 µL	30 µL	100 µL
TEMED	8 µL	8 µL	40 µL

3 x Gelpuffer: 150 mM BisTris-HCl, 1.5 M 6-Amino-caproic Acid, pH 7.0 (HCl), Lagerung 4 °C

Die Proteinproben wurden für den Lauf mit 10 x BN-Probenpuffer (58,5 mM Serva G 250; 100 mM BisTris-HCl, 0,5 M 6-amino-caproic acid, pH 7,0; 30 % Sucrose w/v) versetzt und in die Probenaschen eingefüllt. Für den Lauf des BN Page Gels wurden die hier beschriebenen Kathodenpuffer (50 mM Tricine, 15 mM BisTris, 0,05 % Serva G 250 w/v) und Anodenpuffer (50 mM BisTris-HCl; pH 7,0) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung (110 V) ca. 24 Stunden im auf 4 °C gekühlten Gel.

2.8 Interaktionsstudien und Komplexanalyse

2.8.1 Pulldown (Affinitätsaufreinigung)

Eine Methode zur Charakterisierung von Proteininteraktionen ist der Nachweis über *in vitro* Pulldown einer Affinitätsaufreinigung. Hierfür wurden GST-Fusionsproteine wie in Abschnitt 2.7.2 beschreiben aufgereinigt und zusammen mit aus Pflanzen isoliertem Gesamtprotein (siehe 2.7.1) von *myc:AtPDX* exprimierenden Pflanzen mind. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im direkten Anschluß erfolgte eine Aufreinigung der GST-Fusionsproteine durch fünf Waschschrte in Pulldownpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl; 1 mM PMSF; 0,2-0,6 % Igepal v/v) und eine Analyse mittels SDS-Gel; Western Blot und Immunodetektion gegen mögliches Copräzipitiertes *myc:AtPDX1.1* Protein mittels α -*myc* Antikörper.

2.8.2 Yeast Two-Hybrid Assay

Der Yeast two-hybrid (Y2H) Assay wurde für eine Untersuchung von möglichen Protein-Protein Interaktionen verwendet. Y2H basiert auf der Koexpression von zwei möglichen Interaktoren in den Vektoren *pBTM116-GW* (basiert auf Goehler et al. 2004) und *pACT2-GW* (basiert auf Clontech) in *S. cerevisiae*, welche zu Fusionsproteinen mit einem *E. coli lexA* Repressorprotein bzw. mit einer Hefe GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) führen. Kommen die beiden Fusionsproteine in räumliche Nähe, so werden Reportergene für Histidin- bzw. Uracilaminosäuresynthese abgelesen. Unter Selektionsbedingungen auf *synthetic dextrose IV* (SDIV) Medium (SD-Medium ohne Histidin, Uracil, Tryptophan und Leucin) kann nun die Interaktion der beiden untersuchten Proteine durch Wachstum nachgewiesen werden (Weber et al. 2005). Die Anzucht der transformierten Hefen auf SDII Medium (SD-Medium mit Histidin und Uracil aber ohne Tryptophan und Leucin) dient als Transformationskontrolle. Alle untersuchten Gene wurden über Gatewayklonierung in die beiden Y2H Vektoren *pBTM116-GW* sowie *pACT2-GW* eingebracht und in *S. cerevisiae* transformiert. Die Interaktionen der getesteten Proteine wurden zusätzlich durch einen Test auf Autoaktivität mit einem leeren Vektor abgesichert.

2.8.3 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation, Split-YFP Analyse.

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) bzw. auch Split-YFP System genannt (Walter et al. 2004) stellt eine *in planta* Interaktionsanalyse dar. In diesem System werden zu untersuchende Proteine mit einer C- bzw. N-terminalen Hälfte des *yellow fluorescent proteins* (YFP) fusioniert. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Konstrukte in Tabakblättern transient exprimiert. Interagieren die beiden Fusionsproteine miteinander, kommen die beiden YFP Hälften in räumliche Nähe und bilden gegebenenfalls ein funktionales YFP aus, was bei entsprechender Anregung fluoresziert.

Die *AtPDX* Gene sowie das *AtBPM4* Gen wurden in die binären BiFC Vektoren *pE-SPYNE-GW* (*P35S:myc:N-terminal YFP^N* (AS 1-155)) und *pE-SPYCE-GW* (*P35S:HA:N-terminal YFP^C*, (AS 156-239)) (Dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt von W. Dröge-Laser; Sequenz Informationen unter www.ubpb.gwdg.de/wdllab/attorfex.html) über LR Gatewayklonierung eingebracht und in den *A. tumefaciens* Stamm GV3101::pMP90RK transformiert. Es folgte eine Agrobakterien vermittelte transiente Transformation von *N. benthamiana* Blättern nach

Sparkes et al. (2006). Die Fluoreszenz wurde 60 Stunden nach Infiltration mit einem Laser Scanning Mikroskop Leica TCS SP5 abgenommen. Einstellungen des Mikroskops für eine Detektion von spezifische YFP Fluoreszenz waren: Anregung bei 514 nm und Fluoreszenzabnahme bei 525-600 nm. Als Kontrolle für die Proteinexpression wurden von den infiltrierten Blättern Proben genommen und das Gesamtprotein wie bei Methode 2.7.1 beschrieben aufgereinigt. Die Proteinproben wurden anschließend über SDS-Gel aufgetrennt und über Western Blot sowie Immunodetektion mit α -myc und α -HA Antikörpern analysiert.

2.8.4 Größenausschlußchromatographie; FPLC Analyse

Die *in planta* Analyse von größeren Proteinkomplexen wurde mittels einer Größenausschlußchromatographie durchgeführt. Gesamtprotein wurde aus Blattmaterial der verschiedenen *myc:AtPDX* exprimierenden Linien unter nativen Bedingungen, wie bei 2.7.1 beschrieben aufgereinigt. Davon wurden 6-8 mg Gesamtprotein in 2 mL Tris/SalzPuffer (100 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl) als Probe für die Größenausschlußchromatographie verwendet. Die Auftrennung der Probe erfolgte auf einer kalibrierten HiLoad™ 16/60 Superdex 200 Säule (GE Healthcare) bei einer Flußrate von 1 mL pro Minute. Das System wurde durch ÄKTA *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) (Amersham Pharmacia Biotech; Schweden) gesteuert, und es erfolgte eine 1 mL Fraktionierung des Durchflusses von 40 mL bis 85 mL Durchflußvolumen. 20 μ L jeder Fraktion wurde im Anschluß über ein denaturierende 12 %ige SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot sowie nachfolgender Immunodetektion mit α -myc Antikörper gegen *myc:AtPDX* Protein analysiert.

Tabelle 2.15: Standardisierung der HiLoad™ 16/60 Superdex 200 Säule mit Standard Proteinen. Anhand der jeweiligen Chromatogramme wurde für jedes Protein das Retentionsvolumen ermittelt. Aufgeführt ist neben den Retentionsvolumina auch das Verhältnis von Retentionsvolumen (V_e) zu Nullvolumen (V_0), welches für die Eichgerade verwendet worden ist (Abbildung 2.2).

Standardproteine	kDa	Retentionsvolumen (mL)	V_e/V_0
Lysozym	14,7	106,6	2,961
Ovalbumin	43	80,1	2,225
BSA	67	74,3	2,063
Catalase Dimer	120	64,4	1,788
BSA Dimer	132	64,3	1,756
Ferritin	440	55,3	1,536
Thyroglobulin	670	48,7	1,352
Ferritin Dimer	880	43,9	1,219

Die Kalibrierung der verwendeten HiLoadTM 16/60 Superdex 200 Säule erfolgte mit Standard Proteinen bekannter Größe. Hierbei wurde das Retentionsvolumen (V_e) der Proteinen Lysozym, Ovalbumin, BSA, Catalase, Ferritin und Thyroglobulin bestimmt (Tabelle 2.15) und in Relation zum Nullvolumen (V_0) der Säule (36 mL) gegen die Proteingröße in kDa logarithmisch aufgetragen (Abbildung 2.2). Daraus ergibt sich die in Abbildung 2.2 dargestellte Funktion mit der man Proteinkomplexe unbekannter Größe anhand des experimentell ermittelten V_e bestimmen kann.

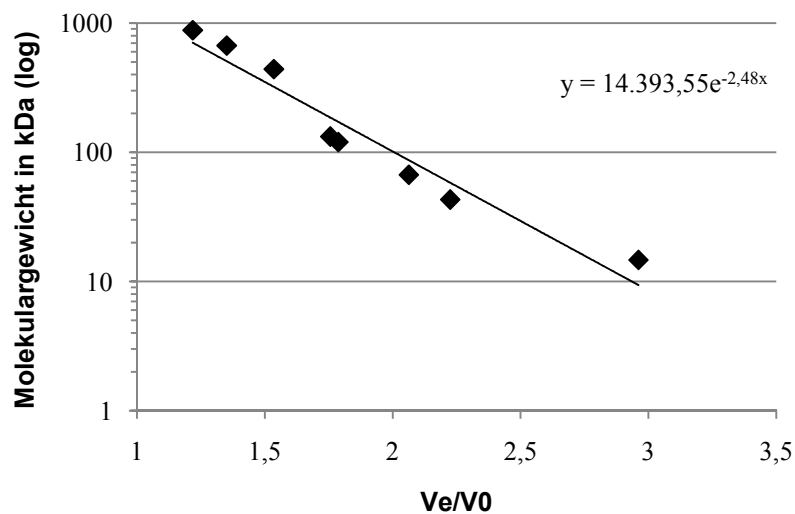


Abbildung 2.2: Standardisierung der HiLoadTM 16/60 Superdex 200 Säule für die Größenausschlußchromatographie per FPLC. Aufgetragen ist das Verhältnis von Retentionsvolumen der Standardproteine (V_e) zu Nullvolumen der verwendeten Säule (V_0), V_e/V_0 , gegen die bekannte molekulare Größe der Standardproteine in kDa (Tabelle 2.15). Funktion der Trendgerade ist neben dem Graphen gezeigt.

2.9 Untersuchung pflanzlicher Parameter

2.9.1 Pflanzenanzucht und Pflanzentransformation

Die Anzucht von *A. thaliana* Ökotypen Col0 und C24 sowie *Nicotiana benthamiana* erfolgte unter Standardbedingungen im Gewächshaus (Langtagbedingungen; 16 h Licht zu 8 h Dunkelheit, Lichtintensität ca. 150 - 300 μE), in der Klimakammer (Kurztagbedingungen; 8 h Licht zu 16 h Dunkelheit, Lichtintensität ca. 150 μE) und *in vitro* im Lichtregal (Langtagbedingungen; 16 h Licht zu 8 h Dunkelheit, Lichtintensität ca. 150 μE).

Für die sterile Kultivierung von *A. thaliana* Pflanzen wurden die Samen mit Sterilisationslösung (1,2 % Natriumhypochloridlösung mit 0,1 % (v/v) Triton) an der

Oberfläche sterilisiert, bei 4 °C mind. 24 h stratifiziert, anschließend auf MS (Murashige und Skoog 1962) bzw. ATS (Estelle und Sommerville 1987) Festmedium ohne Zusatz von Vitaminen und Zucker (Tabelle 2.16) ausgelegt und *in vitro* im Lichtregal wachsen gelassen. Die Selektion transgener Pflanzen erfolgte mit geeigneten Antibiotika bzw. Herbizid (Tabelle 2.7) auf sterilem Wachstumsmedium.

Die Transformation von *A. thaliana* Pflanzen erfolgte mittels *A. tumefaciens* vermittelter Blüten Dipp Methode (Clough und Bent 1998).

Für transiente Split YFP Interaktions- und GFP Lokalisationsuntersuchungen (Abschnitt 2.8.3) wurden die Blätter nach der Methode von Sparkes et al. (2006) transformiert.

Tabelle 2.16: Wachstumsmedien für eine sterile Anzucht von *A. thaliana*

Bezeichnung (Referenz)	Zusammensetzung
MS-Medium (Murashige und Skoog 1962)	4,302 g MS pro Liter Es wurde ein pH-Wert von 5,7-5,8 eingestellt 1 % Agar (Merck KGaA, D) für Festmedium
Ats-Medium (Estelle und Sommerville 1987)	5 mM KNO ₃ 2,5 mM KPO ₄ (2,25 mM KH ₂ PO ₄ , 0,25 mM K ₂ HPO ₄) 2 mM MgSO ₄ 2 mM Ca(NO ₃) ₂ 0,5 mM Fe-EDTA Spurenelemente: 70 µM H ₃ BO ₃ , 14 µM MnCl ₂ , 0,5 µM Cu SO ₄ 1 µM ZnSO ₄ , 20 mM Na ₂ MoO ₄ , 10 mM NaCl 10 mM CoCl ₂ 1 % Agar (Merck KGaA, D) für Festmedium

2.9.2 Analyse der untersuchten *Arabidopsis thaliana* Insertionslinien

Die Identifizierung der in dieser Arbeit untersuchten Insertionslinien erfolgte mittels PCR auf genomische DNA bzw. bei transkriptioneller Kontrolle mittels RT-PCR auf RNA unter Verwendung von Gen- sowie Insertionsspezifischen Primern (Tabelle 2.17 und Tabelle 12.1).

Tabelle 2.17: Auflistung der für die Identifizierung der Insertionslinien verwendeten Primerpaare

Insertionslinie	Genspezifische Primer	Insertionsspezifische Primer
<i>atpdx1.1</i> / JIC SM_3.22664	AtPDX1.1FW - AtPDX1.1RW	AtPDX1.1FW - JIC Spm32
<i>atpdx1.2-1</i> / SAIL_640_D11	AtPDX1.2FW1 - AtPDX1.2RW945	AtPDX1.2FW1 - SAIL LB1
SALK_148199.19.20.x	AtPDX1.2FW1 - AtPDX1.2RW945	AtPDX1.2FW1 - SALK Lba1
JIC GT_5.712	AtPDX1.2FW1 - AtPDX1.2RW945	AtPDX1.2FW1 - JIC Spm32 AtPDX1.2RW945 - JIC Spm32
<i>atpdx1.3</i> / SALK_086418	AtPDX1.3FW - AtPDX1.3RW	AtPDX1.3FW - SALK Lba1
<i>at5g65840-1</i> / SALK_018173	At5g65850FW - At5g65840RW	At5g65840RW - SALK Lba1

2.9.3 Analyse des Frischgewichtes von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Die Analyse des Frischgewichtes erfolgte an 35 Tage alten, unter Kurztagbedingungen angezogenen Pflanzen. Für die Messung wurden alle oberirdischen Pflanzenteile einer Pflanze abgeschnitten und sofort das Gewicht in Gramm ermittelt. Je Pflanzenlinie wurden mindestens 21 Einzelpflanzen untersucht und aus den Einzelmessungen der Mittelwert errechnet.

2.9.4 Wurzellängenwachstumsassay

Für die Bestimmung des primären Wurzellängenwachstums wurden Wildtyp Col0 und *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Samen sterilisiert und zwei Tage im Kühlschrank bei 4 °C stratifiziert. Die Samen wurden auf Vitamin B6 haltigem MS Sterilmedium (25 mM PN) *in vitro* ausgelegt. Die Platten mit den Samen wurden aufrechtstehend im Lichtschrank unter Langtagbedingungen kultiviert (Chen und Xiong 2005; Titz et al. 2006). Vier Tage nach der Keimung wurden die Keimlinge auf MS Medium ohne Vitamin B6 bzw. mit Vitamin B6 in Kombination mit NaCl überführt (25 µM PN; 110 mM NaCl; 25 µM PN mit 110 mM NaCl). Zehn Tage nach dem Transfer wurde die Länge der Wurzeln gemessen und analysiert.

2.9.5 Hitzeschock

A. thaliana Col0 Wildtyp bzw. mit *PPDX:myc:AtPDX1.2* transformierte Pflanzen wurden auf sterilem ATS Medium unter Langtagbedingungen bei 22 °C für zehn Tage angezogen. Der Hitzeschock wurde bei 45 °C (für 90 Minuten) bzw. 39 °C (für 60 Minuten) appliziert.

Für die Expressionsanalyse der Proteine wurden die Pflanzen nach einem 60 Minuten Hitzeschock wieder zurück in Langtagbedingungen bei 22 °C gestellt und für weitere 120 Minuten in regelmäßigen Abständen beprobt.

2.9.6 Phänotypische Analyse der *Arabidopsis thaliana* Samen- bzw. Embryonenentwicklung

Für die phänotypische Analyse der Samen- bzw. Embryonenentwicklung wurden aus verschieden alten *Arabidopsis* Schoten die Samen vorsichtig herauspräpariert und durch Inkubation in Ethanol/Essigsäure (6:1) geklärt. Nach Abnahme der Lösung wurden die Samen in Chloralhydrat/Glycerin/Wasser (8:1:2) aufgenommen und mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss) untersucht.

2.9.7 Lokalisationsstudien von AtPDX1.2 und At5g65840

Die Lokalisation des AtPDX1.2 Proteins in *A. thaliana* Samen wurde mit Hilfe eines AtPDX1.2:GFP-Fusionsproteins unter der Kontrolle des endogenen *AtPDX1.2* Promotors (*PPDX1.2*; 1,8 kb) untersucht. Das *PPDX1.2:AtPDX1.2:GFP* Konstrukt (siehe 2.6.12.3, Abbildung 12.6) wurde per Agrobakterien vermittelter Transformation in *Arabidopsis* eingebracht. Transgene Pflanzen wurden nach der Selektion auf Kanamycin haltigem Sterilmedium in Erde gebracht und im Gewächshaus unter Standardbedingungen zur Samenreife wachsen gelassen. Es erfolgte eine mikroskopische Analyse der GFP Fluoreszenz in verschieden alten *Arabidopsis*-Samen mit Hilfe eines konfokalen Leica TCS SP5 Mikroskops.

Die Analyse der At5g65840 Proteinlokalisierung erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines At5g65840:GFP Fusionsproteins, das unter der Expressionskontrolle des P35S Promotors stand. Das *P35S:At5g65840:GFP* Expressionskonstrukt wurde zum einen stabil in *A. thaliana* Col0 Pflanzen eingebracht und zum anderen mittels Agrobakterium vermittelter Transformation in *N. benthamiana* Blättern infiltriert. In beiden Ansätzen wurden Blattmaterial auf die GFP Fluoreszenz mit Hilfe des konfokalen Leica TCS SP5 Mikroskops untersucht.

Einstellungen des Mikroskops für eine Detektion von spezifische GFP Fluoreszenz (GFP Kanal) und unspezifischen Fluorszenzsignalen wie z.B. Chloroplastenfluoreszenz (RED Kanal) waren:
GFP Kanal - Anregung bei 488 nm und Fluoreszenzabnahme bei 500-600 nm
RED Kanal - Anregung bei 488nm; Fluoreszenzabnahme bei 651-721 nm.

2.9.8 Messung der Vitamin B6 Gehalte und Metabolitprofiling

Die Messungen der Vitamin B6 Gehalte und Bestimmung des Metablitprofils wurden von den Kooperationspartnern Dr. Agnieszka Szewczyk (Pharmaceutical Faculty of the Collegium Medicum, Jagiellonian University, Krakow, Polen) und Dr. Alisdair R. Fernie (Max-Planck Institute for Molecular Plant Physiology, Golm, Deutschland) durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde für die Analysen *A. thaliana* Pflanzen unter Kurztagbedingungen für 35 Tage angezogen und geerntete Rosettenblätter in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie im gekühlten Mörser zu feinem Pulver zerrieben wurden.

Für die Analyse des Vitamin B6 Gehaltes wurden 3 x 12 g (Frischgewicht) Pflanzenmaterial je Pflanzenlinie an Dr. Agnieszka Szewczyk nach Polen gesendet. Dabei verwendete Dr. Szewczyk eine an *Arabidopsis* angepaßte Vitamin B6 Extraktionsmethode basierend auf Bognår und Velimatti (1996) und Gonzalez et al. (2007) sowie eine modifizierte HPLC Detektionsmethode von Arenz et al. (1996).

Das Metabolitprofiling wurde mit 100 mg (Frischgewicht) Pflanzenmaterial von Dr. Alisdair R. Fernie mittels einer gekoppelten Gas Chromatographie/Massenspektroskopie (GC-MS) nach einem Standard Protokoll von Roessner et al. (2000) und Roessner-Tunali et al. (2003) durchgeführt. Die Auswertung der Metabolite erfolgte mit Hilfe der „*Golm Metabolome Database*“ (Kopka et al. 2005; Schauer et al. 2005).

3 Ergebnisse

3.1 Analyse von AtPDX1 und AtPDX2 Überexpressionspflanzen

Das bisherige Wissen über die Funktion der AtPDX1 und AtPDX2 Proteine basiert unter anderem auf der Untersuchung von *in vitro* Aktivitätsstudien und der Charakterisierung von *loss-of-function* Mutanten. Während die *atpdx2* Nullmutante einen embryonal letalen Phänotyp zeigte, wiesen die *atpdx1.1* und *atpdx1.3* Einzelmutanten (Tabelle 2.2) schwache Defekte im Wurzelwachstum auf (Chen und Xiong 2005; Titiz et al. 2006; Tambasco-Studart et al. 2007). Dies ist bemerkenswert, da die beiden *AtPDX1* Gene ausschließlich in den oberirdischen Geweben stark exprimiert werden (Wagner et al. 2006). Auch läßt der Vitamin B6 Gehalt der *atpdx1.1* und *atpdx1.3* Mutanten, der je nach Wachstumsbedingungen nur leicht verringert ist, keine direkten Rückschlüsse auf den gezeigten Wurzelphänotyp zu. Die geleisteten Arbeiten konnten demnach nicht alle Hintergründe der *atpdx1* Phänotypen aufklären. Ebenso fehlte weiterhin eine genaue Analyse der Funktion von AtPDX1.2.

Aus diesem Grund konzentrierten sich die Untersuchungen in dieser Arbeit verstärkt auf einen *gain-of-function* Ansatz, bei dem die AtPDX Proteine in *Arabidopsis* überexprimiert wurden. Hierfür wurden die Gene mit einem myc-Epitop N-terminal fusioniert und in *A. thaliana* Col0 Pflanzen unter der Kontrolle eines 35S Blumenkohl Mosaik Virus Promotors (im Weiteren als *P35S:myc:AtPDX* benannt; siehe 2.6.12.3 I) transformiert. In den folgenden Untersuchungen sind die Effekte der Überexpression anhand veränderter Phänotypen, des Vitamin B6 Gehaltes und der Zusammensetzung von pflanzlichen Metaboliten untersucht worden.

3.1.1 Phänotypische Analyse von AtPDX1 und AtPDX2 überexprimierenden Pflanzen

Die *P35S:myc:AtPDX* Primärtransformanten (T1 Generation) wurden nach der *in vitro* Selektion auf kanamycin-hygromycin-haltigem Sterilmedium in Erde umgesetzt und zunächst auf phänotypische Veränderungen hin untersucht.

Der überwiegende Teil der transgenen *P35S:myc:AtPDX* Pflanzen zeigte unter Langtagbedingungen keine Veränderungen im Phänotyp. *P35S:myc:AtPDX1.2* und

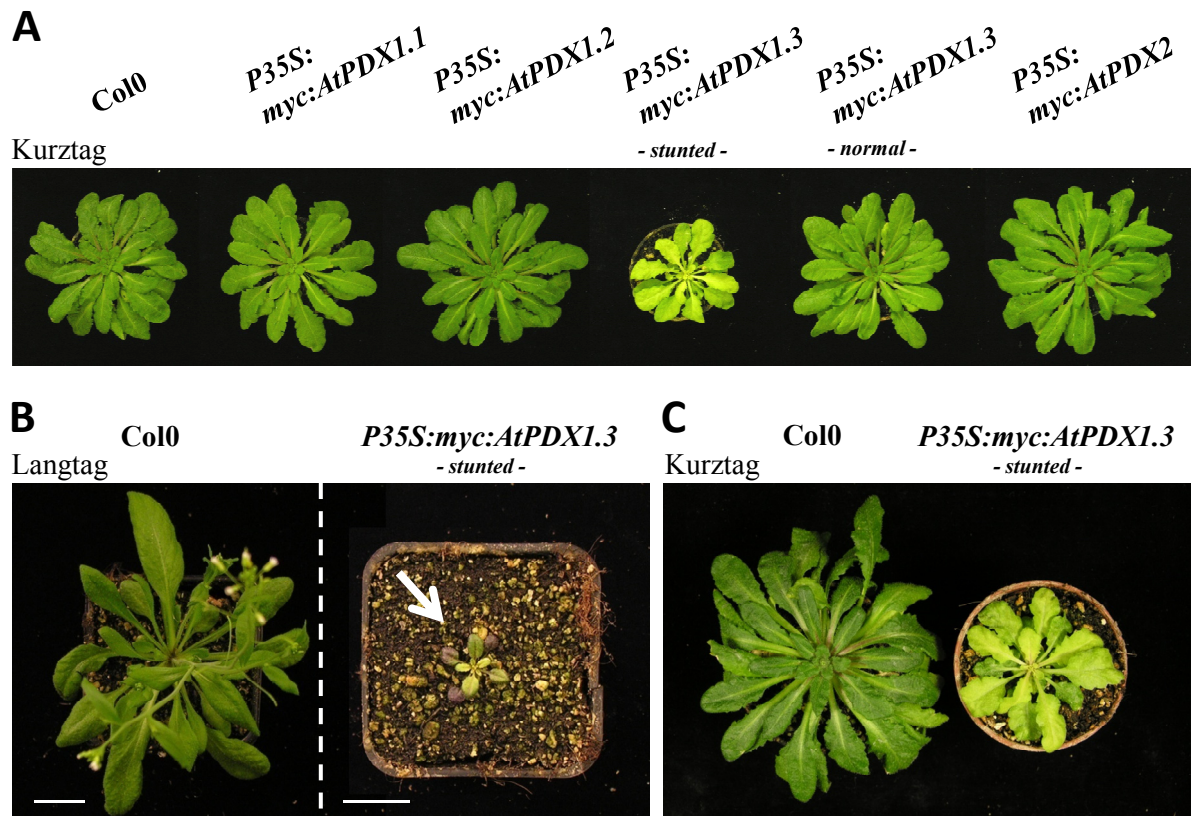


Abbildung 3.1: Phänotypische Analyse von 35 Tage alten *myc:AtPDX* exprimierenden Pflanzen (T4 Generation) im Vergleich zum Wildtyp Col0 angezogen unter Kurztag- (A,C) und Langtagbedingungen (B). Im Falle des eingebrachten *P35S:myc:AtPDX1.3* Konstruktes konnten unterschiedliche Phänotypen mit normalem (-normal-) und gedrunenem (-stunted-) Wachstum beobachtet werden. (B, C) *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* im direkten Vergleich zum Wildtyp Col0. Weiße Referenzstriche in (B) repräsentierten die Länge von 2 cm.

P35S:myc:AtPDX2 Pflanzen entwickelten sich ausschließlich Wildtyp ähnlich. Hingegen konnte bei den *P35S:myc:AtPDX1.1* Pflanzen in einer sehr geringen Frequenz (2 von 55 Pflanzen; 3,6 %) der Primärtransformanten, ein leicht reduzierter Wuchs und leicht gelbliche Blätter beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Merkmale waren jedoch nicht sehr stark ausgeprägt und deshalb wurde nicht weiter verfolgt, wie sich diese leichten Wuchsveränderungen in den nächsten Generationen ausprägten. In der weiteren Arbeit konzentrierten sich die Untersuchungen stattdessen auf Wildtyp ähnliche *P35S:myc:AtPDX1.1* Pflanzen. Im Gegensatz zu den anderen *P35S:myc:PDX* Linien zeigten *P35S:myc:AtPDX1.3* tragende Pflanzen unter Langtagbedingungen einen ausgeprägten Phänotyp, mit einem sehr kleinen Wuchs und hellgelben jüngeren sowie leicht lila gefärbten, älteren Blättern (Abbildung 3.1 B). Dieser Phänotyp konnte bei 56 von 200 (28 %) Primärtransformanten beobachtet werden. Aufgrund der Prägnanz und des relativ hohen

Auftretens des gesehenen Phänotyps wurde beschlossen zusätzlich zu den Wildtyp ähnlichen *P35S:myc:AtPDX1.3* Linien ebenfalls phänotypisch auffällige *P35S:myc:AtPDX1.3* Linien in die weiteren Studien mit einzubeziehen. Dafür wurde jeweils Linien mit gedrungenem (-stunted-) Wuchs (*P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}*) sowie Linien mit Wildtyp ähnlichem (-normal-) Wuchs (*P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}*) ausgewählt und parallel mit den anderen *P35S:myc:AtPDX* Pflanzenlinien bis zur T4 Generation angezogen. Auffällig bei *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen war, daß sie bei unterschiedlichen Lichtbedingungen in ihrem Wuchs variierten. Während die Pflanzen unter Langtagbedingungen den beschriebenen drastischen Phänotyp zeigte, war der Phänotyp unter Kurztagbedingungen deutlich schwächer. Hier konnte im Vergleich zum Wildtyp eine kleinere Rosette und gelbliche, leicht deformierte Blätter gesehen werden (Abbildung 3.1 A, C). Diese starke Lichtsensitivität konnte bei *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* Pflanzen sowie Pflanzen der anderen *P35S:myc:AtPDX* Linien nicht beobachtet werden. Sie zeigten unter Kurztagbedingungen einen normalen Wildtyp ähnlichen Wuchs.

Da für die weiteren Analysen eine größere Menge an Pflanzenmaterial benötigt wurde und zudem die Effekte bei den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen unter Langtagbedingungen zu pleiotrop erschienen, wurden die weiteren Untersuchungen der *P35S:myc:AtPDX* Linien unter Kurztagbedingungen erstellt. Desweiteren wurden die Untersuchung an je einer repräsentativen Pflanzenlinie pro Konstrukt, bei *AtPDX1.3* exprimierenden Linien ebenfalls pro -stunted- und -normal- Phänotyp, durchgeführt. Ein phänotypischen Vergleich an 35 Tage alten *P35S:myc:AtPDX* Pflanzen der T4 Generation ist in Abbildung 3.1 A gezeigt.

Zusätzlich zu der phänotypischen Beobachtung wurde eine Quantifizierung des Frischgewichtes der Blattrosette von im Kurztag angezogenen *P35S:myc:AtPDX1* bzw. *P35S:myc:AtPDX2* Pflanzen durchgeführt (siehe 2.9.3). Die Messungen bestätigten, daß *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen einen verringerten Wuchs mit signifikant geringerem Frischgewicht aufwiesen, während *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* Pflanzen ein Wildtyp ähnliches bzw. in der Tendenz leicht erhöhtes Frischgewicht aufzeigten (Abbildung 3.2). Die *P35S:myc:AtPDX1.1* Pflanzen hatten im Vergleich dazu ein etwas geringeres Frischgewicht, jedoch nicht signifikant verändert zum Wildtyp. *P35S:myc:AtPDX1.2* Pflanzen zeigten ebenfalls keine Veränderung, wohingegen die Pflanzen der *P35S:myc:AtPDX2* Linie sogar signifikant mehr Rosettenmasse ausbildeten (Abbildung 3.2).

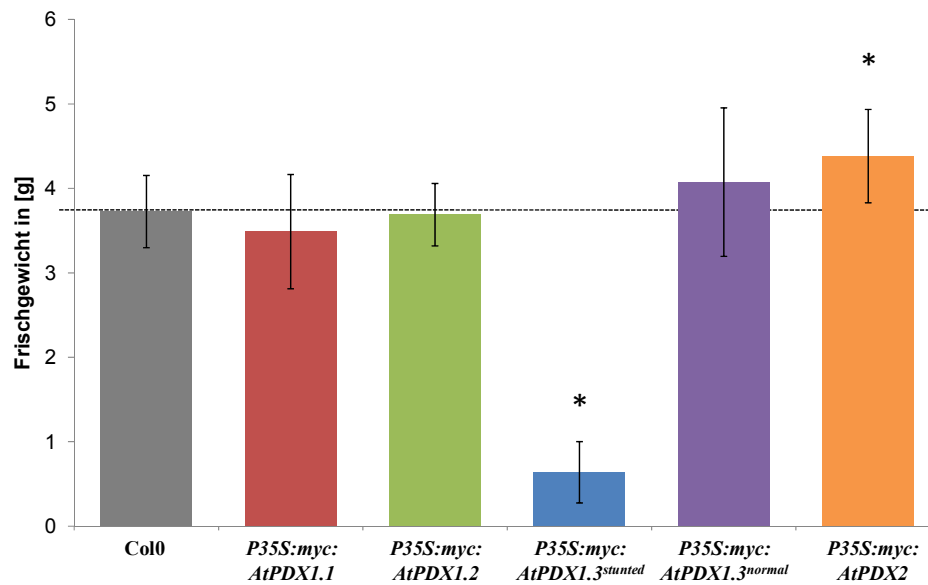


Abbildung 3.2: Frischgewichtsanalyse an 35 Tage im Kurztag angezogenen *P35S:myc:AtPDX* Pflanzen der T4 Generation. Die gestrichelte Linie repräsentiert das Wildtyp Col0 Frischgewicht. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col0 $P < 0,01$ (Ttest) sind mit einem (*) gekennzeichnet.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte beobachtet werden, daß *atpdx1* Mutanten Defekte im Wurzelwachstum auf MS Normalmedium bzw. auf salzhaltigem Medium ausbildeten. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine Untersuchung der Wurzellänge von den phänotypisch interessanten *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp Col0 vorgenommen. Dabei wurde das Wurzelwachstum auf MS Normalmedium, sowie auf MS Medium, dem entweder 25 µM Pyridoxin (Vitamin B6), 110 mM NaCl oder eine Kombination von 25 µM Pyridoxin und 110 mM NaCl zugegeben worden waren, untersucht (siehe 2.9.4). Die Zugabe von Salz zum Medium sollte zeigen, ob es einen vergleichbaren, durch Salzstress ausgelösten Wurzelphänotyp gibt, wie er bei der *atpdx1.1* bzw. *atpdx1.3* Mutante zu beobachten war. Die Kombination von Vitamin B6, in diesem Fall Pyridoxin, im Medium wurde verwendet, um abzuklären, inwieweit das Vitamin einen Effekt auf die Wurzellänge hat und den Salzstress kompensieren kann.

Die Bestimmung der Wurzellänge von *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp Col0 zeigte auf MS Normalmedien bzw. MS Medium mit Vitamin B6 ein nur leicht reduziertes, aber nicht signifikant verändertes Wurzelwachstum (Abbildung 3.3). Salzhaltiges Medium hatte einen negativen Effekt auf das Wurzelwachstum von *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* und Wildtyp Col0 Pflanzen, jedoch konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Pflanzenlinien beobachtet werden. Sie zeigten nahezu eine identische Reduktion im

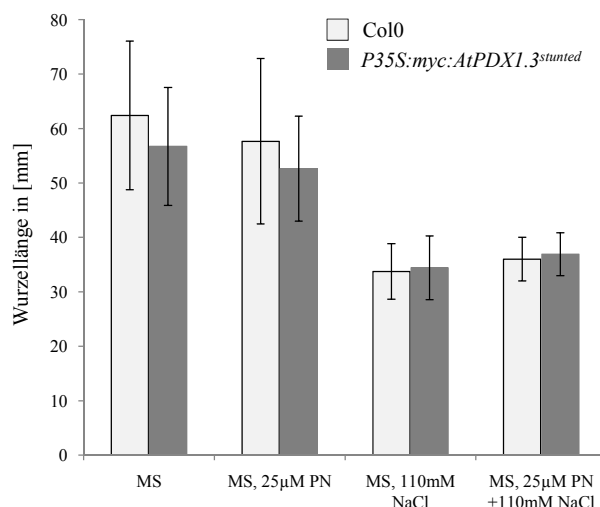


Abbildung 3.3: Wurzellängenanalyse von *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp Col0. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte auf MS Medium, bzw. auf MS Medium mit zugegebenem 25 µM Pyridoxin (Vitamin B6), 110 mM NaCl oder 25µM Pyridoxin plus 110 mM NaCl. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler (SE).

Wurzelwachstum. Vitamin B6 war nicht in der Lage, die salzabhängige Reduktion des Wurzellängenwachstums bei *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* und Col0 Pflanzen aufzuheben.

3.1.2 Analyse der *AtPDX* Expression in *P35S:myc:AtPDX* Pflanzenlinien

Im Anschluß an die phänotypische Analyse erfolgte eine Untersuchung der *AtPDX1* und *AtPDX2* Expression in den verschiedenen transgenen *P35S:myc:AtPDX* Pflanzenlinien. Hierbei wurde die Expression des endogenen *AtPDX* und des eingebrachten *myc:AtPDX* Transgens durch entsprechende Primerwahl (Tabelle 12.1) als eine Gesamtexpression ermittelt. Die Quantifizierung der RNA mittels qRT-PCR sollte zeigen, inwieweit die Transgene überexprimiert werden und ob dies die Expression endogener *AtPDX* Gene beeinflusst.

Die Transkriptanalyse über qRT-PCR (siehe 2.6.6) zeigte eine Steigerung der *AtPDX1.1*, *AtPDX1.2* und *AtPDX2* Gesamtexpression in den jeweiligen *P35S:myc:AtPDX1.1*, *P35S:myc:AtPDX1.2*, und *P35S:myc:AtPDX2* Pflanzenlinien (Abbildung 3.4 A-E). Während *P35S:myc:AtPDX1.1* Pflanzen eine Erhöhung der *AtPDX1.1* Expression um das 7-fache (Abbildung 3.4 A) aufwiesen, konnte in *P35S:myc:AtPDX1.2* Pflanzen sogar eine etwa 17-fach erhöhte *AtPDX1.2* Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.4 B). *P35S:myc:AtPDX2* Pflanzen zeigten dagegen nur eine Steigerung der *AtPDX2* Expression um den Faktor 2 (Abbildung 3.4 E).

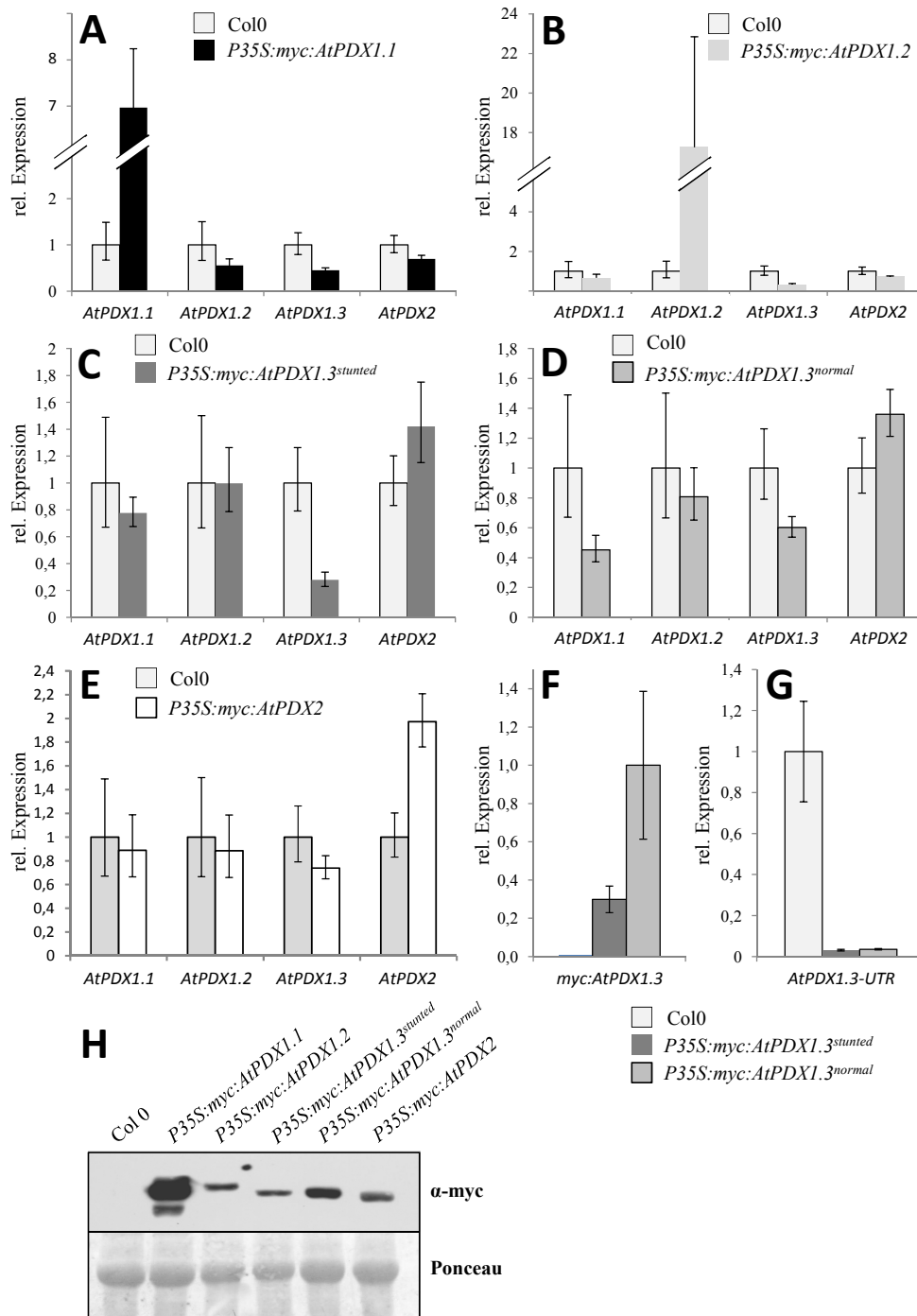


Abbildung 3.4: Expressionsanalyse der *AtPDX* Gene in *P35S:myc:AtPDX* Pflanzen der T4 Generation im Vergleich zum Wildtyp *Col0*. (A-E) QRT-PCR, dargestelltes Transkriptlevel entspricht Gesamtexpression von *AtPDX* und *myc:AtPDX* Expression in Relation zum Wildtyplevel *Col0* (=1). *Col0* und *P35S:myc:AtPDX1.1* (A), *P35S:myc:AtPDX1.2* (B), *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* (C), *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* (D), *P35S:myc:AtPDX2* (E). (F, G) QRT-PCR, Expressionsanalyse von transgenem *myc:AtPDX1.3* (F) und endogenem *AtPDX1.3* (*AtPDX1.3-UTR*, G) in *Col0*, *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* und *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* Pflanzen in Relation zu *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* (=1) (F) und zu *Col0* (=1) (G). Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. (H) Western Blot, Expressionsanalyse von *myc:AtPDX* Protein in den verschiedenen *P35S:myc:AtPDX1* und *P35S:myc:AtPDX2* Pflanzen mit α-myc Antikörper. Die Ponceaufärbung diene als Ladungskontrolle. Alle untersuchten Pflanzen wurden jeweils 35 Tage unter Kurztagbedingungen angezogen.

Erstaunlicherweise konnte keine Steigerung der *AtPDX1.3* Expression in den beiden Linien *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* und *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* detektiert werden. Sie zeigten sogar eine Reduktion der *AtPDX1.3* Gesamtexpression auf 60 % bzw. 28 % des Wildtypniveaus (Abbildung 3.4 C, D). Eine reduzierte *AtPDX1.3* Expression war ebenfalls in den *P35S:myc:AtPDX1.1* und *P35S:myc:AtPDX1.2* Linien zu beobachten. Die *AtPDX1.3* Expression lag bei 45 % bzw. 33 % des Wildtypniveaus (Abbildung 3.4 A, B). Darüber hinaus zeigten *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* Pflanzen ebenfalls eine Reduktion in der *AtPDX1.1* Expression (um ca. 55 %), welche sogar stärker war als die beobachtete Reduktion in *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen (um ca. 33 %). Einzig die *AtPDX2* Expression war in den beiden *P35S:myc:AtPDX1.3* Linien leicht erhöht (Abbildung 3.4 C, D). Eine Erhöhung der *AtPDX2* Expression konnte in den Linien *P35S:myc:AtPDX1.1* und *P35S:myc:AtPDX1.2* nicht beobachtet werden. Auffallend war, daß die beiden *P35S:myc:AtPDX1.3* Linien nahezu keine Expression des endogenen *AtPDX1.3* Genes (*AtPDX1.3-UTR*) aufwiesen (Abbildung 3.4 G). Die stärkere *AtPDX1.3* Gesamtexpression in den *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* im Vergleich zu den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen kommt demnach ausschließlich durch den erhöhten Transkriptlevel des *myc:AtPDX1.3* Transgens zustande (Abbildung 3.4 F).

Die Expression der eingeführten Konstrukte wurde anschließend ebenfalls auf der Proteinebene untersucht. Hierfür wurde aus den Pflanzen Gesamtprotein aufgereinigt (siehe 2.7.1.) und über einen Western Blot (siehe 2.7.6) mit anschließender Immunodetektion gegen das myc-Epitop analysiert (siehe 2.7.7). Die Analyse diente zur Bestätigung der Expression von mit myc-Epitop fusionierten *AtPDX1* und *AtPDX2* Proteinen in den jeweiligen transgenen Pflanzenlinien. Hierbei konnte mit einem spezifischen α -myc Antikörper in allen Linien eine Expression des entsprechenden *myc:AtPDX1* bzw. *myc:AtPDX2* Proteins detektiert werden (Abbildung 3.4 H). Besonders stark war die Expression von *myc:AtPDX1.1* in der *P35S:myc:AtPDX1.1* Linie. Es konnte auch in dieser Analyse eine deutlich stärkere *myc:AtPDX1.3* Expression in den *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* Pflanzen im Vergleich zu den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen beobachtet werden.

3.1.3 Funktionalitätsanalyse der *P35S:myc:AtPDX* Konstrukte

Ein allgemeines Problem bei der Verwendung von Fusionsproteinen ist, daß das fusionierte Epitop die Funktionalität der Proteine beeinträchtigen kann. Um den Effekt des myc-Epitops zu untersuchen, wurde ein Komplementationsansatz der *rsr4-1* Mutante durchgeführt.

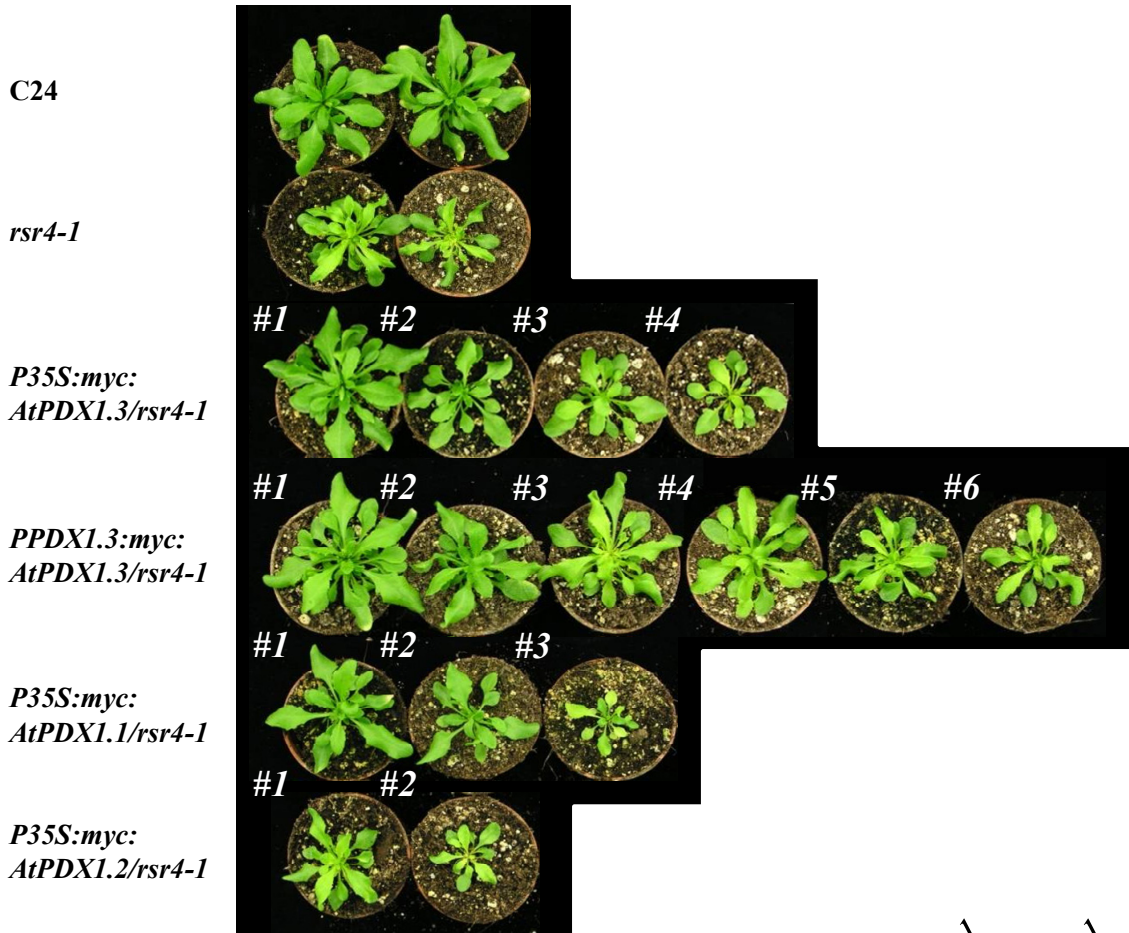
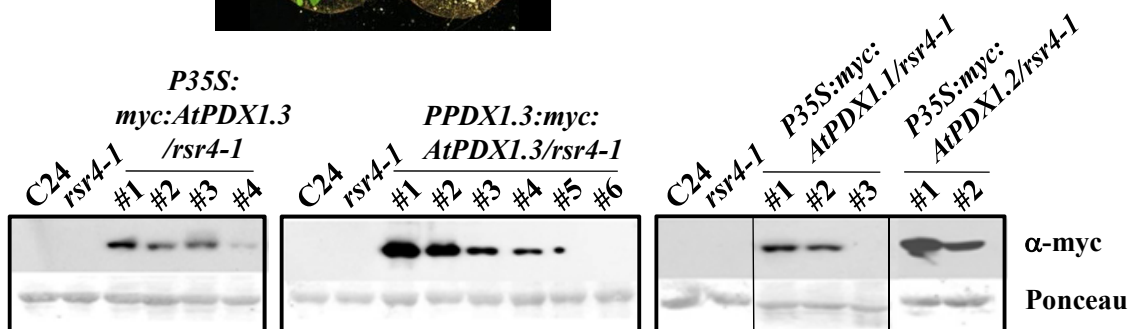
A**B**

Abbildung 3.5: Komplementationsansatz der *rsr4-1* Mutante mittels eingebrachter *AtPDX1* Expressionskonstrukte. **(A)** Phänotypische Ansicht des C24 Wildtyps, der *rsr4-1* Mutante (C24 Hintergrund) sowie unabhängige Linien der verschiedenen Primärtransformanten, exprimierend *myc:AtPDX1.1*, *myc:AtPDX1.2* bzw. *myc:AtPDX1.3* im *rsr4-1* Hintergrund. Die Fusionsproteine standen unter transkriptioneller Kontrolle des *P35S* Promotors und im Falle von *myc:AtPDX1.3* auch unter der Kontrolle des endogenen *AtPDX1.3* Promotors (*PPDX1.3*, 1.1 Kb Fragment). **(B)** Nachweis der Proteinexpression in den verschiedenen *rsr4-1* Komplementationslinien über Western Blot und Immunodetektion mit α -myc Antikörper. Eine Ponceaufärbung diente als Ladungskontrolle. Alle untersuchten Pflanzen wurden 20 Tage unter Langtagbedingungen angezogen.

Die *rsr4-1* Mutante (C24 Hintergrund) besitzt eine Punktmutation im *AtPDX1.3* Gen, welche zu einem Aminosäureaustausch und zu einem unfunktionalem *AtPDX1.3*^{G54S} Protein führt. Aufgrund der Mutation haben *rsr4-1* Pflanzen einen stark verringerten Vitamin B6 Gehalt, einen verminderten Wuchs und leicht gelbliche Blätter mit einem reduzierten Chlorophyllgehalt (siehe dazu Abschnitt 1.3.3.). Durch das Einbringen der verschiedenen *P35S:myc:AtPDX1* Expressionskonstrukte sollte untersucht werden, ob eine Komplementation des beschriebenen *rsr4-1* Phänotyps möglich ist und somit eine Funktionalität der *myc:AtPDX* Fusionsproteine nachgewiesen werden kann.

Nach den Transformationen von *rsr4-1* Pflanzen konnten für jedes der drei *P35S:myc:AtPDX1* Konstrukte transgene *P35S:myc:AtPDX1/rsr4-1* Linien erhalten werden, die jeweils das entsprechende *myc:AtPDX1* Protein exprimierten (Abbildung 3.5 B). Eine Reversion des *rsr4-1* Phänotyps konnte bei *myc:AtPDX1.1* und *myc:AtPDX1.3* exprimierenden *rsr4-1* Pflanzen beobachtet werden (Abbildung 3.5 A). Die Pflanzen entwickelten in der Rosettengröße sowie in der Blattfärbung wie der Wildtyp C24. Darüber hinaus konnte ebenfalls eine Komplementation durch ein *AtPDX1.3* Konstrukt unter der Kontrolle des endogenen *AtPDX1.3* Promotors (*PPDX1.3:myc:AtPDX1.3*; siehe 2.6.12.3 III) erzielt werden. Die Normalisierung des Phänotyps war in allen Ansätzen abhängig von der Stärke der *myc:AtPDX1.1* bzw. *myc:AtPDX1.3* Expression (Abbildung 3.5 B). So war bei schwacher bis gar keiner *myc:AtPDX1.1* bzw. *myc:AtPDX1.3* Proteinexpression keine Veränderung des *rsr4-1* Phänotyps erkennbar. Im Gegensatz zu *AtPDX1.1* und *AtPDX1.3* Ansätzen konnte die starke Expression von *myc:AtPDX1.2* keine Komplementation des *rsr4-1* Phänotyps bewirken (Abbildung 3.5).

Die Untersuchung der Funktionalität der *myc:AtPDX1* Expressionskonstrukte anhand des Komplementationsansatz der *rsr4-1* Mutante deuten an, daß die eingebrachten *myc*-Epiotp fusionierten *AtPDX1.1* und *AtPDX1.3* Proteine funktional waren. Allerdings war bei der Verwendung von *myc*-Epiotp fusionierten Proteinen nicht auszuschließen, daß die vorhandene phänotypische Veränderung der *P35S:myc:AtPDX1.3*^{stunted} Pflanzen möglicherweise direkt mit dem verwendeten *myc*-Epiotp zusammenhängt. Um dies abzuklären wurden *A. thaliana* Col0 Pflanzen mit einem unfusioniertem *AtPDX1.3* (*P35S:AtPDX1.3*; siehe 2.6.12.3 II) Expressionskonstrukt transformiert. Die Primärtransformanten wurden mit dem Wildtyp Col0 und den zwei phänotypisch verschiedenen

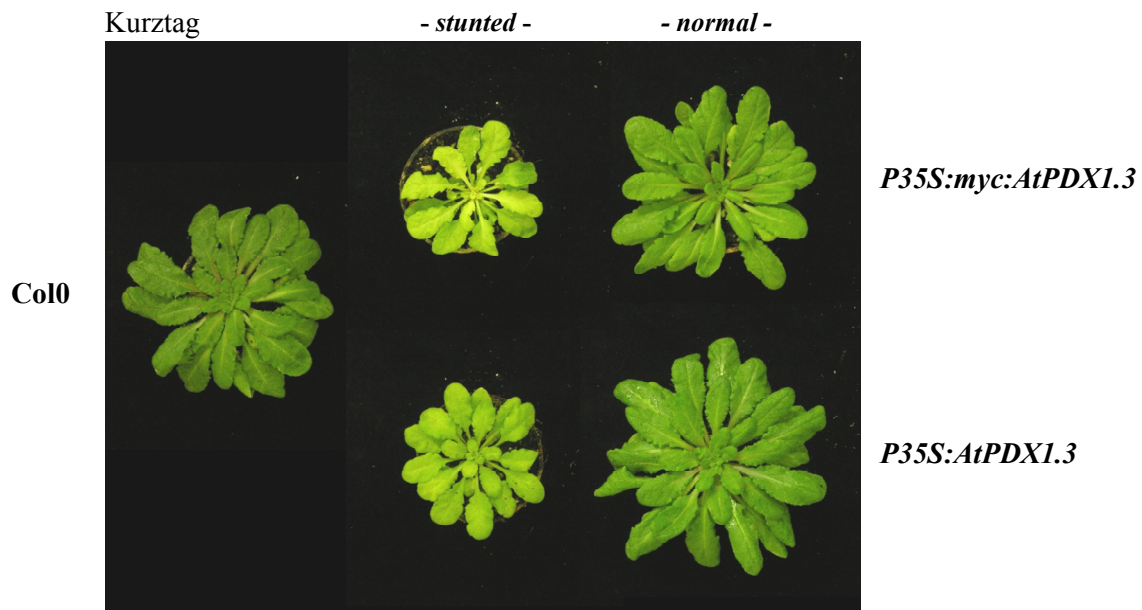


Abbildung 3.6: Phänotypischer Vergleich von mit myc-Epitop fusionierten und unfusionierten *AtPDX1.3* exprimierenden Pflanzenlinien. Das in den transgenen Pflanzen eingebrachte *P35S:AtPDX1.3* Konstrukte verursachte ebenfalls, wie bei dem eingebrachten *P35S:myc:AtPDX1.3* Konstrukt, zwei unterschiedliche Phänotypen mit einem verkümmerten (-*stunted*-) und einem Wildtyp ähnlichen (-*normal*-) Wachstum. Abgebildet sind *P35S:AtPDX1.3* Primärtransformanten der T1 Generation sowie *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* und *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* Pflanzen der T4 Generation. Alle Pflanzen wuchsen 35 Tage unter Kurztagebedingungen.

P35S:myc:AtPDX1.3 Pflanzenlinien 35 Tage unter Kurztagebedingungen angezogen und verglichen. Hierbei konnte beobachtet werden, daß zwei von zehn (20 %) *P35S:AtPDX1.3* Primärtransformanten einen zu der *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzenlinie ähnlichen gedrungenen Wuchs mit kleineren, leicht gelben Blättern aufzeigten (Abbildung 3.6).

Die Mehrzahl der Primärtransformanten (80 %) zeigte einen Wildtyp ähnlichen bzw. *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* vergleichbaren Phänotyp. Die beiden eingebrachten *AtPDX1.3* Expressionskonstrukte bewirken demnach vergleichbare Phänotypen. Auch kommen die beiden hier auftretenden Phänotypen bei beiden Expressionskonstrukten ähnlich häufig vor. Daher erscheint es unwahrscheinlich, daß das myc-Epitop in *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen den veränderten Wuchs verursacht hat. Allerdings muß man festhalten, daß die analysierten *P35S:AtPDX1.3* Phänotypen nur bei einer sehr geringen Anzahl an Primärtransformanten untersucht werden konnten. Eine sichere Aussage über deren Verteilung ließe sich nur mit einer deutlich höheren Stichprobenanzahl treffen, wie dies bei *P35S:myc:AtPDX1.3* Primärtransformanten der Fall war. Die Ergebnisse aus den hier dargestellten beiden Ansätzen ließen auf eine Funktionalität der verwendeten myc:AtPDX

Fusionsproteine schließen. Die Untersuchungen an den *P35S:myc:AtPDX* Pflanzen wurden daraufhin weitergeführt.

3.1.4 Effekt der *P35S:myc:AtPDX* Expression auf den Vitamin B6 und Metabolit Gehalt von *Arabidopsis thaliana*

Im folgenden Teil der Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluß die ektopische Expression der *myc:AtPDX1* bzw. *myc:AtPDX2* Proteine auf den Metabolismus der entsprechenden transgenen Pflanzen hat. Wegen des sehr starken Phänotyps der *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen unter Langtagbedingungen wurden generell alle Pflanzen für die Untersuchung der Vitamin B6 Gehalte und der Metabolitanalysen 35 Tage unter Kurztagbedingungen angezogen. Die Messungen der Vitamin B6 Gehalte bzw. das Metabolitprofiling mittels Gaschromatographie gekoppelter Massenspektroskopie (GCMS) wurden von den Kooperationspartnern Dr. Agnieszka Szewczyk (Pharmazeutische Fakultät des Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polen) und Dr. Alisdair R. Fernie (Max-Planck Institut für Molekulare Pflanzen Physiologie, Golm, Deutschland) durchgeführt (siehe 2.9.8). Die Analyse der Vitamin B6 Derivate Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxin in den verschiedenen transgenen Linien ergab in den *P35S:myc:AtPDX1.1* Pflanzen eine leichte Reduktion der Pyridoxamin Werte (70 % des Wildtyplevel), aber eine Erhöhung der Pyridoxal und Pyridoxin Werte (Abbildung 3.7 A). Hierbei zeigten die Pyridoxin Werte sogar eine signifikante Erhöhung an. Addiert man die Werte der drei Vitamin B6 Derivatgehalte, so zeigte sich bei der *P35S:myc:AtPDX1.1* Linie eine Erhöhung des Gesamtgehaltes um das ca. 1,3-fache bezogen auf die Col0 Werte (Abbildung 3.7 B). Die *P35S:myc:AtPDX2* Pflanzenlinie zeigte bis auf eine leichte Reduktion der Pyridoxamin Werte kaum eine Veränderung zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu konnte bei der *P35S:myc:AtPDX1.2* Linie eine Tendenz zu einem geringeren Vitamin B6 Gehalt (80 % vom Wildtyplevel) nachgewiesen werden (Abbildung 3.7 B). *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* Pflanzen zeigten einen reduzierten Pyridoxingehalt und unveränderte Pyridoxamin und Pyridoxal Werte (Abbildung 3.7 A). Bei *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen war hingegen eine deutliche Reduktion des Vitamin B6 Gehaltes zu beobachten. Besonders auffällig war die starke Reduktion des Pyridoxingehaltes und der um etwa 33 % verringerte Pyridoxalgehalt. Zusammengenommen zeigten die *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen einen deutlich geringeren Vitamin B6 Gesamtgehalt, der bei etwa 60 % des Wildtypniveaus lag (Abbildung 3.7 B).

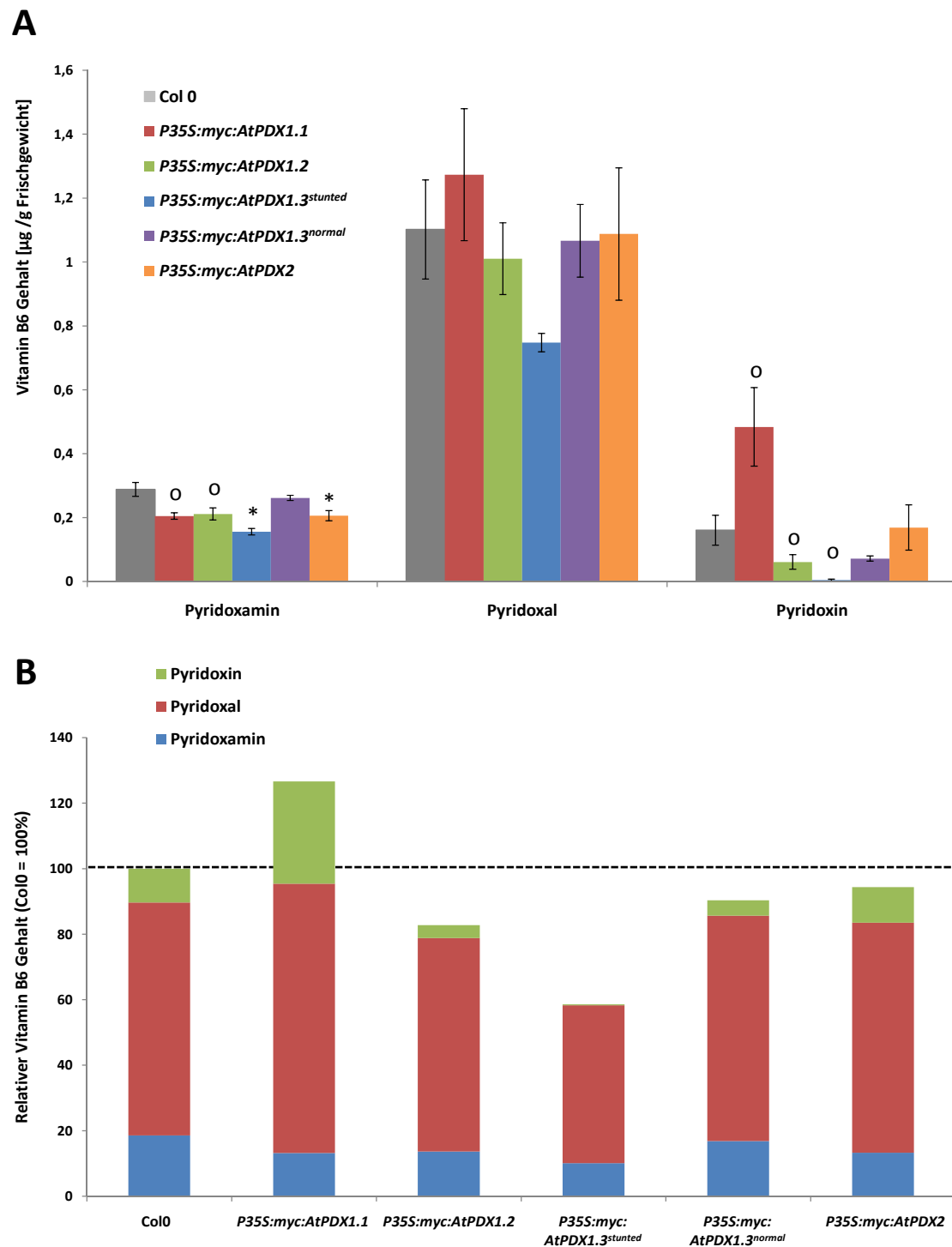


Abbildung 3.7: Analyse des Vitamin B6 Gehaltes der 35 Tage alten unter Kurztagbedingungen angezogenen *P35S:myc:AtPDX* Pflanzen (T4 Generation). Aufgeführt sind (A) die Gehalte an den Derivaten Pyridoxamin, Pyridoxal und Pyridoxin und (B) der aus den drei Derivaten ermittelte relative Vitamin B6 Gesamtgehalt in Relation zum Wildtyp Col0 (= 100 %). Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col0 in (A) $p < 0,05$ (o) und $p < 0,01$ (*) (Ttest).

Die Analyse der Zellmetabolite ergab, daß die *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen die größten Veränderungen gegenüber dem Wildtyp zeigten (Abbildung 3.8). In den anderen *P35S:myc:AtPDX* Linien wurden nur kleinere Abweichungen bezüglich der gemessenen Metabolite beobachtet. In Abbildung 3.8 sind ausgewählte Metabolitdaten dargestellt. Eine vollständige Liste aller gemessenen Metabolite ist im Anhang aufgeführt (Tabelle 12.2).

P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted} Pflanzen zeigten eine deutliche Erhöhung in verschiedenen Aminosäuren wie Glycin, Prolin, Methionin, Ornithin, β -Alanin, und Arginin (Abbildung 3.8 C). Hierbei war die größte Veränderung im Glycingehalt zu beobachten, welcher um ca. das 20-fache erhöht war, bezogen auf die ermittelten Werte des Wildtyps Col0 (Abbildung 3.8 C). Glycin war auch in der *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* Linie erhöht, allerdings nicht signifikant. Demgegenüber war der Gehalt an der Aminosäure Serin, die wie Glycin ein Metabolit in der Photorespiration ist, in den beiden *P35S:myc:AtPDX1.3* Linien kaum erhöht. In den *P35S:myc:AtPDX1* und *P35S:myc:AtPDX2* Linien wurden erhöhte Prolingehalte und reduzierte γ -Aminobuttersäurewerte (GABA) gemessen. Der GABA Gehalt war besonders in den *P35S:myc:AtPDX2* Pflanzen deutlich verringert. Diese Linie zeigte auch eine Reduktion in den Aminosäuregehalten von β -Alanin, Arginin, Glutamin, Glutamat und Ornithin.

Veränderungen der Gehalte an organischen Säuren konnten nur für die *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen gemessen werden. So wurde nur in dieser Linie eine signifikante Erhöhung der Citrat- sowie Malatwerte beobachtet. Die anderen transgenen Linien zeigten keine signifikanten Abweichungen (Abbildung 3.8 B).

Die Untersuchung der verschiedenen Zuckerverbindungen in den Pflanzen ergab, daß die *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen eine Erhöhung in den Isomaltosewerten aufwiesen, während gleichzeitig Galaktose, Raffinose und Glukose reduziert waren (Abbildung 3.8 B). Eine Erhöhung der Isomaltose- und eine Erniedrigung der Raffinosewerte konnte bei keiner anderen Überexpressionslinie festgestellt werden, wohingegen alle *myc:AtPDX1* Linien eine Reduktion in den Galaktose- und Glukosewerten zeigten.

Die *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen zeigten gegenüber dem Wildtyp und den *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* Pflanzen erhöhte Werte an Adenin (Abbildung 3.8B), während in *P35S:myc:AtPDX2* exprimierenden Pflanzen der Gehalt an dieser Base verringert war.

Die komplexen metabolischen Veränderungen in den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen zeigten, daß die verminderte Expression von *AtPDX1.3* und die reduzierten Vitamin B6 Werte einen großen Einfluß auf den Metabolithaushalt zur Folge haben.

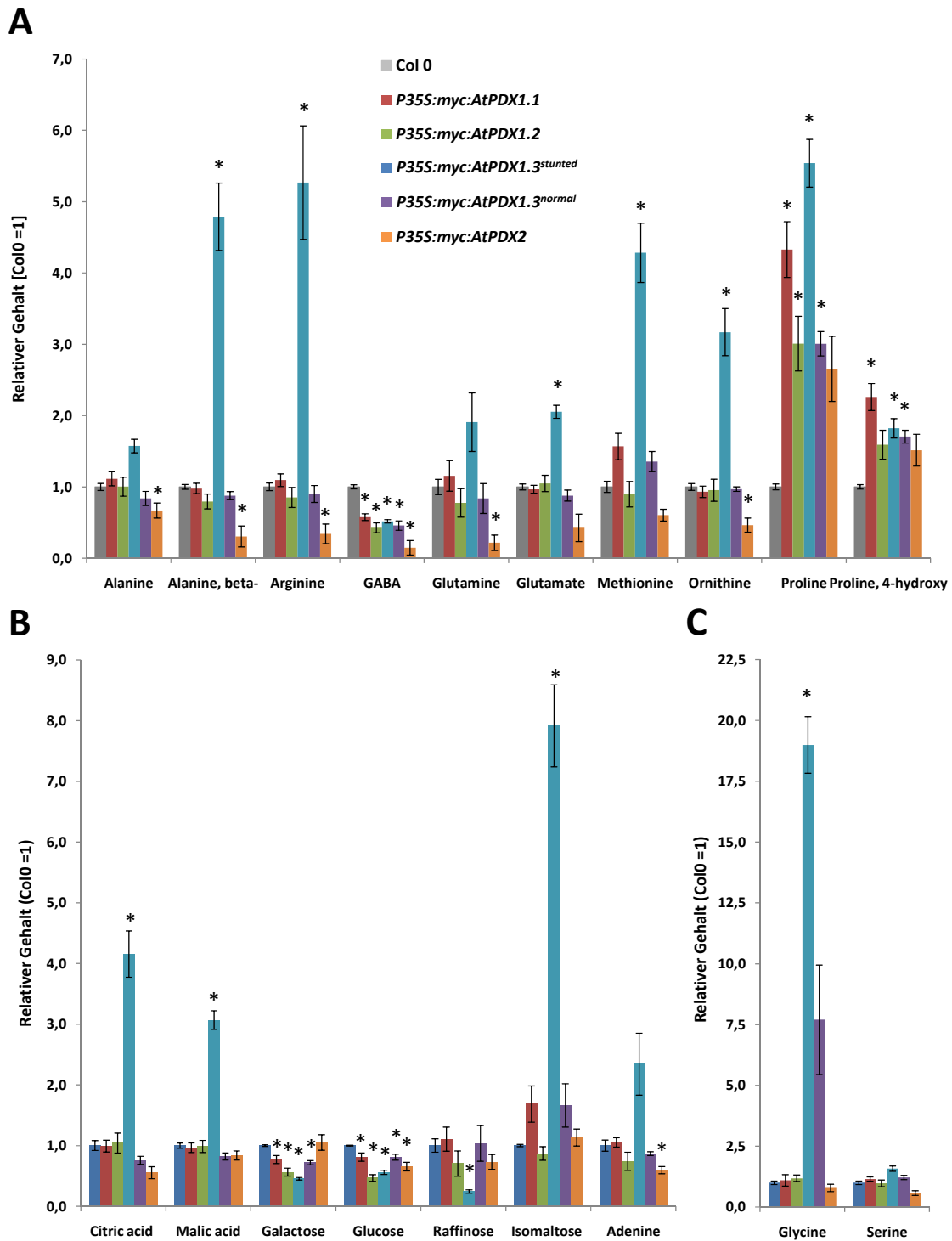


Abbildung 3.8: Analyse des Metabolitgehaltes der *P35S:myc:AtPDX* Pflanzen (T4 Generation). Getrennt dargestellt sind die Gehalte an Aminosäuren (A), Zuckern (B) und die in der Photorespiration involvierten Aminosäuren Glycin bzw. Serin (C). Signifikante Unterschiede zum Wildtyp Col0 $p < 0,01$ (*) (Ttest). Alle Pflanzen wuchsen 35 Tage unter Kurztagbedingungen.

3.2 Interaktion und Komplexbildung der AtPDX Proteine

Bisher liegen über Protein-Protein Interaktionen der pflanzlichen PDX Proteine nur wenige Studien vor. Dabei stellt die Bildung von hochmolekularen Komplexen, wie sie bereits für andere Organismen beschrieben wurde, einen wichtigen Aspekt der Funktionalität von PDX1 und PDX2 Proteinen dar. Da dem AtPDX1.2 Protein bisher noch keine biologische Funktion zugeschrieben wurde, war es interessant zu untersuchen, ob das Protein zusammen mit den anderen AtPDX Proteinen in einem möglichen PLP Synthase-Proteinkomplex steht und inwieweit das Protein dadurch die Vitamin B6 Biosynthese beeinflussen kann.

3.2.1 *In planta* Interaktionen von AtPDX1 Proteinen

In vorangegangenen Y2H und *in vitro* Pulldown Studien konnte bereits gezeigt werden, daß alle AtPDX1 Proteine miteinander interagieren können (Leuendorf 2006; Wagner et al. 2006). Jedoch sind bisher keine Studien durchgeführt worden, in denen eine *in planta* Interaktion gezeigt werden konnte. Um diese Lücke zu schließen wurden Split-YFP bzw. BIFC Studien (Walter et al. 2004) mit den AtPDX1 Proteinen durchgeführt (siehe 2.8.3). Hierfür wurden AtPDX1 Split-YFP Expressionskonstrukte generiert und in *N. benthamiana* Blättern transient eingebracht (siehe 2.9.1). Die infiltrierten Blätter wurden unter einem konfokalem Laserscanningmikroskop untersucht (siehe 2.8.3) und im direkten Anschluß mittels Western Blot Analyse auf das Vorhandensein der Fusionsproteine getestet.

In ersten Vorversuchen zeigte sich, daß die Kombination der beiden Leervektoren zu einer deutlichen Grundfluoreszenz führte (Daten nicht gezeigt). Da dieses Phänomen ein Grundproblem im BIFC System ist (Lalonde et al. 2008), wurde als Negativkontrolle für die Interaktionsstudien das Protein AtBPM4 verwendet (Weber und Hellmann 2009). AtBPM4 ist wie die AtPDX1 Proteine cytosolisch lokalisiert und wurde bisher nicht in einem funktionalen Zusammenhang mit den untersuchten Proteinen gebracht. Erwartungsgemäß konnte bei den BIFC Ansätzen in keiner der untersuchten AtPDX1 und AtBPM4 Split-YFP Kombinationen eine YFP Fluoreszenz gemessen werden (Abbildung 3.9 A I, V, IX, X, XI), während die Western Blot Analyse eine robuste Expression der Proteine anzeigte (Abbildung 3.9 B).

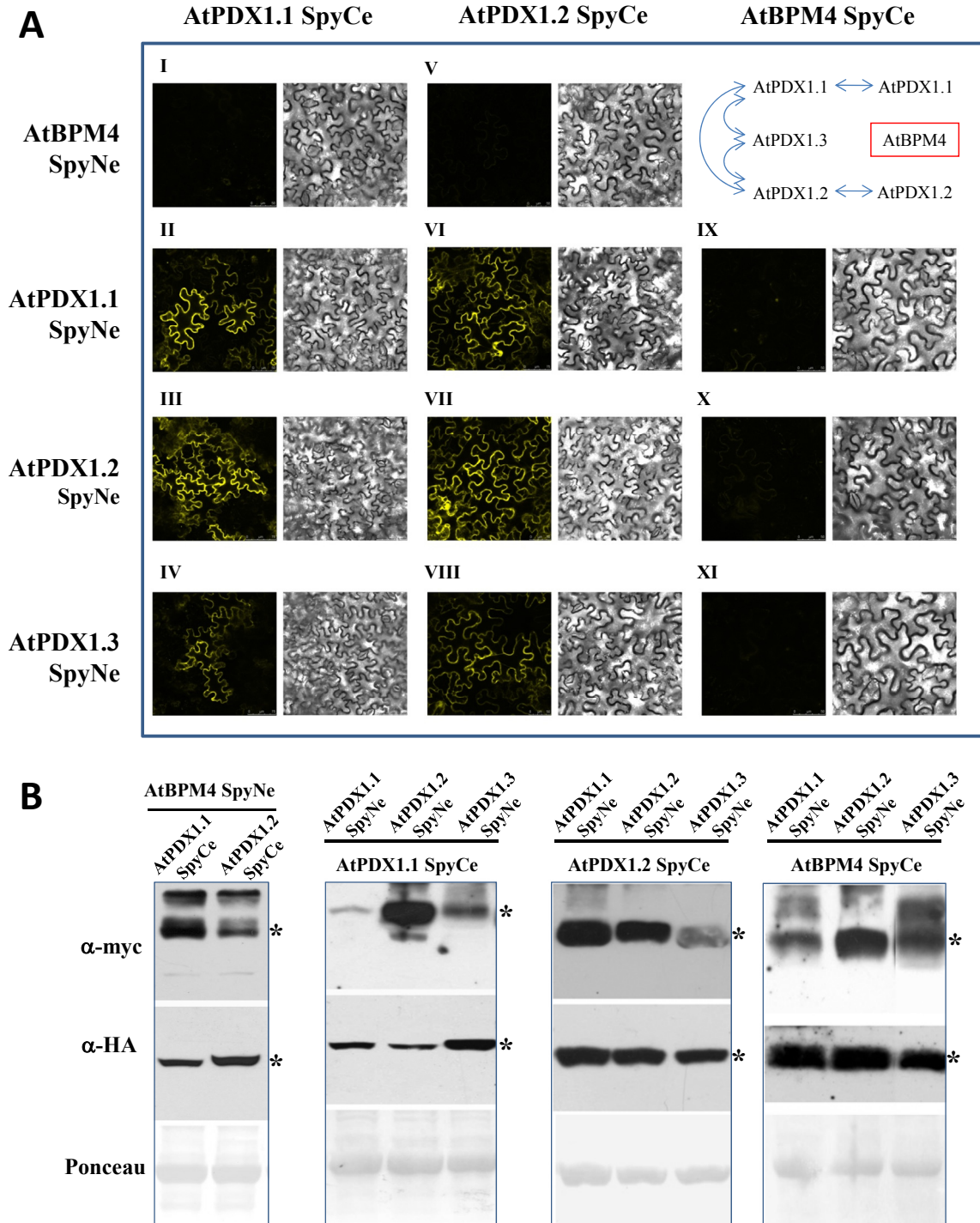


Abbildung 3.9: BIFC Analyse in *N. benthamiana* (A). Die AtPDX Proteine wurden in die BIFC Vektoren *pE-SPYNE-GW* (YN = N-terminale Hälfte des YFP) und *pE-SPYCE-GW* (YC = C-terminale Hälfte des YFP) kloniert und transient in *N. benthamiana* Blättern exprimiert. Die gelbe Fluoreszenz zeigt die Wiedervereinigung der beiden YFP Hälften und damit indirekt die Interaktion der Fusionsproteine an. (B) Proteinnachweis über Western Blot/Immunodetektion in den durchgeführten BIFC Ansätzen (A). Die YN-YFP Fusionsproteine wurden mit einem α -myc Antikörper, die YC-YFP Fusionsproteine mit einem α -HA Antikörper detektiert. 30 μ g Gesamtprotein je BIFC Ansatz wurde für den Western Blot auf das SDS-Gel geladen (B). AtBPM4 wurde als negative Interaktionskontrolle eingesetzt.

Dagegen zeigten die AtPDX1.1 und AtPDX1.2 Proteine in der getesteten Eigeninteraktion oder Interaktion mit den anderen AtPDX1 Proteinen eine starke YFP Fluoreszenz (Abbildung 3.9 A II, III, IV, VI, VII, VII). Die Fluoreszenz wurde dabei ausschließlich im Cytoplasma gesehen. Für diese Interaktionstests konnte ebenfalls eine gute Expression der AtPDX1 Split-YFP Fusionsproteine im Western Blot detektiert werden (Abbildung 3.9 B).

3.2.2 Bildung von hochmolekularen AtPDX1 Proteinkomplexen

Aufgrund der bereits erwähnten Studien über PDX1 und PDX2 Homologe in anderen Organismen und deren Fähigkeit, hochmolekulare Komplexe auszubilden, wurde eine solche Komplexbildung nach den Ergebnissen der BIFC Untersuchung ebenfalls für *Arabidopsis* PDX Proteine als wahrscheinlich angenommen.

Mit Hilfe einer *fast protein liquid chromatography* (FPLC) Größenausschlußchromatographie wurden die myc:AtPDX1 Proteine nativ nach ihrer Größe aufgereinigt und anschließend analysiert, ob sie zu hochmolekularen Komplexen aggregieren können. Für diese Studien wurde Gesamtprotein von den *P35S:myc:AtPDX1.1*, *P35S:myc:AtPDX1.2*, *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}*, *P35S:myc:AtPDX2* Expressionslinien aufgereinigt und nativ über eine kalibrierte HiLoad™ 16/60 Sephadex 200 Größenausschlußsäule aufgetrennt (Abbildung 3.10 B, siehe 2.8.4). Durch die Analyse der separat gesammelten Elutionsfraktionen mittels denaturierende SDS-Gelelektrophorese und anschließender Immunodetektion gegen das myc-Epitop konnte bestimmt werden, bei welchen Retentionsvolumina (V_e) myc:AtPDX1 bzw. myc:AtPDX2 Proteine gehäuft auftraten. Es handelte sich hierbei um die Retentionsvolumina 43 mL, 52 mL sowie 72 mL (markiert mit Sternen (*)), von links nach rechts; Abbildung 3.10 C). Dabei traten myc:AtPDX1.1, myc:AtPDX1.2 und myc:AtPDX1.3 Proteine in Fraktionen um die 52 mL auf, während myc:AtPDX2 Protein eher im Bereich um 43 mL vermehrt zu finden war. Bei dem Retentionsvolumen um 72 mL konnte ein Auftreten der Proteine ausschließlich für myc:AtPDX1.2 und myc:AtPDX2 detektiert werden. Die genannten Retentionsvolumina wurden mittels einer Eichgeraden, welche durch Kalibrierung der Größenausschlußsäule ermittelt worden war, (Abbildung 2.2; siehe 2.8.4) in die jeweiligen Proteingrößen in kDa umgerechnet (Tabelle 3.1). Demnach stehen die myc:AtPDX1 und myc:AtPDX2 Proteine in der Pflanzenzelle in hochmolekularen Komplexen der Größe von ca. 400 kDa und ca. 745 kDa, während myc:AtPDX1.2 und myc:AtPDX2

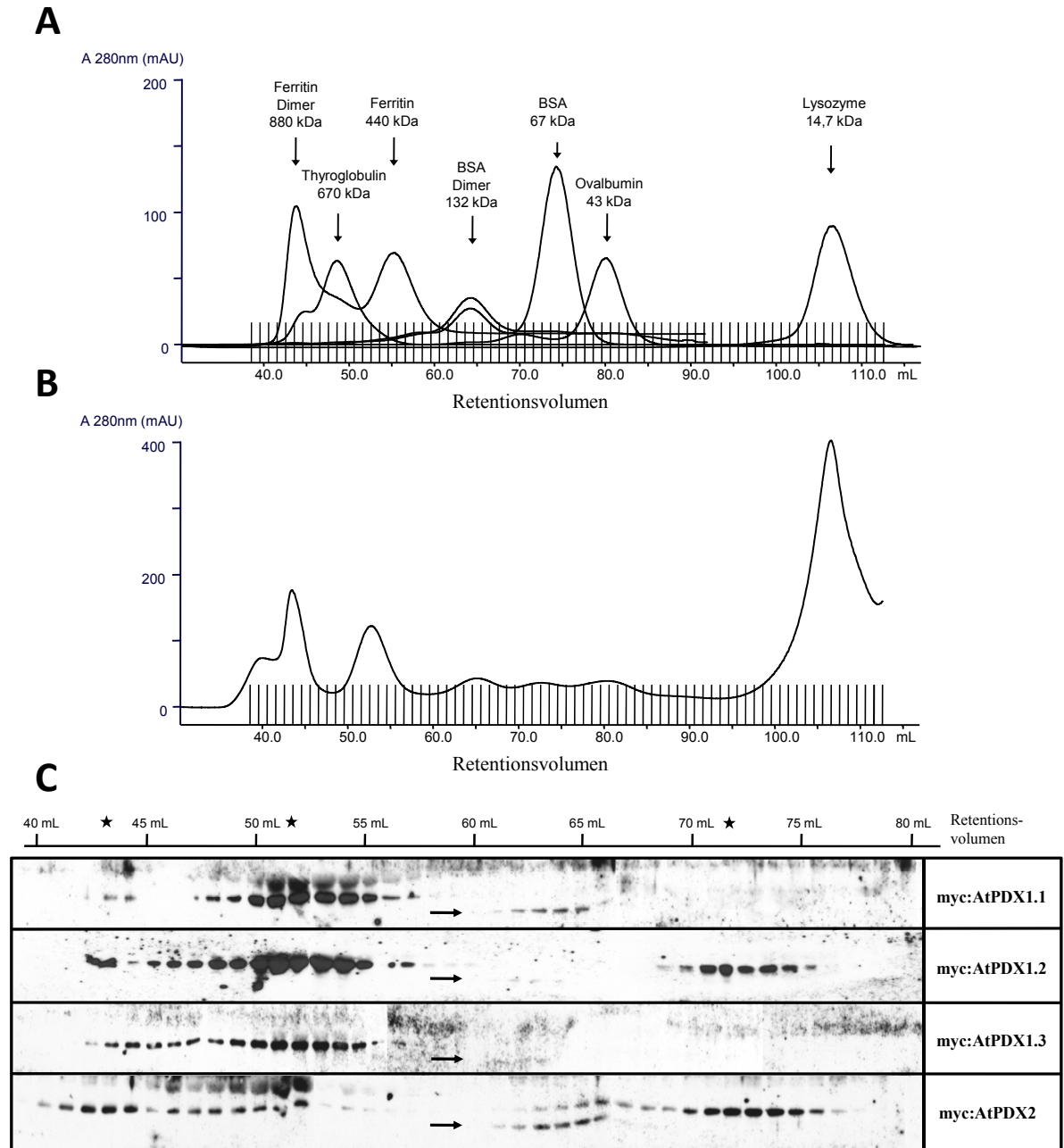


Abbildung 3.10: Analyse der Komplexbildung von AtPDX Proteinen mittels *fast protein liquid chromatography* (FPLC) Größenausschlußchromatographie. **(A)** Chromatogramm, Standardisierung der HiLoad™ 16/60 Superdex 200 Säule mit Proteinen bekannter Größe. FPLC Durchläufe wurden ausgeführt mit einem Probevolumen von 2 mL, einer Flußrate von 1 mL/min und einer 1 mL Elutionsfraktionierung. **(B)** Abbildung eines repräsentativen FPLC Aufreinigungs-chromatogramms von 6-8 mg Gesamtprotein der *P35S:myc:AtPDX* Pflanzen. **(C)** Western Blot Analyse mit α -myc Antikörpern von Pflanzenprotein der *myc:AtPDX* exprimierenden Linien. Die Abbildung zeigt die Detektion von myc:AtPDX Proteinen in den einzelnen Elutionsfraktionen der Größenausschlußchromatographie. In der Abbildung ist das zu den Elutionsfraktionen korrespondierende Retentionsvolumen direkt darüber gezeigt. Die schwarzen Sterne markieren Retentionsvolumina, in denen myc:AtPDX Proteine gehäuft eluierten (★, von links nach rechts). Unspezifische Banden, welche nicht die Größe der AtPDX Proteine repräsentieren, sind mit schwarzen Pfeilen markiert.

Proteine auch in Komplexen von ca.100 kDa Größe zu finden sind. Interessanterweise konnte keines der myc:AtPDX1 oder myc:AtPDX2 Proteine in Elutionsfraktionen über 75 mL bzw. unter 100 kDa detektiert werden.

Tabelle 3.1: Aufstellung der molekularen Komplexgrößen, in denen myc:AtPDX Proteine gehäuft auftraten (*; Abbildung 3.10 C); Berechnung siehe Abschnitt 2.8.4.

Retentionsvolumen in mL	Berechnete molekulare Größe der Proteinkomplexe in kDa
72	100.94
52	400.78
43	745.02

Durch die Methode der Größenausschlußchromatographie konnte bestätigt werden, daß die AtPDX Proteine in hochmolekularen Komplexen in der Zelle vorliegen. In einem alternativen Ansatz über Blue Native Page (BNP) wurde im Anschluß außerdem untersucht, inwieweit AtPDX1 Proteine in der Lage sind mit sich selbst bzw. mit einem anderen AtPDX1 Protein hochmolekulare Komplexe auszubilden. Für die Analyse wurde aus *E. coli* exprimiertes (siehe 2.7.2.2), über Affinitätschromatographie spezifisch aufgereinigtes und anschließend entsalztes AtPDX:HIS Fusionsprotein (siehe Aufreinigung 2.7.9) über ein Blue Native Gradientengel nativ aufgetrennt (Abbildung 3.11 A, B). Dieser Ansatz hat den Vorteil, daß Proteinkomplexe dank der nativen Auftrennung erhalten bleiben und diese im Gel durch distinkte Banden in ihrer Größe relativ gut analysierbar sind.

Nach der Auftrennung der AtPDX1.1:HIS und AtPDX1.3:HIS Proteine über BNP konnte je eine Proteinbande auf der Höhe des als Markerprotein verwendeten Ferritins (440 kDa) beobachtet werden (Abbildung 3.11 A). Bei den aufgetrennten AtPDX1.2:HIS Proteinen waren hingegen zwei Proteinbanden zu erkennen. Eine stärkere AtPDX1.2:HIS Proteinbande, die etwas über der Höhe von Ferritin lief und eine schwächere Bande, die sich auf der Höhe des Ferritin Dimers (880 kDa) befand. Es konnte jedoch bei keinem AtPDX1:HIS Fusionsprotein Proteinbanden unterhalb der Größe von Ferritin identifiziert werden.

In einem zweiten BNP Ansatz wurde untersucht, ob es möglich ist, einen Mischkomplex aus AtPDX1.2 und AtPDX1.3 Proteinen nachzuweisen. Dazu wurden in *E. coli* exprimierte, separat aufgereinigte AtPDX1.2:HIS und AtPDX1.3:HIS Fusionsproteine in drei verschiedenen Mischverhältnissen vermengt (1:2; 1:1; 2:1) und für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die drei Proteinmischungen auf ein BNP aufgetragen und neben den AtPDX1.2:HIS bzw. AtPDX1.3:HIS Einzelproteinen nativ aufgetrennt (Abbildung 3.12).

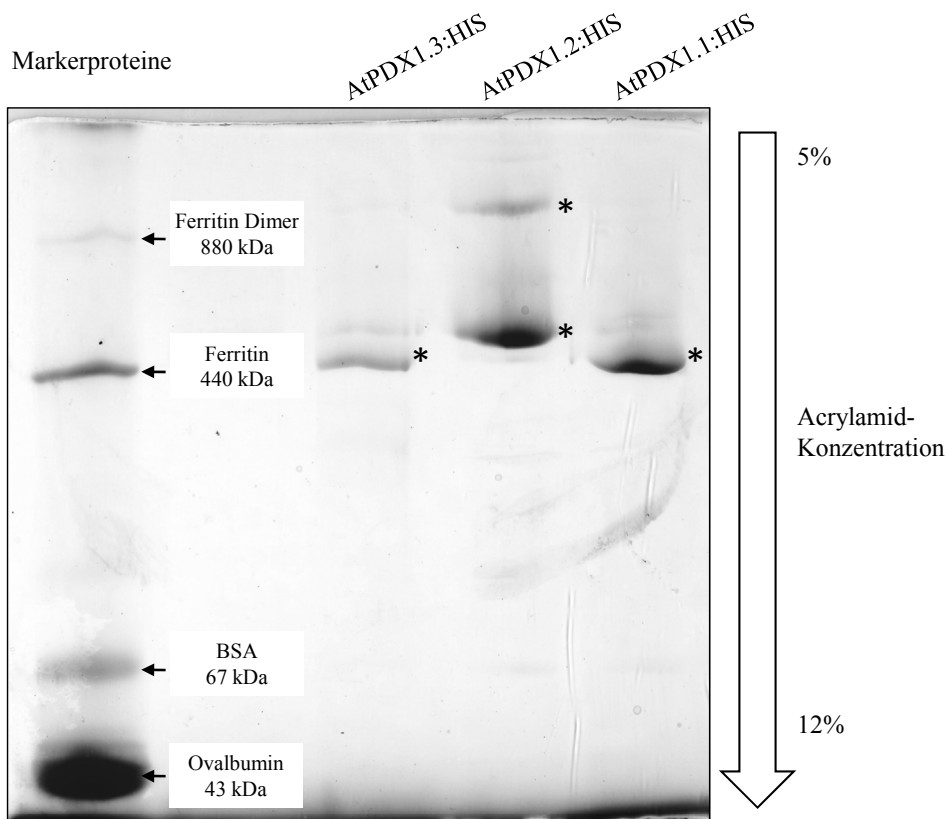
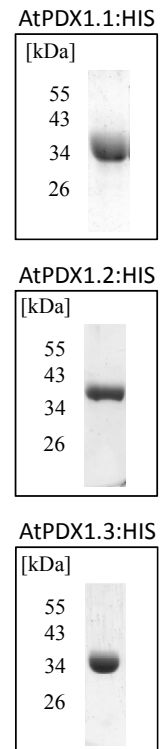
A Blue Native Page**B** Input

Abbildung 3.11: Komplexbildungsanalyse mittels Blue Native Page (A) von in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten AtPDX1:HIS Proteinen. Das Blue Native Page Gradientengel weist einen Acrylamid-Konzentrationsgradienten von 5-12 % auf. Proteinspezifische AtPDX1 Banden sind in der Abbildung mit Sternen markiert. Als Größenstandard sind die Markerproteine Ferritin, BSA und Ovalbumin aufgetragen worden. (B) Coomassie gefärbte SDS-Gele zeigen die Proteineinsatzkontrolle (Input) für die BNP.

Die Analyse zeigte, daß die separat aufgetrennten AtPDX1.2:HIS und AtPDX1.3:HIS Proteine ebenfalls Proteinbanden auf vergleichbarer Höhe wie im ersten BNP Ansatz aufwiesen (Abbildung 3.12). In den drei Mischansätzen der beiden Proteine konnten jedoch nur die bereits identifizierten AtPDX1.2:HIS und AtPDX1.3:HIS spezifischen Banden gesehen werden. Es wurden darüber hinaus keine zusätzlichen neuen Banden identifiziert, die auf einen Mischkomplex der beiden Proteine schließen ließen.

Auf eine weitere Untersuchung der Proteinbanden in Form einer 2D SDS-Gelelektrophorese wurde verzichtet, da bereits aufgereinigte AtPDX1:HIS Proteine in die BNP Analyse eingesetzt worden sind, welche im Kontrollgel keine zusätzlichen Proteine anderer Größe aufzeigten (Abbildung 3.12 B).

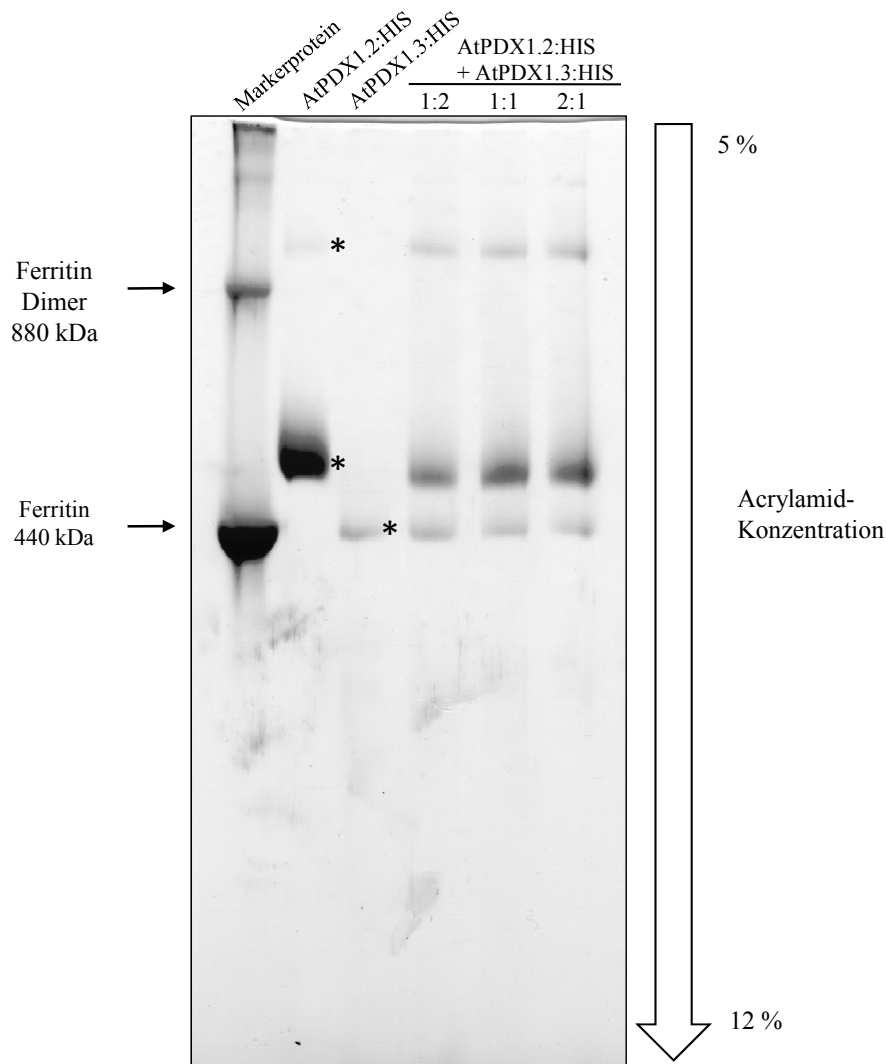


Abbildung 3.12: Komplexbildungsanalyse von AtPDX1.2 und AtPDX1.3 Mischkomplexen mittels Blue Native Page. In dieser Analyse wurde versucht, ein Mischkomplex aus den beiden AtPDX1.2:HIS und AtPDX1.3:HIS Proteinen nachzuweisen. Hierfür wurden separat aufgereinigte HIS Proteine in drei verschiedenen Mischungsverhältnissen vorinkubiert und anschließend im BNP-Gradientengel (5-12 % Acrylamid) nativ aufgetrennt. Im direkten Vergleich sind neben den Mischansätzen die beiden eingesetzten Proteine einzeln im Gel aufgetrennt worden. AtPDX1.2:HIS und ATPDX1.3:HIS Banden sind in den Einzelansätzen mit Sternen markiert. Als Größenstandard wurde Ferritin aufgetragen.

3.3 Charakterisierung von *Ginkgo biloba* PDX1

In einem Kooperationsprojekt mit Prof. Eckhard Leistner und Dr. Christel Drewke (Institut für Pharmazeutische Biologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, Deutschland) wurde ein *G. biloba* PDX1 (*GbPDX1*) Gen analysiert. Im Rahmen der Doktorarbeit von Andreas Genau wurde *GbPDX1* kloniert und sequenziert und uns für weitere Analysen der Expression, der Aktivität und der Interaktion zur Verfügung gestellt.

3.3.1 *Ginkgo biloba* PDX1 Expressionsanalyse

Die gewebespezifische Expression des *GbPDX1* Genes wurde durch einen Northern Blot analysiert. Zu diesem Zweck wurde aus vier verschiedenen Geweben von *G. biloba* gesamt RNA aufgereinigt (siehe 2.6.3.4) und diese im Anschluß mit Hilfe eines denaturierenden Gels aufgetrennt (siehe 2.6.9). Nach einem Northern Blot (siehe 2.6.10) erfolgte die Detektion der *GbPDX1* mRNA durch eine *GbPDX1* DNA Sonde (siehe 2.6.11).

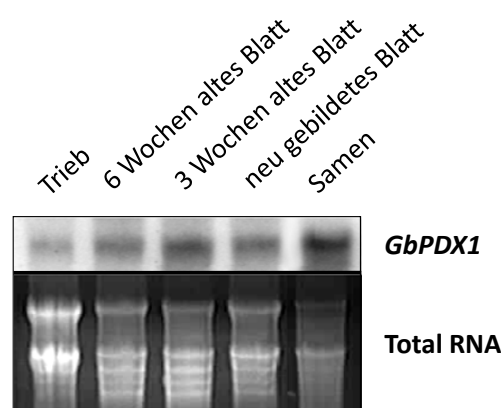


Abbildung 3.13: Expressionsanalyse von *G. biloba* PDX1 (*GbPDX1*) in verschiedenen Geweben von *G. biloba* mittels Northern Blot. In der Abbildung oben gezeigt, ist detektiertes *GbPDX1* Transkript, darunter die aufgetragene gesamt RNA (Total RNA).

Das Ergebnis der Expressionsanalyse zeigte, daß eine schwache Expression von *GbPDX1* im Trieb vorlag, während eine starke Expression in 6 Wochen und 3 Wochen alten Blättern sowie in sich neu entwickelnden Blättern zu sehen war (Abbildung 3.13). Die stärkste Expression von *GbPDX1* wurde im Samengewebe detektiert.

3.3.2 Funktionalität von GbPDX1; Komplementation der *rsr4-1* Mutante

Im folgenden Teil der Arbeit wurde anhand eines Komplementationsansatzes untersucht, ob das GbPDX1 Proteins aktiv in der Vitamin B6 Biosynthese ist. Hierbei wurde die *rsr4-1/pdx1.3^{G545}* Mutante verwendet (siehe 1.3.3), die einen etwa 55 % geringeren Vitamin B6 Gehalt gegenüber dem Wildtyp aufweist und einen kleineren Wuchs mit leicht gelben Blättern sowie Defekte im Wurzelwachstum zeigt (Wagner et al. 2006). Es sollte dabei abgeklärt werden, ob eine Überexpression des GbPDX1 Proteins einen erhöhten Vitamin B6 Gehalt zur Folge hat und eine Reversion des *rsr4-1* Phänotyp zu sehen ist. Dazu wurde das *GbPDX1* Gen unter der Kontrolle des *P35S* Promotors (Konstrukt siehe 2.6.12.3 VI) stabil in *rsr4-1* eingebracht (*P35S:GbPDX1/rsr4-1*).

Insgesamt konnten unter Selektionsbedingungen in der T1 Generation 15 *P35S:GbPDX1/rsr4-1* Transformanten identifiziert werden. Vier der *P35S:GbPDX1/rsr4-1* Pflanzen entwickelten sich normal. Die beiden Linien *P35S:GbPDX1#6/rsr4-1* und *P35S:GbPDX1#7/rsr4-1* wurden detailliert analysiert.

Phänotypisch zeigten die beiden Linien eine Wildtyp ähnliche Rosettengröße und keine *rsr4-1* typische hellgrüne, leicht gelbe Färbung der Blätter (Abbildung 3.14 B). Eine Untersuchung der Expression mittels semiquantitativer RT-PCR (siehe 2.6.5) bestätigte die Expression von *GbPDX1* in den Transformanten (Abbildung 3.14 A). Die Analyse des endogenen *AtPDX1.3* Transkriptes wies in den transgenen Linien #6 und #7 keine Veränderung zum Wildtyp C24 bzw. zu der *rsr4-1* Mutante auf.

Die beiden Linien *P35S:GbPDX1#6/rsr4-1* und *P35S:GbPDX1#7/rsr4-1* zeigten bezüglich der Untersuchungen des Primärwurzelswachstums (siehe 2.9.4) ebenfalls eine normale, Wildtyp ähnliche Entwicklung der Wurzel (Abbildung 3.14 C). Die Linie *P35S:GbPDX1#7/rsr4-1* wies sogar im Mittel eine leicht längere Primärwurzel als der Wildtyp C24 auf. Die *P35S:GbPDX1#7/rsr4-1* Pflanzen zeigten im Durchschnitt auch das gleiche Frischgewicht wie die C24 Pflanzen (Abbildung 3.14 D).

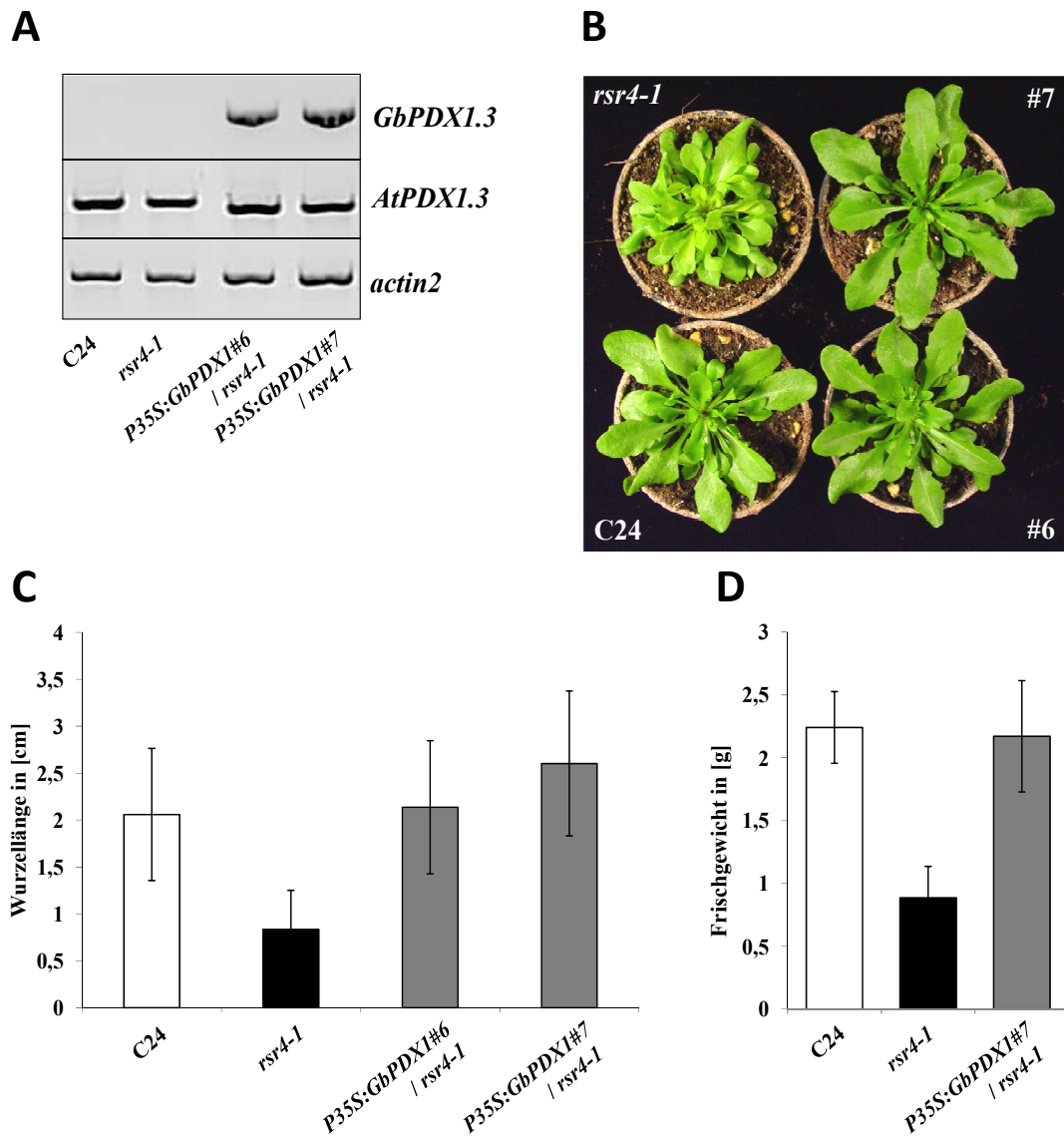


Abbildung 3.14: Analyse der GbPDX1 Aktivität durch Komplementationsstudien in der *A. thaliana* *rsr4-1* Mutante (C24 Hintergrund). Die Komplementation erfolgte mit eingebrachtem *P35S:GbPDX1* Expressionskonstrukt. (A) Expressionsanalyse von transgenem *GbPDX1* und endogenem *AtPDX1.3* mittels semiquantitativer RT-PCR in den komplementierten *rsr4-1* Mutanten (*P35S:GbPDX1/rsr4-1*) im Vergleich zum Wildtyp C24 und der Mutante. Als RNA Einsatzkontrolle wurde eine RT-PCR auf das Aktintranskript (*actin2*) verwendet. (B) Phänotyp von *rsr4-1* im Vergleich zum Wildtyp C24 und der beiden komplementierten Linien *P35S:GbPDX1#6/rsr4-1*; *P35S:GbPDX1#7/rsr4-1* unter Gewächshausbedingungen (Langtag) sowie Analyse der (C) Wurzellänge (*in vitro* Kultur, Langtag) sowie des (D) Frischgewichtes (Gewächshausbedingungen, Langtag). (D) ohne *P35S:GbPDX1#6/rsr4-1*.

Die phänotypische Analyse der Komplementationlinien wurde durch eine Vitamin B6 Messung vervollständigt. Die Messung der *rsr4-1* Pflanzen wies einen verringerten Vitamin B6 Gehalt gegenüber Wildtyp C24 auf. Der Pyridoxalgehalt lag hier bei ca. 27 % und der Pyridoxamingehalt bei ca. 43 % bezogen auf den Gehalt vom Wildtyp. Pyridoxin war ebenfalls reduziert und konnte in der *rsr4-1* Mutante nur noch in Spuren, nahe dem Detektionslimit, nachgewiesen werden. Die Messung der Linie *P35S:GbPDX1#7/rsr4-1* zeigte im Vergleich zur *rsr4-1* Mutante hingegen erhöhte Vitamin B6 Werte, die mit 52 % (Pyridoxal) und 77 % (Pyridoxamin) wieder an das Wildtypniveau angeglichen, jedoch nicht vollständig komplementiert waren. Die Messung des Pyridoxingehaltes der Komplementationslinie zeigte keine Erhöhung an. Addiert man die Einzelwerte der Vitamin B6 Derivatgehalte, läßt sich sagen, daß der Vitamin B6 Gehalt in der Linie *P35S:GbPDX1#7/rsr4-1* deutlich über dem der *rsr4-1* Mutante, jedoch noch unterhalb des Wildtypniveaus von C24 lag.

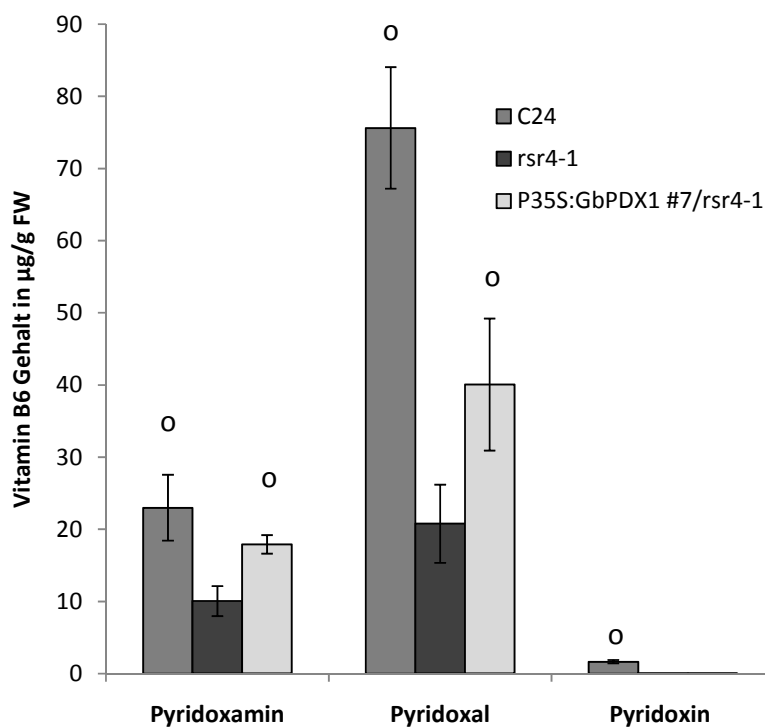


Abbildung 3.15: Analyse des Vitamin B6 Gehaltes von C24, *rsr4-1* und der komplementierten Linie *P35S:GbPDX1#7/rsr4-1*, welche unter Gewächshausbedingungen (Langtag) angezogen wurden. Gemessen wurden die Einzelgehalte von Pyridoxamin, Pyridoxal und Pyridoxin. Signifikante Unterschiede zur Mutante *rsr4-1* (Ttest) $P < 0,05$ sind als (o) angegeben.

3.3.3 GbPDX1 Interaktionsanalyse

Mit dem Y2H Interaktionssystem (siehe 2.8.2) wurde untersucht, ob GbPDX1 eine potentielle Interaktionsfähigkeit für andere PDX1 und PDX2 Proteine besitzt. In der Untersuchung zeigte das GbPDX1 Protein sowohl Selbstinteraktion, als auch die Fähigkeit, mit AtPDX1 sowie AtPDX2 Proteinen zu interagieren (Abbildung 3.16 A). Dabei zeigte das Protein keine Autoaktivität in dem verwendeten Y2H System. Um die gewonnenen Daten zu bestätigen, wurde ein *in vitro* Pulldown (siehe 2.8.1) mit in *E. coli* exprimiertem und aufgereinigtem GST:GbPDX1 Fusionsprotein (siehe 2.7.2.1/2.7.2.3) gegen in Pflanzen exprimierten myc:AtPDX1 und myc:AtPDX2 Proteinen durchgeführt. Als Kontrolle für unspezifische Interaktionen wurde GST in den Pulldownansätzen in erhöhter Konzentration eingesetzt (Abbildung 3.16 C). Der Interaktionstest zeigte, daß das GST:GbPDX1 Fusionsprotein, jedoch nicht GST alleine die getesteten AtPDX Proteine copräzipitieren kann (Abbildung 3.16 B). Zusammenfassend deuten diese Studien auf ein vergleichbares Interaktionsmuster von GbPDX1 hin, wie sie zuvor schon bei den AtPDX Proteinen gezeigt wurden.

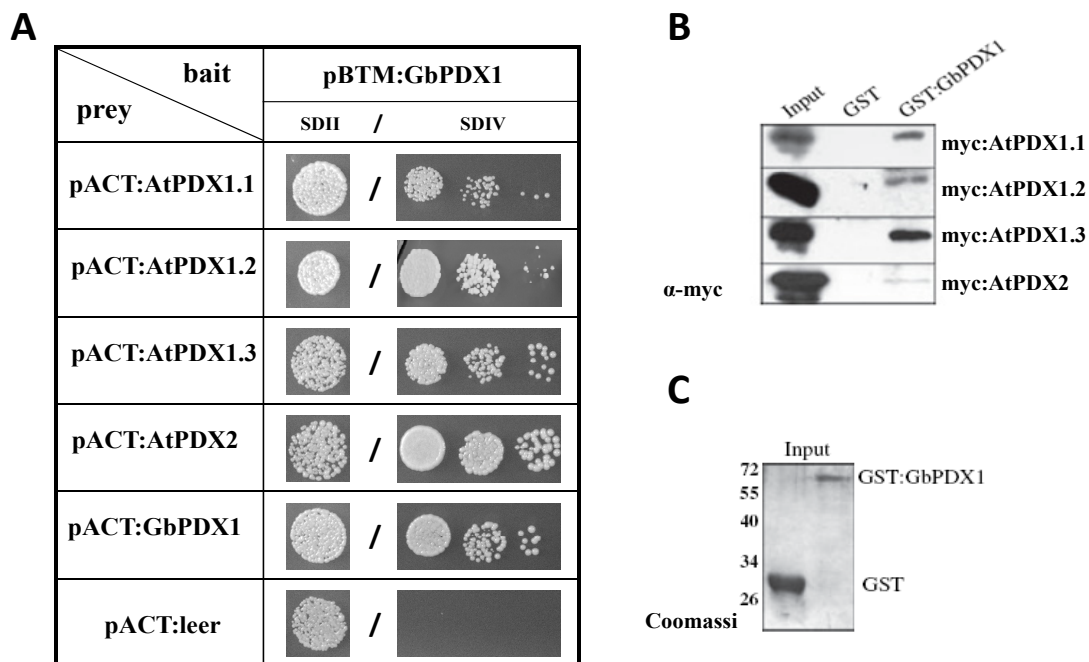


Abbildung 3.16: Interaktionsanalyse von GbPDX1 mit den AtPDX1 und AtPDX2 Proteinen im Y2H System (**A**). Aus den SDII Ansätzen wurde je eine gewachsene Kolonie in sterilem Wasser gelöst und 20 μ L einer 1:200, 1:2000, 1:20.000 Verdünnung auf das SDIV Selektionsmedium aufgetragen. (**B**) Pulldown Interaktionstest mit GST:GbPDX1 Fusionsprotein und *in planta* exprimiertem myc:AtPDX Protein. Pulldownansätze wurden per Western Blot analysiert und copräzipitiertes myc:AtPDX Protein mit α -myc Antikörpern detektiert. Der Einsatz (Input) repräsentiert das Vorhandensein der myc:AtPDX Proteine in 30 μ g Gesamtpflanzenprotein. (**C**) Coomassie gefärbtes Kontrollgel zeigt die im Pulldown (**B**) eingesetzte Menge von aufgereinigtem GST:GbPDX1 und GST Protein.

3.4 Funktionale Charakterisierung des *Arabidopsis thaliana* PDX1.2 Proteins

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es ein besseres Verständnis über die biologische Funktion von AtPDX1.2 zu gewinnen.

3.4.1 Spezifische Induktion der Expression von *AtPDX1.2* bei erhöhten Temperaturen

In der vorangegangenen Diplomarbeit wurde durch *AtPDX1.2 Promotor:GUS (PPDX1.2:GUS)* Studien bereits gezeigt, daß eine durch Hitze induzierbare *AtPDX1.2* Expression vorliegt (Leuendorf 2006). Hierbei wurden *PPDX1.2:GUS* Pflanzen für drei Stunden einem Hitzeschock von 39 °C ausgesetzt und nachfolgend die *GUS* Expression durch einen MUG Assay analysiert. Die behandelten Pflanzen zeigten eine dreifache Erhöhung der *GUS* Aktivität, im Vergleich zu nicht behandelten Pflanzen. In dieser Arbeit wurde an diese Untersuchungen angeknüpft und eine genaue Analyse der *AtPDX1.2* Gen- und Proteinexpression nach Hitzeschockgabe durchgeführt. *A. thaliana* Col0 Pflanzen wurden hierfür einem Hitzeschock von 45 °C für 15-90 Minuten ausgesetzt, aus den genommenen Proben die RNA aufgereinigt (siehe 2.6.3.3) und diese über einen Northern Blot (siehe 2.6.9/2.6.10) mit radioaktiv markierten Sonden gegen *AtPDX1.1* und *AtPDX1.2* analysiert. Das Ergebnis des Northern Blots zeigte eine temperaturabhängige Induktion von *AtPDX1.2*. Bereits nach 15 Minuten Hitzeschockbehandlung (Abbildung 3.17 15') konnte im Vergleich

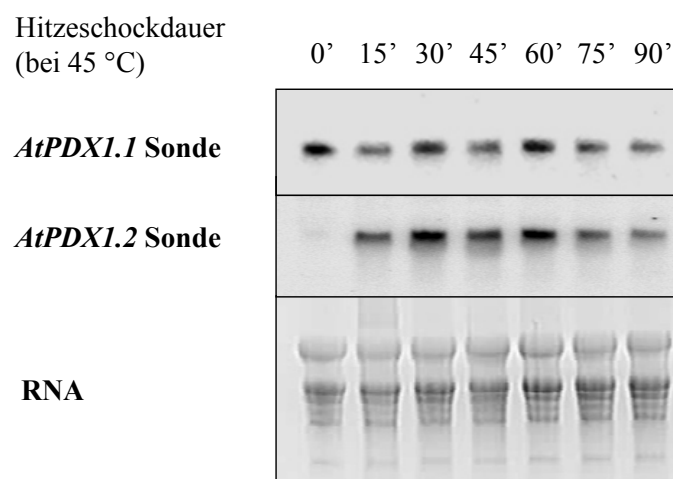


Abbildung 3.17: Expressionsanalyse von *AtPDX1.1* und *AtPDX1.2* in *Arabidopsis* Col0 Pflanzen unter Hitzeschockbedingungen. Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen bei 22 °C angezogen und einem Hitzeschock bei 45 °C für 90 Minuten ausgesetzt. RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten aus Pflanzenproben extrahiert und über eine Northern Blot Analyse mit spezifischen Sonden auf das *AtPDX1.1* und *AtPDX1.2* Transkript untersucht.

zur Grundexpression (Abbildung 3.17 0'), eine deutlich angestiegenes Transkriptlevel beobachtet werden. Dieses blieb bis zu 60 Minuten unter Hitzeschockbedingungen gleichbleibend stark (Abbildung 3.17 30'-60'). Die Expression nahm erst nach der Hitzeschockdauer von 75-90 Minuten leicht ab (Abbildung 3.17 75'-90'). Im direkten Vergleich zu *AtPDX1.2* zeigte sich dagegen, daß die Expression von *AtPDX1.1* nicht durch einen Hitzeschock verändert wird. Das Expressionslevel unter Hitzeschock war unverändert im Vergleich zur Grundexpression und nahm über die Zeit weder zu noch ab.

Im einem zweiten Ansatz wurde die temperaturabhängige Expression auf der Proteinebene untersucht. Hierbei sollte abgeklärt werden, inwieweit hier ebenfalls eine Induktion der *AtPDX1.2* Protein Expression unter hohen Temperaturbedingungen zu sehen ist und ob das erhöhte Proteinlevel dann über längere Zeit stabil bleibt oder schnell wieder absinkt. Da für die Untersuchung des endogenen *AtPDX1.2* Proteins kein funktionsfähiger α -*AtPDX1.2* Antikörper zur Verfügung stand, wurde ein myc:*AtPDX1.2* Fusionsprotein unter der Kontrolle des endogenen *AtPDX1.2* Promotors in *A. thaliana* Col0 Pflanzen eingebracht (*PPDX1.2:myc:AtPDX1.2*; siehe 2.6.12.3 III). *PPDX1.2:myc:AtPDX1.2* Pflanzen wurden einem Hitzeschock bei 39 °C für 60 Minuten ausgesetzt (siehe 2.9.5). Nach der Behandlung wurden die Pflanzen unter normalen Wachstumsbedingungen bei einer Temperatur von 22 °C weiter kultiviert und zu angegebener Zeit Proben genommen. Die Proben wurden nachfolgend per Western Blot und Immunodetektion mit einem α -myc Antikörper analysiert. Der Versuch zeigte, daß durch einen 60 Minuten Hitzeschock die myc:*AtPDX1.2* Proteinexpression induziert werden konnte. Im Vergleich zur geringen Grundexpression konnte man eine deutliche Proteinzunahme von myc:*AtPDX1.2* detektieren (Abbildung 3.18 0', 60'). Das erhöhte myc:*AtPDX1.2* Proteinlevel war auch nach weiteren zwei Stunden in 22 °C unverändert hoch (Abbildung 3.18 80'-180').

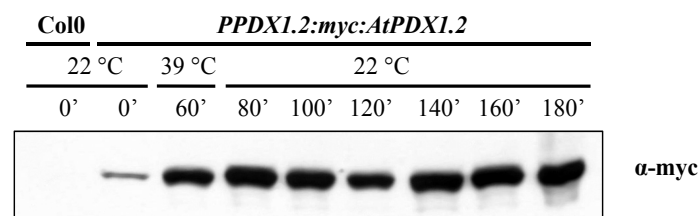


Abbildung 3.18: Expressionsanalyse von myc:*AtPDX1.2* Protein unter Hitzeschockbedingungen in *PPDX1.2:myc:AtPDX1.2* Pflanzen. Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen bei 22 °C angezogen, für 60 Minuten (60') einem 39 °C Hitzeschock ausgesetzt und im direkten Anschluß wieder zurück in 22 °C gestellt. Probenahme vor dem Hitzeschock (0'), nach 60 Minuten 39 °C Hitzeschock (60') und alle 20 Minuten in 22 °C Bedingungen (80'-180'). Die Detektion des myc:*AtPDX1.2* Proteins erfolgte nach dem Western Blot mit einem anti-myc Antikörper.

3.4.2 Charakterisierung einer *AtPDX1.2* Nullmutante

Bisher gibt es keine bekannten Studien, die die Folgen des Verlustes des *AtPDX1.2* Gens untersuchen. Eine solche Analyse könnte aber sehr hilfreiche Daten für das Verständnis der Funktion von *AtPDX1.2* liefern, da entsprechende Mutanten eventuell physiologische oder Entwicklungsdefekte aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher drei Insertionsmutanten ausgewählt, deren annotierte Insertionsorte im *AtPDX1.2* Exonbereich lagen und einen möglichen *knock out* Effekt des Gens verursachen könnten (Abbildung 3.19 und Tabelle 2.2). Allerdings konnte nur die SALK Linie (SALK_148199.19.20.x) sowie die John Innes Gene Trap Linie (GT_5.7122) bearbeitet werden, da die GABI Kat Line (GABI_468B06/-019015) über den gesamten Zeitraum der Doktorarbeit nicht verfügbar war.

Bei der Analyse der SALK sowie die John Innes Gene Trap Linie zeigte sich, daß die *AtPDX1.2* Transkription nicht beeinflusst wurde. Dies lag daran, daß die T-DNA der SALK Linie direkt vor dem Stopcodon inseriert ist und aufgrund eines alternativen Stopcodons im Leseraster zu einem um 9 Aminosäuren leicht vergrößerten *AtPDX1.2* Protein führt (Sequenzierung im Anhang Abbildung 12.2). Bei der John Innes Gene Trap Linie konnte keine Insertion im *AtPDX1.2* Gen nachgewiesen werden.

Desweiteren wurde ein *AtPDX1.2* Antisense Ansatz gewählt, um auf eine andere Weise eine *loss-of-function* Analyse durchzuführen. Hierfür wurde ein 445 bp großes *AtPDX1.2* Fragment (Abbildung 3.19) in antisense Orientierung unter der Kontrolle des *P35S* Promotors in *A. thaliana* Col0 Pflanzen eingebracht (als *P35S:AtPDX1.2 Antisense* Pflanzen benannt).

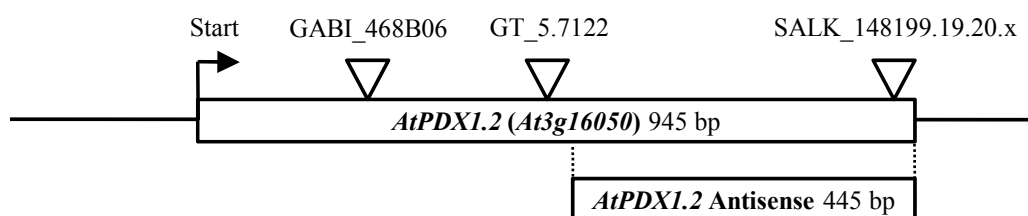


Abbildung 3.19: Genomische Karte des DNA Bereiches von *AtPDX1.2* (*At3g16050*). Dargestellt ist der transkribierte Bereich von *AtPDX1.2* (Exonbereich umrahmt). In die Karte sind die veröffentlichten Insertionsorte der GABI Kat Linie (GABI_468B06/-019015), der SALK Linie (SALK_148199.19.20.x) und der John Innes Gene Trap Linie (GT_5.7122) eingezeichnet. Der untere Balken markiert den Genbereich, welcher für ein *AtPDX1.2* Antisense Konstrukt verwendet wurde.

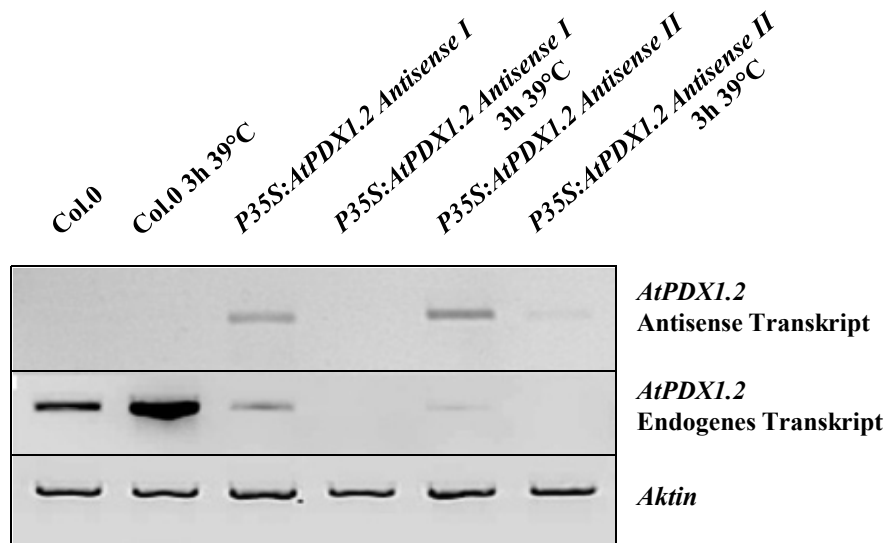


Abbildung 3.20: Test des Antisenseeffektes in zwei *P35S:AtPDX1.2 Antisense* Pflanzenlinien der T1 Generation durch semiquantitative RT-PCR auf Blattgewebe. Expressionsanalyse des *AtPDX1.2 Antisense* Transkriptes und des endogenen *AtPDX1.2* Transkriptes vor und nach einem gegebenem Hitzeschock (3 Stunden 39 °C). Als RNA Einsatz Kontrolle wurde eine RT-PCR auf Aktin genutzt.

15 *P35S:AtPDX1.2 Antisense* Primärtransformanten wurden in der T1 Generation auf die effektive Herabregulation der *AtPDX1.2* Transkriptmenge hin überprüft. Das *AtPDX1.2* Gen wird besonders stark unter erhöhten Temperaturbedingungen transkribiert, deshalb wurde für die Untersuchung des Antisense Effektes bei den Pflanzen Hitzeschockbedingungen gewählt. Da nicht eindeutig sicher war, ob sich der Antisense Effekt möglicherweise letal auf die durch Hitze geschockten Pflanzen auswirken würde, eine Etablierung einer stabilen *P35S:AtPDX1.2 Antisense* Pflanzenlinie aber erwünscht war, wurden nur einzelne Blätter den unterschiedlichen Temperaturbedingungen ausgesetzt. Hierfür wurden einzelne Blätter abgeschnitten, mit der Schnittfläche in ATS Festmedium gesteckt und unter Normalbedingungen bei 22 °C bzw. bei erhöhten Temperaturbedingungen von 39 °C für 3 Stunden kultiviert (siehe 2.9.5). Im Anschluß wurde die RNA extrahiert und es erfolgte eine Analyse der *AtPDX1.2* Expression durch eine semiquantitative RT-PCR. In *A. thaliana* Col0 Pflanzen konnte die Expression von *AtPDX1.2* unter normalen Wachstumsbedingungen nachgewiesen werden (Abbildung 3.20). Darüber hinaus wurde in eine erhöhte Expression von *AtPDX1.2* nach Hitzeschockgabe detektiert. Dagegen zeigten alle *P35S:AtPDX1.2 Antisense* Pflanzen einen effektiven Antisenseeffekt, mit einer nur sehr schwach nachweisbaren *AtPDX1.2* Expression unter normalen Wachstumsbedingungen

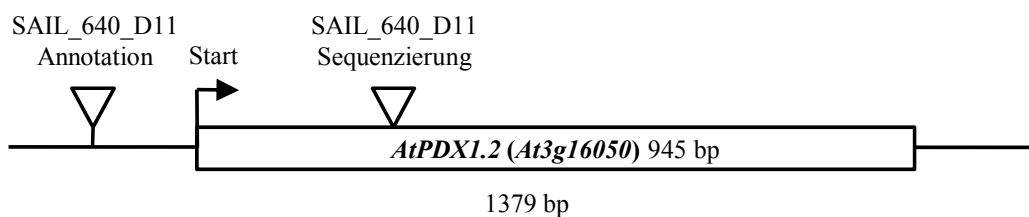


Abbildung 3.21: Genomische Karte des DNA-Bereiches von *AtPDX1.2* (*At3g16050*). Dargestellt ist der transkribierte Bereich von *AtPDX1.2*. In die Karte ist der laut Datenbank (*AtEnsembl NASC*) publizierte (Annotation) und der in dieser Arbeit ermittelte (Sequenzierung) T-DNA Insertionsort der SAIL_640_D11 Linie eingezeichnet.

(in Abbildung 3.20 an zwei Linien gezeigt). Das *AtPDX1.2 Antisense* Transkript konnte wie erwartet in den transgenen Pflanzen nachgewiesen werden. Von den *P35S:AtPDX1.2 Antisense* Linien wurden 5 Pflanzen geselbstet und durch erneute Analysen auf die *AtPDX1.2 Antisense* Expression und auf einen Antisenseeffekt hin untersucht. Es zeigte sich, daß in der T2 Generation kein Antisenseeffekt mehr nachzuweisen war (Anhang Abbildung 12.1).

Alternativ wurde daraufhin nach anderen Insertionslinien gesucht, deren Insertion nahe dem *AtPDX1.2* Startcodon lokalisiert war. Hier bot sich eine SAIL Insertionslinie (SAIL_640_D11; siehe Tabelle 2.2) an, welche laut Datenbank (www.arabidopsis.org [TAIR]; <http://atensembl.arabidopsis.info> [*AtEnsembl NASC*]) im *AtPDX1.2* 5'UTR Bereich, 104 bp oberhalb des *AtPDX1.2* Startcodons, inserierte (Abbildung 3.21).

Die Linie wurde mittels einer PCR auf genomischer DNA mit insertionsspezifischen Primern analysiert (siehe Tabelle 2.17), wodurch eine SAIL Insertion nachgewiesen werden konnte. Eine nachfolgende Sequenzierung des *AtPDX1.2* Promotor-Exonbereiches lies allerdings erkennen, daß die T-DNA 243 bp unterhalb vom *AtPDX1.2* Startcodon inserierte und nicht wie laut Datenbanken vorgegeben, im 5'UTR Bereich lag (Abbildung 3.21, Anhang Abbildung 12.3). Die SAIL Pflanzenlinie wurde im Weiteren als *atpdx1.2-1* Mutante bezeichnet und

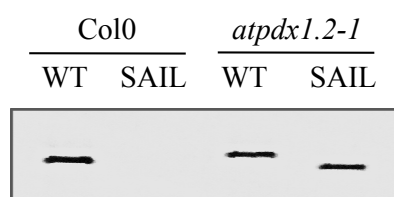


Abbildung 3.22: Genotypische Analyse von *atpdx1.2-1* und Col0 Pflanzen durch PCR auf genomische DNA. Analyse des *AtPDX1.2* Wildtyps (WT) mit genspezifischen Primern und Identifizierung der T-DNA Insertion (SAIL) mit insertionsspezifischen Primern (Tabelle 2.17)

zweimal mit dem Wildtyp zurückgekreuzt. Nach der letzten Rückkreuzung (Bezeichnung: Generation BC1) wurde die Linie im Gewächshaus geselbstet, um in der folgenden Generation eine homozygote Insertionslinie zu erhalten. Die genotypische Untersuchung der BC2 Generation erfolgte durch PCR mit geeigneten *AtPDX1.2* genspezifischen und SAIL T-DNA insertionsspezifischen Primern (Abbildung 3.22 und Tabelle 2.17).

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der genotypische Untersuchung der SAIL *atpdx1.2-1* BC2 Generation durch PCR mit *AtPDX1.2* genspezifischen Primern sowie insertionsspezifischen Primern für den Nachweis der SAIL Insertion im *AtPDX1.2* Gen. Heterozygote *atpdx1.2-1* Pflanzen sind als *atpdx1.2-1 +/-*, sowie homozygote Pflanzen als *atpdx1.2-1 +/+* bezeichnet. Pflanzen, bei denen keine Insertion ermittelt werden konnte, sind als *atpdx1.2-1 -/-* bezeichnet und entsprechen WT Col0.

	<i>atpdx1.2-1 -/-</i>	<i>atpdx1.2-1 +/-</i>	<i>atpdx1.2-1 +/+</i>	Anzahl der untersuchten Pflanzen
BC2	34	43	0	77
Verhältnis	1	1,26	0	-

Durch die genotypische Untersuchung konnten in der BC2 Generation keine homozygoten *atpdx1.2-1* Pflanzen identifiziert werden (Tabelle 3.2). Vielmehr wurde ein Verhältnis von heterozygoten *atpdx1.2-1* Pflanzen (*atpdx1.2-1 +/-*) zu Wildtyp Pflanzen von 1,26 zu 1 ermittelt. Dieses Verhältnis deutete auf einen Defekt in der embryonalen bzw. der gametischen Entwicklung.

Um aufzuklären, ob die *atpdx1.2-1* Mutante in der Gametenentwicklung beeinträchtigt ist, wurden Kreuzungen zwischen *atpdx1.2-1 +/-* Mutanten mit dem Wildtyp Col0 durchgeführt. Zur Kontrolle wurden Kreuzungen zwischen *atpdx1.2-1 +/-* Mutanten, eine Selbstung einer *atpdx1.2-1 +/-* Mutante und eine Kreuzung zwischen Col0 Wildtypen durchgeführt.

Da die SAIL T-DNA Insertionskassette eine Phosphinotricin (PPT) Resistenz vermittelt, wurden die gewonnenen Samen PPT-haltigem Medium *in vitro* kultiviert. Die SAIL Insertionskassette tragenden Pflanzen überlebten die Selektion. In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse der Kreuzungen aufgelistet. Es zeigte sich, daß die Kreuzungen zweier *atpdx1.2-1 +/-* Pflanzen bzw. die Selbstung einer *atpdx1.2-1 +/-* Pflanze, ein sehr ähnliches Spaltungsverhältnis von SAIL Insertion tragenden Nachkommen zu nicht Insertion tragenden Nachkommen aufwiesen. Schaut man sich nun die Analyse der beiden reziproken Kreuzungen von *atpdx1.2-1 +/-* Pflanzen mit dem Wildtyp Col0 an, so war hier ein Spaltungsverhältnis von 1 zu 0,73 bzw. 0,71 von Wildtyp Col0 zu *atpdx1.2-1* Pflanzen zu beobachten (Tabelle 3.3), was einen gametischen Defekt in den Mutanten nicht ausschließt. Die Testkreuzungen der beiden Wildtypen brachte keine PPT resistenten Nachkommen hervor.

Tabelle 3.3: Analyse der F1 Generation von Kreuzungen zwischen heterozygoten *atpdx1.2-1* Mutanten (*atpdx1.2-1 +/-*) mit dem Wildtyp Col0 (WT Col0). Zur Kontrolle wurden Kreuzungen zwischen *atpdx1.2-1 +/-* Mutanten, die Selbstung einer *atpdx1.2-1 +/-* Mutante und eine Kreuzung zwischen Col0 Wildtypen durchgeführt. Identifikation von SAIL insertionstragenden Pflanzen durch Phosphinothricin (PPT) Selektion. Dargestellt ist das Verhältnis von sterbenden, keine SAIL Insertion tragenden, und PPT resistenten, eine SAIL Insertion tragenden, Pflanzen. Die Kontrollkreuzung von Col0 gegen Col0 Pflanzen wurde auf PPT Selektionsmedium und ATS Medium ausgelegt.

Kreuzung		PPT Selektion		Anzahl der untersuchten F1 Pflanzen
♀	♂	tot	lebend	
<i>atpdx1.2-1 +/-</i>	WT Col0	1	0,73	206
WT Col0	<i>atpdx1.2-1 +/-</i>	1	0,71	208
<i>atpdx1.2-1 +/-</i>	<i>atpdx1.2-1 +/-</i>	1	1,38	206
<i>atpdx1.2-1 +/-</i> Selbstung		1	1,50	211
WT Col0	WT Col0	1	0	25
		ATS-Medium		
WT Col0	WT Col0	0	1	25

3.4.3 Phänotypische Analyse der Samen von heterozygoten *atpdx1.2-1* Pflanzen

Aufgrund der ermittelten Segregationsdaten von *atpdx1.2-1* Pflanzen wurde die Hypothese aufgestellt, daß ein embryonaler Defekt in den homozygoten Mutanten vorliegt. Um die embryonale Entwicklung der Pflanzen phänotypisch zu untersuchen, wurden Samen von *atpdx1.2-1 +/-* Linien unter dem Mikroskop untersucht. Hierfür wurden 3-5 Tage alte Schoten abgeerntet und die Samen herauspräpariert. Hierbei entspricht Tag 1 Phase 15 der Blütenentwicklung nach Smyth et al. (1990) (Phase 15: „Gynoeceum wächst über die Größe der Antheren heraus“). Im Anschluß wurden die Samen geklärt (siehe 2.9.6) und mit Hilfe eines Mikroskops die Embryonen auf Größe und Entwicklung untersucht.

Beobachtet wurde, daß kontinuierlich eine Anzahl an morphologisch kleineren Samen in den 3-5 Tage alten Schoten zu finden war (Abbildung 3.23 I). Die Analyse der 3 Tage alten Schoten zeigte, daß diese kleineren Samen einen in der Entwicklung zurückgebliebenen Embryo im frühen globulären-Stadium aufwiesen (Abbildung 3.23 B, D). Dies war im Vergleich zu den normal entwickelten Samen sehr auffällig, da diese nicht nur sehr viel größer waren, sondern weiter entwickelte Embryonen im Herz-Stadium aufwiesen (Abbildung 3.23 A, C). In den 4 Tage und 5 Tage alten Schoten konnten ebenfalls und in gleicher Anzahl, kleinere Samen gefunden werden, jedoch schienen diese Samen in der

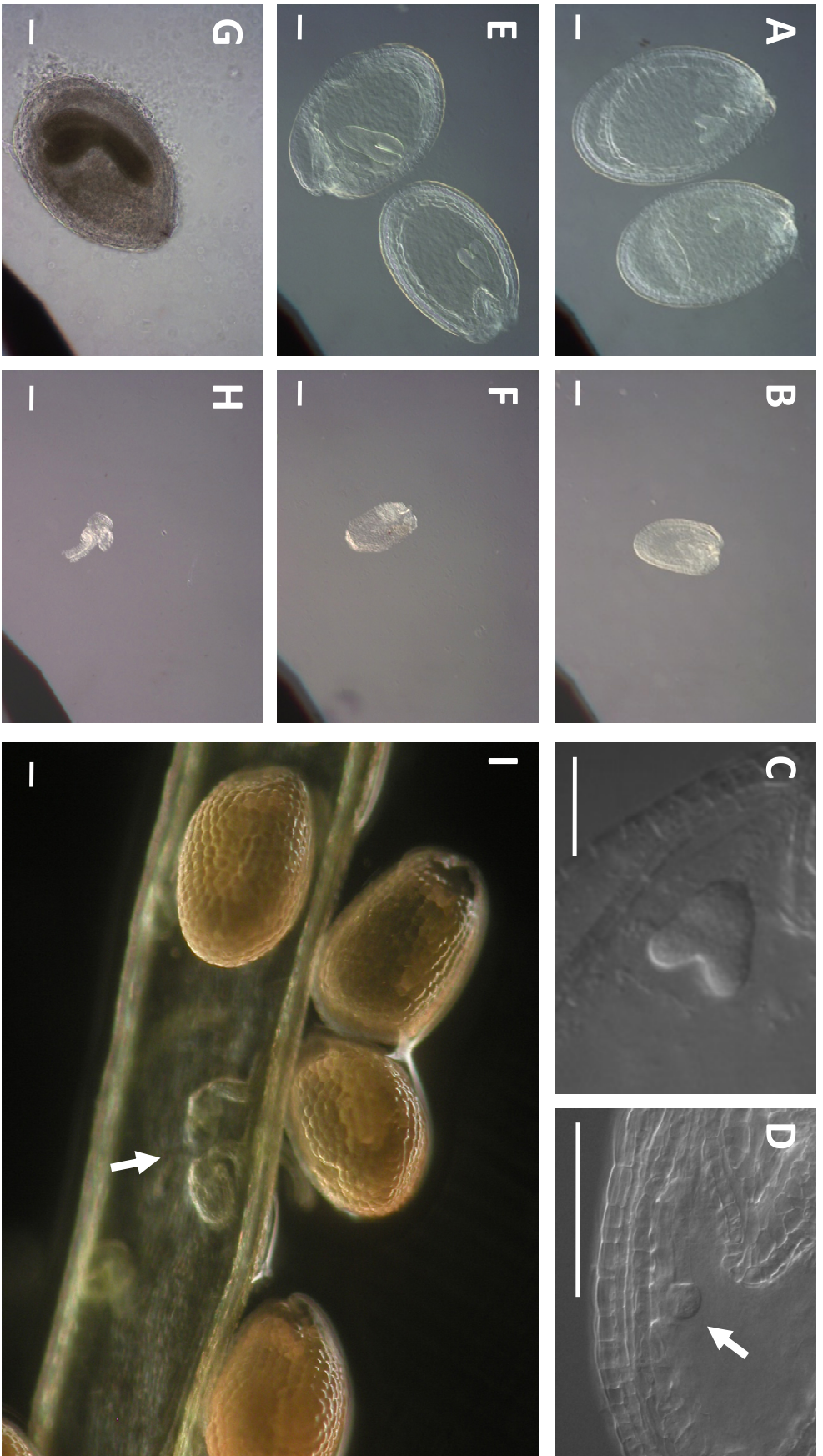


Abbildung 3.23: Mikroskopische Analyse der Samenentwicklung von *atpdx1.2-1 +/-* Pflanzen. Samen wurden aus 3 (A-D), 4 (E; F) und 5 Tage (G; H) alten Schoten präpariert und geklärt. Bilder (C) und (D) zeigen Vergrößerungen von Embryonen der Samen in Bild (A) und (B). Bild (I) zeigt ungeklärte Samen in einer 4 Tage alten Schote. Auffallend war ein regelmäßiges Auftreten von morphologisch kleineren Samen, deren Embryo in der Entwicklung zurückgeblieben waren (B; D weißer Pfeil). Im weiteren Verlauf der Entwicklung wurden etwa in gleicher Anzahl sich zurückbildende Samen (F; I weißer Pfeil) und im späteren Stadium kollabierende Samen (H) beobachtet. Im Vergleich dazu normal entwickelte Samen bzw. Embryonen (A; C; E; G).

Embryonalentwicklung zunehmend gestörter. Während sich die morphologisch großen Samen normal entwickelten und Embryonen im späten bzw. im gekrümmten Torpedo-Stadium aufwiesen (Abbildung 3.23 E, G), stagnierten die Embryonen der kleinen Samen im globulären-Stadium (Abbildung 3.23 F, I). Fünf Tage alte Schoten enthielten neben den normal entwickelten Samen nur vollständig kollabierte Samen, deren Embryonen nicht mehr detailliert mikroskopisch analysiert werden konnten (Abbildung 3.23 H). Die Ergebnisse weisen daraufhin, daß *AtPDX1.2* eine wichtige Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung einnimmt.

3.4.4 Analyse der Lokalisation von *AtPDX1.2*

Die mikroskopische Analyse der Samenentwicklung zeigte, daß ein embryonaler Defekt in den *atpdx1.2-1* Pflanzen vorlag. Da die bisherigen Promotor:GUS Analysen keine Expression von *AtPDX1.2* im Embryo aufgezeigt hatten, wurde eine Untersuchung der *AtPDX1.2* Lokalisation im embryonalen Gewebe vorgenommen. Hierfür wurde ein *AtPDX1.2:GFP* Konstrukt unter der Kontrolle des endogenen *AtPDX1.2* Promotors (*PPDX1.2*; 1,8 kb Fragment; siehe 2.6.12.3 IV) angefertigt und in *A. thaliana* Col0 transformiert. Die Samen der T2 Pflanzen sind mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops untersucht worden (siehe 2.9.7). Hierfür wurden Samen aus 3-5 Tage alten Schoten präpariert und auf GFP Fluoreszenz getestet.

Die Samen *PPDX1.2:AtPDX1.2:GFP* tragender Pflanzen zeigten eine geringe, aber im Vergleich mit dem Wildtyp gut detektierbare cytosolische GFP Fluoreszenz in den Zellen des Embryos (Abbildung 3.24). Bereits im frühen globulären-Stadium konnte eine Fluoreszenz gesehen werden, wobei der basale Teil des Embryos stärker leuchtete (Abbildung 3.24 C). Deutlich konnte die Fluoreszenz in der Hypophyse und in den Zellen des dem Embryo nahestehenden Suspensors beobachtet werden (Abbildung 3.24 D). Die Fluoreszenz im basalen Teil des Embryos war ebenfalls im Torpedo-Stadium zu erkennen. Zudem zeigte sich eine starke Fluoreszenz im Bereich des Wurzelmeristems und der Wurzelhaube (Abbildung 3.24 D). Das Endosperm zeigte in allen Entwicklungsstadien nur eine schwache Grundfluoreszenz, die vernachlässigt werden konnte.

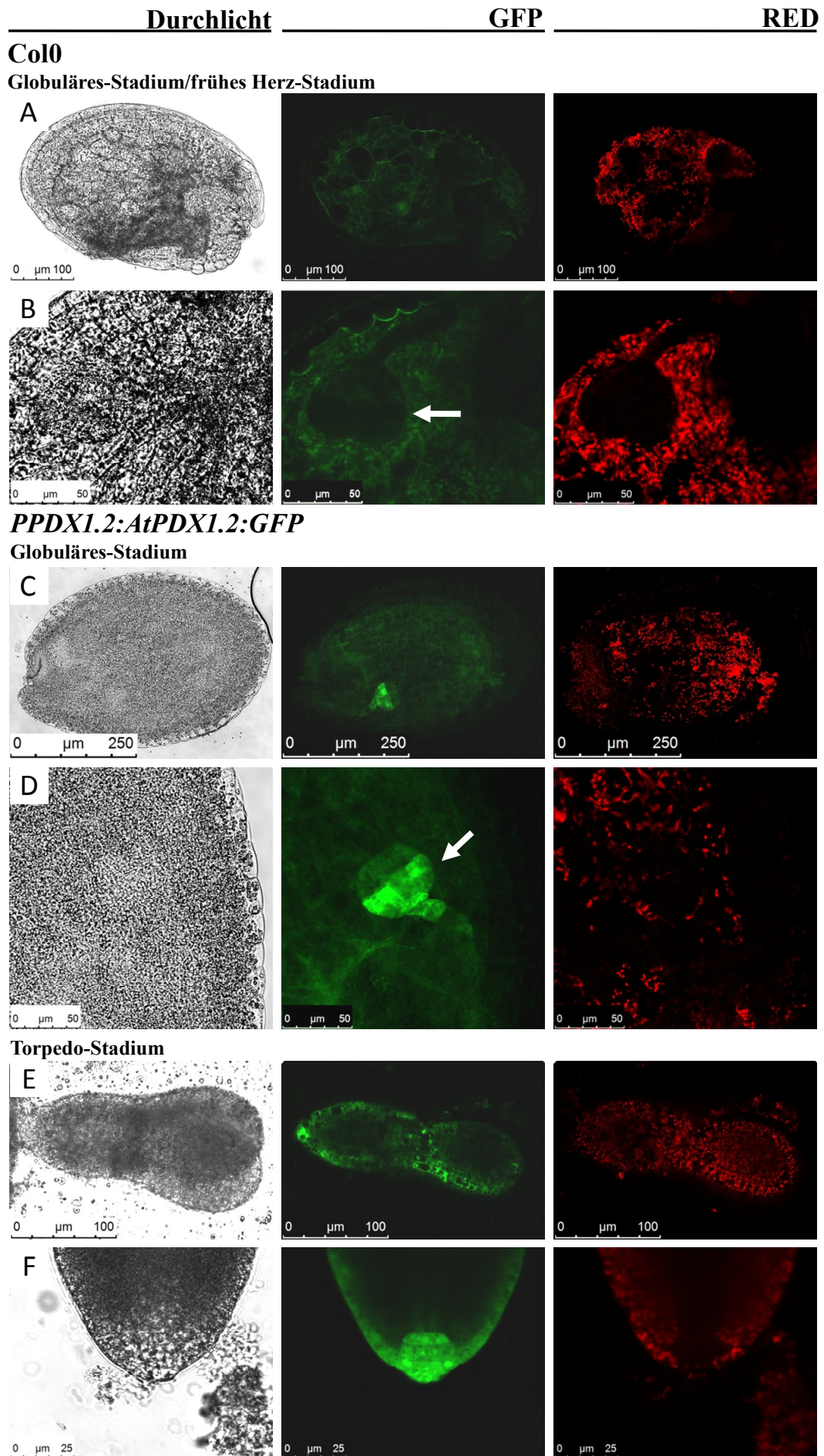


Abbildung 3.24: Lokalisationsstudien von AtPDX1.2:GFP in jungen *Arabidopsis* Samen bzw. Embryonen. Analyse mit konfokalem Laserscanningmikroskop mit Durchlicht, GFP Kanal für spezifische und RED Kanal für unspezifische Fluoreszenzsignale. Bild (A) sowie Vergrößerung in (B) zeigen WT Col0 Samen bzw. den Embryo (weißer Pfeil) ohne GFP Fluoreszenz. (C, E) sowie die Vergrößerungen in (D, F) zeigen spezifische GFP Signale in Embryonen des frühen globulären- (weißer Pfeil) sowie des Torpedo-Stadiums von *P35S:AtPX1.2:GFP* Pflanzen. Die Expression des AtPDX1.2:GFP Fusionsproteins war hierbei unter der Kontrolle des endogenen *AtPDX1.2* Promotors (1,8 kb Fragment).

3.5 Charakterisierung neuer Interaktionspartner der AtPDX1 Familie

Das Wissen über AtPDX Proteininteraktionen war zu Beginn der Arbeit recht begrenzt. Es war bereits gezeigt worden, welche AtPDX-AtPDX Interaktionen möglich sind (Wagner et al. 2006). Es blieb jedoch offen, ob AtPDX Proteine darüber hinaus mit anderen Proteinen interagieren können. Die Identifizierung und Charakterisierung neuer AtPDX Interaktoren könnte daher das Verständnis um die Regulation bzw. die Aktivität der AtPDX Proteine und damit auch der Vitamin B6 Biosynthese, erweitern. Auf der Suche nach solchen neuen Interaktoren waren daher in vorangegangenen Diplomarbeiten über einen Y2H Ansatz cDNA Banken durchmustert worden (Leuendorf 2006; Liese 2007). Die gefundenen Proteine schienen nicht direkt mit der Vitamin B6 Biosynthese in Verbindung zu stehen. Dementsprechend dürfte man von zusätzlichen Funktionen der AtPDX1 Proteine ausgehen, falls diese auf der Basis von Y2H Studien charakterisierten Interaktionen *in planta* stattfindende Proteininteraktionen repräsentieren. In dieser Arbeit wurden zwei der neu gefundenen AtPDX1 Interaktoren weiter untersucht. Es handelte sich hierbei um die Proteine AtACS10 (*At1g62960*) und um ein exprimiertes Protein unbekannter Funktion (*At5g65840*) (Tabelle 1.2).

3.5.1 Interaktionsanalyse

In einem direkten Y2H Matrix Ansatz wurde untersucht, inwieweit AtACS10 und At5g65840 die in den Y2H Screen gefundenen Interaktionen bestätigen und ob sie darüber hinaus auch mit anderen AtPDX1 bzw. AtPDX2 Proteinen interagieren können (siehe 2.8.2).

Das Ergebnis des Matrix Ansatzes zeigte, daß ausschließlich At5g65840 reproduzierbar mit AtPDX1 Proteinen interagiert (Abbildung 3.25 A). Ebenfalls war auffällig, daß eine klare Interaktion nur in der Kombination At5g65840:pACT gegen AtPDX1:pBTM beobachtet werden konnte. Dagegen zeigte sich in der umgekehrten Kombination lediglich eine sehr schwache Interaktion mit AtPDX1.1 und AtPDX1.3. Des Weiteren interagierte At5g65840 nicht mit AtPDX2 und auch nicht mit sich selbst (Abbildung 3.25 A).

In einem weiteren Ansatz wurde zusätzlich die Interaktion gegen das inaktive *AtPDX1.3*^{G54S} Protein der *rsr4-1* Mutante getestet. Das inaktive Protein ist nicht mehr in der Lage mit anderen AtPDX Proteinen zu interagieren (Wagner et al. 2006). Aus diesem Grund wäre es interessant zu wissen, ob dies auch für die neuen Interaktoren der Fall ist.

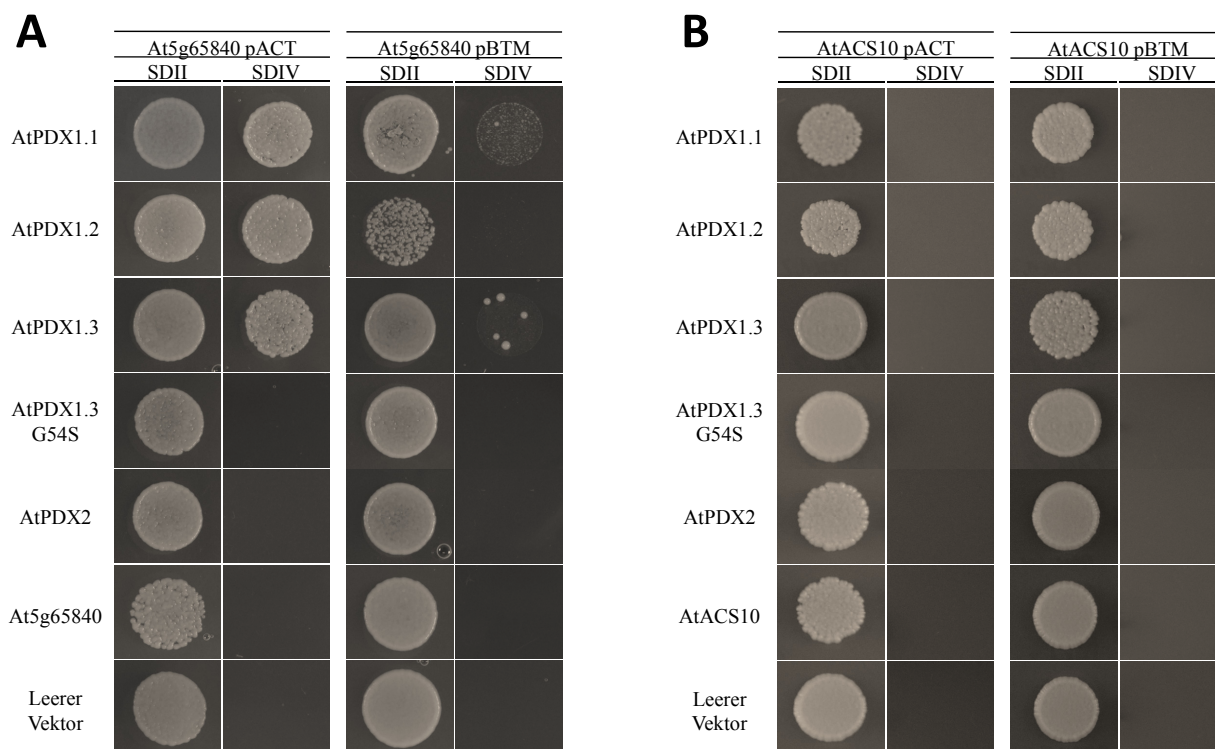


Abbildung 3.25: Interaktionstest mittels Y2H Matrix Ansatz von At5g65840 (A) bzw. AtACS10 (B) pACT/pBTM gegen die Vertreter der AtPDX Proteine, gegen At5g65840 bzw. ACS10 sowie gegen das nicht funktionale AtPDX1.3^{G54S} Protein der *rsr4-1* Mutante je in pBTM/pACT Konstrukten.

Wie in Abbildung 3.25 A zu sehen ist, konnte keine Interaktion zwischen At5g65840 und AtPDX1.3^{G54S} nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu At5g65840 war es für AtACS10 nicht möglich, eine Bindung mit AtPDX1.1 zu zeigen und die Ergebnisse aus dem Y2H Screen Ansatz zu bestätigen. AtACS10 zeigte auch keine Interaktion mit anderen AtPDX Proteinen (Abbildung 3.25 B). Allerdings sollte hier betont werden, daß im Y2H Screen ein partielles AtACS10 Protein gefunden wurde, dem die ersten 600 bp fehlten (Leuendorf 2006). Es bestand daher die Möglichkeit, daß das vollständige Protein entweder andere Bindungseigenschaften besitzt, die eine Interaktion mit AtPDX1 Proteinen verhindert oder daß AtACS10 nicht korrekt in der Hefe exprimiert wurde.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich zum Y2H Matrix Ansatz noch ein *in vitro* Pulldown Ansatz gewählt, in dem auch At5g65840 mit einbezogen worden ist (siehe 2.8.1). Hierfür wurde Pflanzengesamtprotein aus myc:AtPDX1.1 exprimierenden Pflanzen isoliert (siehe 2.7.1) und mit in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten GST, GST:AtPDX, GST:At5g65840 bzw. GST:AtACS10 Fusionsproteinen inkubiert (siehe 2.7.2.1/2.7.2.3). Nach einer nachfolgenden

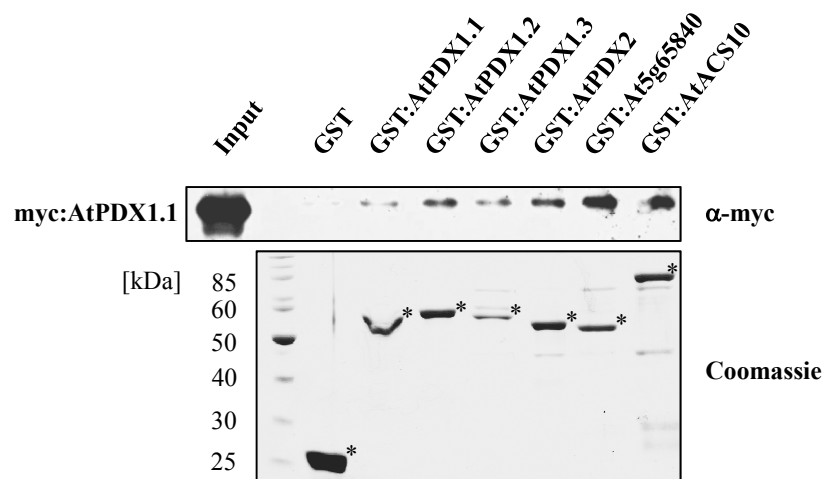


Abbildung 3.26: Interaktionstest durch einen *in vitro* Pulldown Ansatz mit aus Pflanzen aufgereinigtem myc:AtPDX1.1 Protein und aus *E. coli* aufgereinigten GST:AtPDX, GST:At5g65840 und GST:AtACS10 Fusionsproteinen. Immunodetektion mit α -myc Antikörper gegen copräzipitiertes myc:AtPDX1.1 (oben). Das Coomassie gefärbte SDS Testgel zeigt alle für den *in vitro* Pulldown eingesetzten GST Proteine mit dem dazugehörigen Größenstandard. Sterne (*) markieren die korrekte Proteinbande für jedes GST Protein.

Präzipitation über Glutathionagarose und Auftrennung der Proteine im SDS-Gel sowie Western Blot wurde eine Immunodetektion mit α -myc Antikörpern gegen copräzipitiertes myc:AtPDX1.1 durchgeführt. Die GST:AtPDX Proteine dienten als Positivkontrollen, während GST die Negativkontrolle darstellte.

Das Ergebnis des Pulldown zeigte bestätigend die bereits bekannten Interaktionen der verschiedenen AtPDX1 und AtPDX2 Proteine mit AtPDX1.1. Deutlich sind die copräzipitierten myc:AtPDX1.1 Proteinbanden im Western Blot zu sehen (Abbildung 3.26). Weiterhin kann man erkennen, daß At5g65840 ebenfalls gut mit myc:AtPDX1.1 Protein interagiert (Abbildung 3.26). Interessanterweise konnte AtACS10 im Gegensatz zum Y2H Interaktionsansatz ebenfalls an das myc:AtPDX1.1 binden. Zudem scheinen At5g65840 und AtACS10 im Vergleich zu den AtPDX Proteinen deutlich stärker mit myc:AtPDX1.1 zu interagieren (Abbildung 3.26).

Die Ergebnisse mit den neuen AtPDX1 Interaktionspartnern waren vielversprechend und zeigen potentiell, daß die im Y2H Screen entdeckten Interaktionen stattfinden können. In den folgenden Experimenten wurde allerdings nur der Bindungspartner At5g65840 detailliert untersucht, da sich hier keine Diskrepanzen zwischen den Hefe und Pulldown Interaktionstests gezeigt haben.

3.5.2 Charakterisierung von At5g65840

At5g65840 ist bisher nicht funktional beschrieben worden. In den öffentlichen Datenbanken (TAIR; www.uniprot.org [UniProtKB]) wird At5g65840 aufgrund von Sequenz- bzw. Domänenanalysen als eine putative Alkyl-Hydroperoxid Reduktase und Thiol-spezifisches Antioxidant (IPR000866; www.ebi.ac.uk [EMBL-EBI]) eingeordnet.

Um weitere Informationen über den AtPDX1 Interaktor At5g65840 zu sammeln, wurden die Ansätze *loss-of-function* und *gain-of-function* verfolgt. Für den *loss-of-function* Ansatz wurde aus den frei zugängigen und erwerbbaeren Insertionslinien die Insertionsmutante SALK_018173 aus der SALK Kollektion (Alonso et al. 2003) ausgewählt, deren T-DNA im 7. Exon des *At5g65840* Gens inseriert (Abbildung 3.27).

Durch eine Analyse der genomischen DNA von SALK_018173 Pflanzen mit genspezifischen und insertionsspezifischen Primern (Tabelle 2.17) konnten homozygote Insertionsmutanten identifiziert werden (Abbildung 3.28 A), die *at5g65840-1* benannt wurden. Eine weitere Untersuchung von *at5g65840-1* Pflanzen durch semiquantitative RT-PCR und genspezifische Primer (Tabelle 2.17) zeigte, daß in den Pflanzen kein *At5g65840* Transkript mehr nachweisbar war (Abbildung 3.28 B). Die Pflanzen zeigten allerdings im Gewächshaus unter Langtagbedingungen keine phänotypischen Veränderungen.

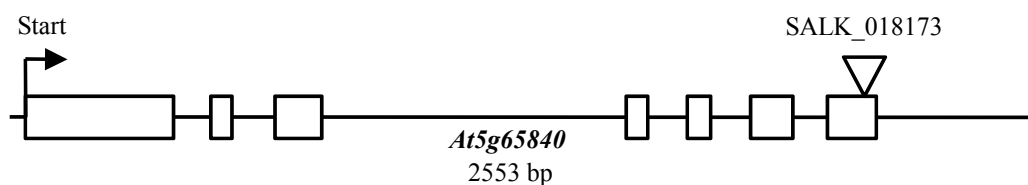


Abbildung 3.27: Schematische Darstellung des genomischen DNA Bereiches von *At5g65840*. Dargestellt ist der transkribierte Bereich von *At5g65840* (Exonbereiche umrahmt). In die genomische Karte wurde der T-DNA Insertionsort der Linie SALK_018173 eingezeichnet.

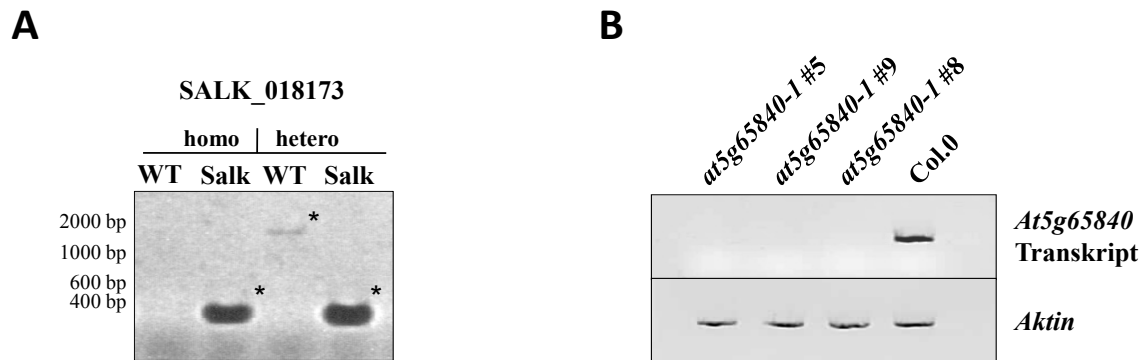


Abbildung 3.28: **(A)** Genotypische Analyse von SALK_018173 Pflanzen durch PCR auf genomische DNA. Analyse des Wildtypallels (WT, *) mit genspezifischen Primern und Identifizierung der T-DNA Insertion (Salk, *) mit insertionsspezifischen Primern (Tabelle 2.17). **(B)** Transkriptanalyse der *At5g65840* Expression in homozygoten SALK_018173 (*at5g65840-1*) Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp Col0 mittels semiquantitativer RT-PCR und eingesetzten genspezifischen Primern (Tabelle 2.17). Als Kontrolle des RNA Einsatzes wurde eine RT-PCR auf das Aktintranskript (*Aktin*) durchgeführt.

Zusätzlich zu den bereits analysierten Nullmutanten wurde ein *gain-of-function* Ansatz mit *At5g65840* durchgeführt, bei dem das Gen unter der Kontrolle des *P35S* Promotors in *A. thaliana* Col0 Pflanzen überexprimiert worden ist. Hierfür wurde die cDNA von *At5g65840* in die Vektoren *pGWB18* (N-terminal myc) und *pGWB17* (C-terminal myc) kloniert und in *A. thaliana* Col0 Pflanzen stabil eingebracht (siehe 2.6.12.3 I). Während 46 *At5g65840pGWB18* (*P35S:myc:At5g65840*) Primärtransformanten identifiziert werden konnten, zeigten jedoch keine der Pflanzen eine Expression des myc:*At5g65840* Proteins in den durchgeführten Western Blot Analysen mit nachfolgender Immunodetektion (Daten nicht gezeigt). Dagegen zeigten alle untersuchten 22 *At5g65840pGWB17* (*P35S:At5g65840:myc*) Primärtransformanten eine deutliche Expression des *At5g65840:myc* Proteins. In Abbildung 3.29 A ist die Expression des *At5g65840:myc* Proteins, identifiziert durch eine Immunodetektion gegen das fusionierte myc-Epitop, von fünf unabhängige Linien gezeigt. Sie wiesen allerdings, wie die *At5g65840* Nullmutanten, keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp unter den angewendeten Wachstumsbedingungen auf.

Nachfolgend wurde eine Untersuchung zur Lokalisation des *At5g65840* Proteins durchgeführt. *At5g65840* wurde zu diesem Zweck in den binären Vektor *pK7FWG2* eingebracht, der eine Expression eines *At5g65840:GFP* Fusionsproteins unter der Kontrolle des *P35S* Promotors erlaubt (siehe 2.6.12.3 V). Auf die Generierung eines N-terminalen GFP-Fusionsproteins wurde verzichtet. Zum einen wurden Probleme in der Expression eines

N-terminal At5g65840 Fusionsproteins angenommen, da dies bereits der *gain-of-function* Ansatz zeigte. Zum anderen wurde außerdem befürchtet, daß das N-terminal fusionierte GFP Protein Einfluß auf die durch Sequenzanalysen vorhergesagte chloroplastidäre Lokalisation des At5g65840 Proteins (TAIR; *AtEnsembl NASC*) nimmt und möglicherweise eine Mislokalisierung auftreten könnte.

Die Untersuchung der At5g65840 Lokalisation erfolgte durch transiente Expression des At5g65840:GFP Fusionsproteins in *N. benthamiana* Blättern sowie in stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen (siehe 2.9.1). In beiden Ansätzen konnte mittels konfokalem Laserscanningmikroskop in den Blattzellen der transformierten Pflanzen eine chloroplastidäre Lokalisation von At5g65840:GFP gesehen werden (Abbildung 3.29 B). Transgene *P35S:At5g65840:GFP* *A. thaliana* Pflanzen zeigten ebenso wie *P35S:At5g65840:myc* Pflanzen keinen erkennbaren Phänotyp (Pflanzen nicht gezeigt).

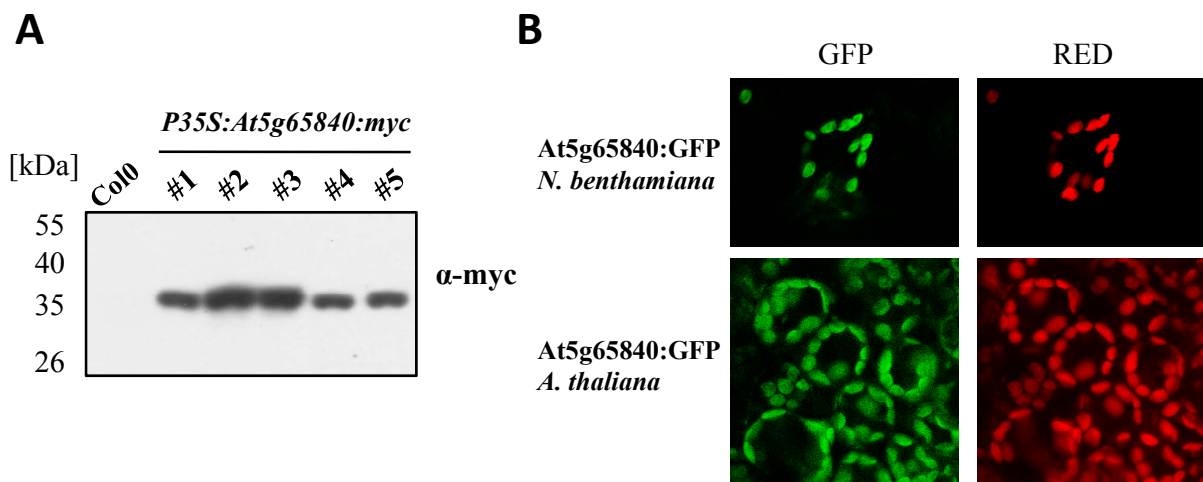


Abbildung 3.29: (A) Expressionsanalyse durch Western Blot in *P35S:At5g65840:myc* Pflanzen der T1 Generation. Immunodetektion mit α -myc Antikörpern gegen At5g65840:myc Protein. (B) Lokalisationsstudie von At5g65840:GFP in transient infiltrierten *N. benthamiana* Blättern und in stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen.

4 Diskussion

Das Vitamin B6 ist in Form von Pyridoxal 5'-Phosphat einer der wichtigsten Kofaktoren für enzymatische Prozesse in den unterschiedlichsten Stoffwechselwegen und ist damit unverzichtbar für alle lebenden Organismen. In Pflanzen wird Pyridoxal 5'-Phosphat über den Deoxyxylose-5-Phosphat unabhängigen Vitamin B6 Syntheseweg durch die Aktivität der PDX1 und PDX2 Proteine gebildet. Für *Arabidopsis thaliana* sind in den letzten Jahren einige Arbeiten über PDX Proteinen angefertigt worden, welche sich hauptsächlich auf die Untersuchungen der Expression, der *in vitro* Vitamin B6 Syntheseaktivität sowie der Charakterisierung von *atpdx* Nullmutanten konzentrierten. In der vorgelegten Arbeit sollte die Funktion der PDX Proteine in *A. thaliana* anhand eines *gain-of-function* Ansatzes untersucht werden. Ein weiteres Ziel war es, zu überprüfen, ob die Proteine ebenfalls hochmolekulare Komplexe in der Pflanzenzelle ausbilden, wie es bereits für nicht pflanzliche Organismen beschrieben werden konnte.

4.1 ***Gain-of-function* Mutanten: Ein Ansatz der Funktionsbeschreibung der *Arabidopsis thaliana* PDX Protein-Familie.**

Die Untersuchungen der AtPDX Überexpressionslinien ergaben eine Reihe wichtiger und neuer Informationen über die Funktion der PDX Proteine in *A. thaliana*. Die Ergebnisse zeigen in deutlicher Weise, daß *Arabidopsis* Col0 Pflanzen sehr sensibel auf die ektopische Expression von *AtPDX1.3* reagieren und starke phänotypische Effekte ausbilden. Eine solch starke Reaktion von *Arabidopsis* auf die Expression der anderen AtPDX Proteinen konnte nicht ermittelt werden. Eine Komplementation der Vitamin B6 defizienten *rsr4-1* Mutante durch *myc:AtPDX1.1* bzw. *myc:AtPDX1.3* zeigte, daß die Fusion des *myc*-Epitops keine ersichtlichen Konsequenzen auf die Funktion der AtPDX Proteine in der Vitamin B6 Biosynthese hat. Darüber hinaus offenbart der Ansatz die redundante Funktion der *AtPDX1.1* und *AtPDX1.3* Proteine in der Pflanze.

4.1.1 *Arabidopsis thaliana* reagiert hypersensitiv auf die ektopische Expression von *AtPDX1.3*

Ein Hauptvorhaben dieser Arbeit war die Untersuchung von *AtPDX* Überexpressionspflanzen. Es zeigte sich jedoch, daß eine Überexpression in *Arabidopsis Col0* Pflanzen nur für die *AtPDX1.1*, *AtPDX1.2* und *AtPDX2* Gene toleriert wird. Für das *AtPDX1.3* Gen konnten keine Pflanzen ermittelt werden, die eine Überexpression zeigten (Abbildung 3.4). Während die *AtPDX1.1*, *AtPDX1.2* und *AtPDX2* exprimierenden Pflanzen keine Phänotypen aufwiesen, zeigten *AtPDX1.3* exprimierende Pflanzen in hoher Frequenz (28 % der Primärtransformanten) einen *-stunted-* Phänotyp, mit gedrungenem Wuchs und gelblichen kleineren Rosettenblättern (Abbildung 3.1). Ähnliche negative Effekte auf die Pflanzenentwicklung konnten bei der ektopischen Expression des zu *Arabidopsis* homologen *Cercospora nicotiana* PDX1 Proteins in Tabakkeimlingen beobachtet werden (Aminosäure-Identität CnPDX1 zu AtPDX1 siehe Anhang Tabelle 12.4). Keimlinge, welche konstitutiv das *CnPDX1* Gen exprimierten, zeigten eine verzögerte Keimung und langsames Wachstum (Herrero und Daub 2007). Es ist aber anzumerken, daß der hier protokollierte *-stunted-* Phänotyp bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe für *Arabidopsis* Pflanzen, die das *AtPDX1.3* Gen ektopisch exprimierten, beschrieben wurde (Chen und Xiong 2009; Raschke et al. 2011).

Eine ektopische Expression von *AtPDX1.1* scheint dagegen von *A. thaliana Col0* Pflanzen toleriert zu werden. Dies ist sehr auffällig, da die *AtPDX1.1* und *AtPDX1.3* Proteine zu 89 % ihrer Aminosäuresequenz identisch sind (Tabelle 1.1). Ein Grund dafür könnte die generell niedrigere Basisexpression von *AtPDX1.1* gegenüber *AtPDX1.3* sein (*eFP-Browser*; Titiz et al. 2006; Wagner et al. 2006). Eine Erhöhung des *AtPDX1.1* Expressionslevels könnte deshalb möglicherweise von den Pflanzen besser bewältigt werden als dies für *AtPDX1.3* der Fall ist. Da die Basisexpression von *AtPDX1.2* in *Arabidopsis* ebenfalls geringer ist, als die von *AtPDX1.3* (*eFP-Browser*; Titiz et al. 2006; Wagner et al. 2006), gilt entsprechendes für die Erhöhung der *AtPDX1.2* Expression.

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Überexpression von GFP:*AtPDX1.3* in *A. thaliana Col0* Pflanzen sehr oft zu einem Phänotyp mit gedrungenen kleineren Pflanzen mit gelblichen Blättern führte, ähnlich dem Phänotyp der von Wagner et al. (2006) beschriebenen Vitamin B6 defizienten *rsr4-1* Mutante. Dieser Phänotyp korrelierte mit einer starken Kosuppression von endogenem *AtPDX1.1* und *AtPDX1.3* (Wagner et al. 2006).

P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted} Pflanzen zeigten ebenfalls diesen beschriebenen Phänotyp und waren auch in der *AtPDX* Expression beeinflusst (Abbildung 3.4). Es ist demnach wahrscheinlich, daß es sich bei den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen ebenfalls um eine Kosuppression von *AtPDX1.1* und *AtPDX1.3* handelt. Allerdings waren die *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen im Gegensatz zu den *P35S:GFP:AtPDX1.3* Pflanzen fertil und konnten weiter im Detail untersucht werden. *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen zeigten wie erwähnt einen starken Phänotyp in der Sproßmorphologie, aber keine Veränderungen in der Wurzelentwicklung (Abbildung 3.3), wie sie für die *rsr4-1* Mutante und die *atpdx1.3* Nullmutante beschrieben wurde (Tabelle 2.2) (Chen und Xiong 2005; Wagner et al. 2006). Vermutlich ist im Unterschied zu den *atpdx1.3* Mutanten das in den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen vorhandene niedrige Level an funktionalem AtPDX1.3 Protein noch ausreichend für ein normales Wurzellängenwachstum. Übereinstimmend zu der *rsr4-1* Mutante und den *atpdx1.1* bzw. *atpdx1.3* Mutanten (Tabelle 2.2), wiesen die *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen auch einen geringeren Vitamin B6 Gehalt auf (Abbildung 3.7). Allerdings konnte die für *atpdx1.1* und *atpdx1.3* beschriebene Salzsensitivität in *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen nicht beobachtet werden (Abbildung 3.3)(Chen und Xiong 2005; Titiz et al. 2006). In diesem Zusammenhang sollte jedoch erwähnt werden, daß die im Vitamin B6 *salvage* Syntheseweg betroffene *sos4* Mutante ebenfalls eine hohe Salzsensitivität besitzt, und einen höheren Vitamin B6 Gehalt als der Wildtyp aufweist (Shi et al. 2002; Shi und Zhu 2002; Gonzalez et al. 2007). SOS4 kodiert für eine Pyridoxalkinase, welche im Zusammenspiel mit AtPDX3/AtPPOX (Pyridoxin/Pyridoxamin 5'-Phosphat Oxidase) den Vitamin B6 *salvage* Syntheseweg bildet. Ein hoher Vitamin B6 Gehalt vermittelt demnach nicht zwingend eine Salzresistenz und umgekehrt, ein geringer Vitamin B6 Gehalt hat nicht unbedingt eine hohe Salzsensitivität zur Folge. Unterstützt wird diese These durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, wonach ein gestörtes Wurzelwachstum von *A. thaliana* Col0 Pflanzen auf salzhaltigem Medium nicht durch eine Vitamin B6 Zugabe normalisiert werden kann (Abbildung 3.3). Ein veränderter Wuchs oder veränderte Stresssensitivitäten von Mutanten im Vitamin B6 Syntheseweg haben folglich einen komplexen Hintergrund und es ist unwahrscheinlich, daß der *-stunted-* Phänotyp in *myc:AtPDX1.3* exprimierenden Pflanzen alleine auf einen verringerten Vitamin B6 Gehalt oder auf eine geringe *AtPDX1* Expression zurückzuführen ist. Denkbar wäre zum Beispiel ein Zusammenspiel der Vitamin B6 Biosynthese mit anderen Metabolitsynthesewegen. Die gesehenen Veränderungen in den Pflanzen könnten demnach

vielschichtige und pleiotrope Ursachen haben. Ein Beispiel hierfür ist die bereits erwähnte Vitamin B6 defiziente *rsr4-1* Mutante, welche ein verändertes Wachstum auf zuckerhaltigem Medium zeigte und ursprünglich in einem Screen für Mutanten der Zuckersignaltransduktion gefunden wurde (Martin et al. 1997).

4.1.2 Veränderungen in der *AtPDX1* Expression führen zu Effekten im Vitamin B6 Gehalt von *P35S:myc:AtPDX* Pflanzen

Die durchgeführten Analysen zeigten deutlich, daß der Gehalt an Vitamin B6, gemessen anhand der drei Derivate Pyridoxamin, Pyridoxal und Pyridoxin, durch die ektopische Expression eines einzelnen *AtPDX1* Proteins signifikant erhöht werden kann (Abbildung 3.7). Die Ergebnisse sind damit in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Chen und Xiong (2009) und Raschke et al. (2011). Allerdings zeigen Chen und Xiong (2009) eine Erhöhung des Vitamin B6 Gehaltes durch die ektopische Expression von *AtPDX1.3*, wohingegen in der vorgelegten Arbeit und in der Arbeit von Raschke et al. (2011) die Erhöhung bei *AtPDX1.1* und nicht bei *AtPDX1.3* exprimierenden Pflanzen gesehen werden konnte. Zudem konnte die Erhöhung des Vitamin B6 Gehaltes bei Chen und Xiong (2009) hauptsächlich im Samengewebe und nur sehr schwach im Blattgewebe nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Vitamin B6 Gehalt ausschließlich im Blattgewebe nachgewiesen. Es wäre in diesem Zusammenhang interessant, wie sich die Vitamin B6 Werte im Samengewebe von *myc:AtPDX1.1* bzw. *myc:AtPDX1.3* exprimierenden Pflanzen verhalten. Es war aber aufgrund der zur Verfügung stehenden Vitamin B6 Extraktionsmethode (siehe 2.9.8) nicht möglich, ausreichend Material zu gewinnen, um auch eine Bestimmung im Samengewebe durchzuführen.

Die *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen zeigten im Gegensatz zu allen anderen Pflanzenlinien eine deutliche Reduktion im Vitamin B6 Gehalt und starke phänotypische Veränderungen. Erstaunlich war, daß die Pflanzen nahezu keine Expression des endogenen *AtPDX1.3* Genes (*AtPDX1.3-UTR*, Abbildung 3.4 G) aufwiesen. Die auffällig geringe gesamt *AtPDX1.3* Transkriptmenge in den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen kam demnach fast ausschließlich durch die Expression des *myc:AtPDX1.3* Transgens zustande. Folgernd ist es wahrscheinlich, daß das detektierte *myc:AtPDX1.3* Fusionsprotein (Abbildung 3.4 H) die *AtPDX1.3* Gesamtproteinmenge repräsentiert. Im Vergleich zu den Wildtyp ähnlichen *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* Pflanzen konnte bei den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen eine

deutlich geringere myc:AtPDX1.3 Proteinmenge nachgewiesen werden. Das niedrige AtPDX1.3 Proteinlevel in den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen sollte jedoch nicht alleine für den verminderten Vitamin B6 Gehalt sowie den *-stunted-* Phänotyp verantwortlich sein. Vergleicht man die *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen mit dem *atpdx1.3* Nullmutanten, so erkennt man, daß der vollständige Verlust des AtPDX1.3 Proteins in der *atpdx1.3* Mutante zu keinem, solchen starken veränderten Phänotyp führt (Titiz et al. 2006).

Es ist bemerkenswert, daß *P35S:myc:AtPDX1.2* Pflanzen im Vergleich zu *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen eine ebenfalls sehr starke Reduktion der *AtPDX1.3* Expression aufwiesen. Zusätzlich zeigten diese Pflanzen auch eine Reduktion der Expression von *AtPDX1.1* und *AtPDX2*. Die Pflanzen wiesen jedoch im Vergleich zum Wildtyp keine phänotypischen Veränderungen und kaum Abweichungen im Metabolitgehalt auf. Ausschließlich der Gehalt an Vitamin B6 war leicht reduziert. Im Vergleich zu den *P35S:myc:AtPDX1.2* Pflanzen zeigten die *P35S:myc:PDX1.3^{stunted}* Pflanzen sehr stark reduzierte Vitamin B6 Werte, große Veränderungen im Metabolithaushalt und starke Defekte im Wachstum. Der genaue Grund für diese unterschiedlichen Effekte in *P35S:myc:AtPDX1.2* und *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen bleibt unklar. Eine mögliche Erklärung ist, daß die *AtPDX1.3* Expression (72 % Reduktion im Vergleich zum Wildtyp, Abbildung 3.4) in der *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Linie unter ein kritisches Maß fiel, während bei den *P35S:myc:AtPDX1.2* Pflanzen die Reduktion noch im Toleranzbereich liegt (67 % *AtPDX1.3* Reduktion, Abbildung 3.4). Demnach würde nur bei *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen eine zu schwache Pyridoxal 5'-Phosphat Syntheseleistung und damit verbunden, eine Vitamin B6 Unterversorgung der Pflanze zum Tragen kommen. Die schlechte Vitamin B6 Versorgung könnte zu starken Veränderungen im Metabolismus sowie in der Pflanzenentwicklung führen. Diese Annahme unterstützen die Beobachtungen an den sich normal entwickelnden *P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}* Pflanzen, welche ebenfalls eine Reduktion in der *AtPDX1.3* Transkription aufwiesen (40 % Reduktion zum Wildtyp, Abbildung 3.4). Diese Reduktion scheint ebenfalls in dem erwähnten Toleranzbereich zu liegen, da bei den Pflanzen keine Veränderungen im Vitamin B6 Gehalt und im Phänotyp nachgewiesen werden konnten.

Die Überexpression von *AtPDX2* bewirkte in den *P35S:myc:AtPDX2* Pflanzen keine Erhöhung der Vitamin B6 Gehalte. Dies ist in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Raschke et al. (2011), die ebenfalls keine Veränderung in den Vitamin B6 Gehalten in *AtPDX2*

überexprimierenden Pflanzen nachweisen konnte. Scheinbar reicht die Erhöhung des AtPDX2 Proteingehaltes allein nicht für eine Steigerung der Vitamin B6 Syntheseleistung aus. Dies ist auch nachvollziehbar, da die Glutaminasefunktion von AtPDX2 zusätzlich vom Vorhandensein von AtPDX1.1 bzw. AtPDX1.3 abhängt (Tambasco-Studart et al. 2007). Demnach könnte das vermehrte Vorkommen von AtPDX2 nur einen Effekt bewirken, wenn die AtPDX1.1 bzw. AtPDX1.3 Proteine ebenfalls vermehrt vorkommen. Diese These wird durch die Ergebnisse von Raschke et al. (2011) unterstützt, die zeigten, daß eine Kreuzung von *AtPDX1.1* und *AtPDX2* überexprimierenden Pflanzen eine Erhöhung des Vitamin B6 Gehaltes um das 5-fache im Vergleich zum Gehalt des Wildtyps bewirkt. Damit fällt die Steigerung sogar höher aus als bei *AtPDX1.1* überexprimierenden Pflanzen, welche eine ca. 2,5-fache Erhöhung der Vitamin B6 Werte zeigten (Raschke et al. 2011). Anscheinend tritt bei der Ko-Überexpression der AtPDX1 und AtPDX2 Proteine in *Arabidopsis* ein additiver Effekt auf. Es wäre interessant, ob eine Kreuzung der in dieser Arbeit untersuchten *P35S:myc:AtPDX1.1* und *P35S:myc:AtPDX2* Pflanzen einen ähnlichen Effekt in Bezug auf die Vitamin B6 Syntheseleistung hätte. Leider war es aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich, solche Kreuzungen zu analysieren.

4.1.3 Die veränderte Metabolitgehalte weisen auf einen photorespiratorischen Defekt und stressbedingte Reaktionen in den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen hin.

Die Untersuchung der pflanzlichen Metabolite zeigte, daß die größten Veränderungen in den Vitamin B6 defizienten *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen zu finden waren (Abbildung 3.8). Die anderen analysierten transgenen *P35S:myc:AtPDX* Pflanzen zeigten keine oder nur moderate Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp Col0. Die Erhöhung des Vitamin B6 Gehaltes in den *P35S:myc:AtPDX1.1* Pflanzen scheint demnach keinen Einfluß auf den Metabolithaushalt zu haben.

Eine besonders auffällige Veränderung in den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen war die Erhöhung der Glycinwerte. Der Glycinmetabolismus ist eng mit der Photorespiration verbunden. Diese stellt einen Reaktionsablauf dar, in welchem das nach der lichtabhängigen Oxygenierungsreaktion von Ribulose-1,5-bisphosphat gebildetes Phosphoglycolat in das für den Calvin Zyklus verwertbare Phosphoglycerat umgewandelt wird, was 75 % des fixierten Kohlenstoffes in der Pflanze sicherstellt (Foyer et al. 2009). Die Photorespiration tritt besonders stark unter Bedingungen wie Starklicht-, Salz- und Trockenstress auf (Hoshida et

al. 2000; Wingler et al. 2000; Igarashi et al. 2006). Interessanterweise zeigten einige in der Photorespiration betroffene Mutanten einen zu den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen ähnlichen Phänotyp, mit kleinerem Wachstum, gelblichen Blättern, starker Lichtsensitivität und erhöhten Glycinwerten, aber nahezu unverändertem Seringehalt (Voll et al. 2006; Engel et al. 2007; Collakova et al. 2008). Diese photorespiratorischen Mutanten sind in mitochondrialen Proteinen beeinträchtigt, welche den Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP)-abhängigen Umbau von Glycin zu Serin katalysieren. Hier sind vor allem die P-Protein Mutanten *gdcp1* und *gdcp2* des Glycin-Decarboxylasekomplexes (GDC) (Engel et al. 2007), die Serin Hydroxymethyltransferase (SHTM) Mutante *shm1* (Voll et al. 2006; Collakova et al. 2008; Van Aken et al. 2009) und die Doppelmutanten der 10-Formyl THF Deformylase Proteine (At4g17360 und At5g47435; Collakova et al. 2008) zu nennen. Die Übereinstimmungen in dem Phänotyp sowie in dem erhöhten Glycingehalt lassen die Hypothese zu, daß das reduzierte *AtPDX1.1* und *AtPDX1.3* Transkriptevel bzw. die reduzierten Vitamin B6 Gehalte in den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen eine PLP Unterversorgung der Mitochondrien bewirkt. Möglicherweise ist die PLP Versorgung der Mitochondrien in einem kritischen Maße beeinträchtigt, so daß die Glycin-Decarboxylierung in der Photorespiration gehemmt abläuft, was wiederum zu einer Glycinakkumulation führen würde. Es gibt eine Untersuchung von Nijhout et al. (2009) die diese These unterstützt. Mit Hilfe eines mathematischen Modells wurden im Zusammenspiel mit anderen Enzymen die mitochondriale GDC und SHMT Aktivitäten modelliert. Die Untersuchung zeigte, daß eine Vitamin B6 Defizienz sich direkt auf die Glycin-Decarboxylierung auswirkt, und linear mit einem Anstieg der zellulären Glycinwerte korreliert (Nijhout et al. 2009). Es ist denkbar, daß die gemessene Glycinakkumulation eine PLP Unterversorgung bzw. Defizienz in den Mitochondrien der *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen widerspiegelt. Die Unterversorgung könnte dann zu einer abgeschwächten Photorespirationsleistung führen und damit auch einen direkten Einfluß auf die Photosyntheserate bzw. auf die Energiegewinnung haben. Wie bereits erwähnt wird in der Photorespiration das durch die Oxygenierung von Ribulose 1,5-bisphosphat gebildete Phosphoglycolat in Phosphoglycerat (einen C3 Körper) regeneriert und so für den Calvin Zyklus wieder verwertbar. Durch eine verminderte Photorespirationsleistung verlangsamt sich aber auch die Regeneration des Phosphoglycolats und es fehlen Kohlenstoffmetabolite für den Calvin Zyklus. Um den Zyklus weiterhin zu betreiben und damit eine CO₂ Fixierung in

der Photosynthese zu ermöglichen, müssen energieaufwendig genügend Metabolite gebildet werden. Eine schlechte Energiebilanz der Photosynthese ist die Folge. In den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen könnte die schlechte Energieausbeute wiederum zu einem *-stunted-* Wachstum geführt haben. In diese Richtung deuten auch die niedrigen Werte für Raffinose, Glaktose und Glukose.

Ein Defekt in der Glycin-Decarboxylierung könnte außerdem den lichtsensitiven Phänotyp in den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen erklären (Abbildung 3.1). Unter intensiveren Lichtbedingungen steigt die Photorespirationsrate, was sich bei einer verminderte Glycin-Decarboxylierungsrate in den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* wie beschreiben nachteilig auswirken müßte.

Die Photorespiration steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Biosynthese einiger anderer Aminosäuren, wie Glutamat und Glutamin (Igarashi et al. 2006; Timm et al. 2008), welche alle in der *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanze dereguliert waren (Abbildung 3.8).

Ein weiteres stark erhöhtes Metabolit war Isomaltose. Veränderte Isomaltosewerte wurden im Zusammenhang mit einer *npq4* Mutante beschrieben (Frenkel et al. 2009). Diese Mutante ist in dem PsBs Protein betroffen, welches am Photosystem II lokalisiert ist und Chlorophyll a, Chlorophyll b und Xanthophyll Pigmente binden kann (Funk et al. 1994; Funk et al. 1995; Peterson und Havir 2001; Schultes und Peterson 2007). Die *npq4* Mutante zeigte eine 80 % Reduktion des *non-photochemical quenching* (NPQ) der Chlorophyllfluoreszenz, einen Defekt in der Weiter- bzw. Ableitung übermäßig aufgenommenener Lichtenergie (Schultes und Peterson 2007). Ein Untersuchung der Metabolite in dieser Mutante ergab ebenfalls erhöhte Isomaltosewerte. Jedoch ist unklar, inwieweit hier ein Zusammenhang zu der PLP Defizienz oder einer möglichen gehemmten photorespiratorischen Aktivität zu sehen ist.

Isomaltose ist neben Glukose und Maltose ein Produkt des Stärkeabbaus (Servaites und Geiger 2002), daher könnte die Erhöhung der Isomaltosewerte auch auf einen, wie bereits diskutiert, veränderten Energiehaushalt hinweisen. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob die *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen einen veränderten Stärkegehalt aufweisen oder veränderte Kinetiken im Stärkemetabolismus zeigen.

Die Werte an β -Alanin waren in den *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen ebenfalls erhöht. Es gibt Hinweise, daß eine vermehrte Produktion von β -Alanin nützlich für eine Thermotoleranz ist (Fouad und Rathinasabapathi 2006). Es wurden zudem gesteigerte Prolinwerte gemessen. Prolin ist eine Iminosäure, die vermehrt bei osmotischem Stress akkumuliert (Kiyosue et al.

1996; Liu und Zhu 1997), und wie Pyridoxin als Hydroxyl-Radikalfänger dient (Smirnoff und Cumbes 1989; Matxain et al. 2009). Es ist denkbar, daß die *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen durch den geringeren Vitamin B6 Gehalt und die verminderte Photorespirationsrate ein generell erhöhtes Stresslevel aufweisen. Als Konsequenz akkumulieren die Pflanzen die Metabolite Prolin und β -Alanin, welche wie erwähnt eng mit der Antwort auf Stress verbunden sind.

4.1.4 Phänotypischer Effekt der ektopischen Expression von *AtPDX1.3*

Die starke Lichtsensitivität der Vitamin B6 defizienten *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen sowie die Beschreibung von Haveaux et al. (2009), daß Vitamin B6 wichtig für die Toleranz gegen Starklicht ist, unterstützt die Hypothese, daß die Veränderungen der Metabolite in *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen eine gehemmte Photorespiration aufzeigen. Hier sollte erwähnt werden, daß die *atpdx1.1/atpdx1.3* Doppelmutanten welche heterozygot für *atpdx1.1* (*atpdx1.1 +/- atpdx1.3 +/-*) sind, ebenfalls einen lichtsensitiven Phänotyp aufwiesen, der durch Zugabe von Vitamin B6 gerettet werden konnte (Titiz et al. 2006). Allerdings gibt es unterschiedliche Auffassungen über die Auswirkungen einer Vitamin B6 Defizienz.

Havaux et al. (2009) diskutieren, daß eine Defizienz einen reduzierten Vitamin B6 Pool in den Chloroplasten hervorruft, welcher eine verminderte Reduzierung des Singulett-Sauerstoffes zu Folge hat (Havaux et al. 2009). Somit ist nach dieser These der Phänotyp eine Folge des oxidativen Stresses durch erhöhte Singulett-Sauerstoff Werte. Unterstützend muß angefügt werden, daß die *AtPDX1* Gene im Zusammenhang mit der von ihnen vermittelten Resistenz gegenüber Singulett-Sauerstoff in *C. nicotiana* identifiziert worden sind (Ehrenshaft et al. 1999a; Ehrenshaft et al. 1999b). Zudem konnte die im Dunkeln vermehrt Singulett-Sauerstoff produzierende *flu* Mutante durch die ektopische Expression von *AtPDX1.1* und der damit einhergehenden Erhöhung der Vitamin B6 Werte in ihrem Phänotyp normalisiert werden (Raschke et al. 2011). Allerdings sind die erhöhten Glycinwerte der *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen nicht mit dieser These zu vereinbaren. Es gibt bisher keine Veröffentlichung, in der ein direkter Zusammenhang zwischen erhöhten Singulett-Sauerstoff und erhöhten Glycin Werten beschrieben wird. Möglicherweise tritt in den Vitamin B6 defizienten Mutanten unter Starklichtbedingungen jedoch ein additiver Effekt ein, der aus einer Schädigung der photosynthetischen Systeme durch Singulett-Sauerstoff in den

Chloroplasten und verminderter Photorespiration durch eine gehemmte Glycin-Decarboxylierung in den Mitochondrien besteht. Unterstützend dazu zeigen die *P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}* Pflanzen unter lichtintensiven Bedingungen lila gefärbte Blätter (Abbildung 3.1 B), welche auf einen erhöhten Anthozyaningehalt und damit auf erhöhten Stress gegenüber radikalen Sauerstoff-Spezies schließen läßt (Zeng et al. 2010). Auf einen erhöhten Stress der Pflanzen wiesen wie bereits erwähnt ebenfalls die erhöhten Gehalte an Prolin und β -Alanin (Abbildung 3.8).

Die hauptsächlich als cytosolische beschriebene Lokalisation der AtPDX Proteine (Chen und Xiong 2005; Tambasco-Studart et al. 2005) macht es wahrscheinlich, daß die *de novo* Vitamin B6 Biosynthese ebenfalls im Cytosol und nicht in den Chloroplasten bzw. Mitochondrien stattfindet. Die diskutierten Probleme in den Chloroplasten und Mitochondrien scheinen aus Gründen einer Unterversorgung mit Vitamin B6 aufzutreten. Dies wirft die Frage auf, wie Vitamin B6 in die beschriebenen Organellen gelangt, und ob die Translokation auf einem aktiven oder passiven Transport beruht. Für *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* konnte bereits ein aktiver Vitamin B6 Transport nachgewiesen werden. Die Transportproteine Tpn1p und Bsu1p bewirken den Import von Pyridoxin über die Plasmamembran in die Hefe (Stolz und Vielreicher 2003; Stolz et al. 2005). In *Arabidopsis* konnte bisher kein Homolog zu Tpn1p bzw. Bsu1p beschrieben werden. Es bleibt ungewiss, ob es in Pflanzen einen aktiven Transport von Vitamin B6 in die Chloroplasten bzw. in die Mitochondrien gibt. Allerdings ist eine Diffusion durch die Organellenmembranen aus Gründen der starken Polarität von PLP nur für die unphosphorylierten Vitamin B6 Derivaten vorstellbar. In den Organellen könnte durch den Umbau von Pyridoxin im *salvage* Vitamin B6 Syntheseweg über eine Pyridoxin-/Pyridoxalkinase und eine Pyridoxinoxidase die Versorgung mit PLP gewährleistet werden. In *Arabidopsis* konnten bisher lediglich zwei Enzyme des *salvage* Synthesewegs identifiziert werden, SOS4 und AtPDX3/AtPPOX, deren Lokalisation im Chloroplasten vorhergesagt (SUBA; <http://www.plantenergy.uwa.edu.au>) bei AtPDX3/AtPPOX sogar bereits nachgewiesen werden konnte (Sang et al. 2010). Demnach läßt sich mit dem heutigen Wissen eine PLP Versorgung des Chloroplasten, aber nicht der Mitochondrien erklären. In Zukunft wäre es wichtig, den Transport von Vitamin B6 in alle Organellen aufzuklären und im Detail zu untersuchen.

4.2 Interaktion und Komplexbildung der AtPDX Proteine: Hinweise auf eine zu Bakterien, Pilzen und Archaeen ähnlich aufgebaute pflanzliche PLP Synthase

Die strukturelle Aufklärung von PLP Synthasen aus Pilzen und Bakterien haben gezeigt, daß sich die PDX1 und PDX2 Proteine zu einem hochmolekularen Komplex zusammenfinden. Hierbei bilden die PDX1 Proteine ein zentrales Dodekamer an dem sich an der äußeren Oberfläche 12 einzelne PDX2 Proteine anlagern und so eine zahnradähnliche Struktur ausbilden (Abbildung 1.4). Die in dieser Arbeit mit Hilfe von Größenausschlußchromatographie, Blue Native Page (BNP) Analysen und Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC) ermittelten Daten ergaben nun neue Erkenntnisse bezüglich der pflanzlichen AtPDX Komplexbildung und liefern damit erstmalig Hinweise auf die Zusammensetzung einer pflanzlichen PLP Synthase.

4.2.1 Nachweis von hochmolekularen AtPDX Komplexen in *Arabidopsis thaliana*

Die in der Größenausschlußchromatographie beobachteten myc:AtPDX1.1 und myc:AtPDX1.3 Komplexe im Bereich der 400 kDa (Abbildung 3.10) sind vergleichbar mit der molekularen Größe eines angenommenen AtPDX1 Dodekamers (402-468 kDa). Ebenso konnte ein Maximum für AtPDX1.1, AtPDX1.3 und AtPDX2 Proteine im Bereich von 750-780 kDa gesehen werden, was der molekularen Größe eines AtPDX1 Dodekamers mit 12 zusätzlichen AtPDX2 Proteinen entspricht (738-804 kDa). Der angegebene variierende Größenbereich von AtPDX Oligomeren ergibt sich aus folgendem Grund: Da die Konstrukte im *A. thaliana* Col0 Wildtyp Hintergrund exprimiert werden, haben die myc:AtPDX1 Proteine (myc:AtPDX1.1/1.3 = 39 kDa) die Möglichkeit, mit sich selbst oder mit den endogenen unfusionierten AtPDX1 (AtPDX1.1/1.3 = 33 kDa) bzw. AtPDX2 (28 kDa) Proteinen zu interagieren. Nimmt man im Dodekamer die beiden maximal möglichen Proteinkomplexgrößen durch die verschiedenen fusionierten sowie unfusionierten Proteine an, so kann man bei der Größe des myc-Epitops von ca. 6 kDa einen Größenunterschied im Bereich von ca. 70 kDa erwarten. Dies gilt entsprechend für den größeren Komplex des Dodekamers mit weiteren AtPDX2 Proteinen.

Im zweiten Ansatz über die BNP Analyse konnte ebenfalls eine Oligomerisierung der AtPDX1.1:HIS und AtPDX1.3:HIS Proteine beobachtet werden. Die Proteine aggregierten in Homo-Oligomeren zu Komplexen vergleichbar der Größe von Ferritin (440 kDa,

Abbildung 3.11). Für die errechnete Größe eines AtPDX1.1/1.3:HIS Dodekamers von 420 kDa scheinen die Banden im Gel jedoch zu hoch zu laufen und eine viel größere Proteinmasse zu repräsentieren. Man muß allerdings anfügen, daß die Laufeigenschaften der Proteine im BNP durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden können, die nicht direkt etwas mit der molekularen Masse zu tun haben. Deshalb ist es nicht immer möglich, exakt die molekulare Masse von Proteinen durch die elektrophoretische Mobilität im BNP zu bestimmen (Schägger et al. 1994; Moro et al. 1999; Schamel und Reth 2000; Schamel 2001; Swamy et al. 2006). Aus diesem Grund bleibt es denkbar aber leider nicht sicher nachweisbar, daß die gesehenen Banden AtPDX1 Dodekamere widerspiegeln.

Die Ähnlichkeiten in der beobachteten Komplexgröße von AtPDX1.1, AtPDX1.3 und AtPDX2 Proteinen zusammen mit den Berichten über PLP Synthasen in anderen Organismen (Flicker et al., 2007; Neuwirth et al., 2009; Strohmeier et al., 2006; Zein et al., 2006) deuten allerdings darauf hin, daß *Arabidopsis* und höchstwahrscheinlich alle Pflanzen eine zu Pilzen und den meisten Bakterien strukturell gleich aufgebaute PLP Synthase aufweisen.

Interessanterweise konnte das myc:AtPDX1.2 Protein ebenfalls in der Größenordnung eines Dodekamers detektiert werden (Abbildung 3.10). Weiterhin zeigte AtPDX1.2 in der BNP Analyse zusätzlich eine Proteinbande in der Größenordnung von 880 kDa (Abbildung 3.11). Dies ist in sofern bemerkenswert, da man bisher nur bei den PDX1 Proteinen eine Fähigkeit zur Dodekamerbildung beobachten konnte (Flicker et al., 2007; Neuwirth et al., 2009; Strohmeier et al., 2006; Zein et al., 2006). Die hier erlangten Ergebnisse sagen somit aus, daß AtPDX1.2 nicht nur in der Lage ist, ein Dodekamer zu bilden, sondern darüber hinaus auch fähig ist, Oligomere aus mindestens 24 Proteinen zu bilden. Über die Struktur eines solchen oligomeren AtPDX1.2 Komplexes läßt sich nur spekulieren. Denkbar hierfür wären zwei zusammengelagerte Dodekamere oder ein Dodekamer, an dem an der Außenseite weitere AtPDX1.2 Proteine binden könnten. Im letzteren Fall wäre die Struktur vergleichbar zu einer PLP Synthase bestehend aus PDX1 und PDX2 Proteinen.

4.2.2 Hinweise auf die Komposition von AtPDX1 Komplexen

Die durchgeführten BIFC Studien demonstrierten, daß die verschiedenen AtPDX1 Proteine miteinander *in planta* interagieren (Abbildung 3.9). Dies zeigten ebenfalls die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Pulldown Studien von aus Pflanzen isolierten myc:AtPDX1.1 Protein gegen die verschiedenen GST:AtPDX Proteine (Abbildung 3.26). Die Ergebnisse sind damit in

Übereinstimmung mit den bisher durchgeführten Y2H und *in vitro* Pulldown Studien (Leuendorf 2006; Wagner et al. 2006). Die Bindung von AtPDX1.2 an die anderen AtPDX1 Proteine konnte *in planta* mit dem BIFC System ebenfalls bestätigt werden. Hochmolekulare AtPDX1.2 Komplexe, wie sie in der Größenausschlußchromatographie von myc:AtPDX1.2 Protein gefunden wurden, scheinen demnach realistisch. Aufgrund der hier aufgeführten Ergebnisse kann man folgern, daß AtPDX1.2 in der Lage ist, heteromere aber auch - darauf weisen die Ergebnisse der BNP Analyse hin - homomere AtPDX1 Dodekamere zu bilden. Die Ergebnisse der BNP Analyse zeigten dagegen keine Mischkomplexe aus AtPDX1.2:HIS und AtPDX1.3:HIS an (Abbildung 3.12). Somit wäre anzunehmen, daß keine Mischkomplexe aus AtPDX1.2 und AtPDX1.3 Proteinen in der Pflanzenzelle vorliegen könnten. Allerdings gibt es aus folgenden Gründen noch eine andere Erklärung für das eingetretene Ergebnis: Die Ergebnisse der Gelfiltration und der BNP Analyse zeigten, daß die AtPDX1 Proteine bevorzugt Komplexe angenommenen molekularen Größe von Dodekameran aufbauen. Es wurden in beiden experimentellen Ansätzen keine myc:AtPDX1 Monomere bzw. andere Oligomere unterhalb der molekularen Größe von Dodekameran gefunden. Man kann also bei dem dodekameran Komplex als stabilste Form für die AtPDX1 Proteine ausgehen. Dies macht es wahrscheinlich, daß die AtPDX1 Dodekamere direkt nach der Proteinsynthese gebildet werden und dann kein Protein mehr aus dem Komplex abdissoziieren und durch ein anderes Protein ersetzt werden kann. In dem zweiten BNP Versuch wurden AtPDX1.2:HIS und AtPDX1.3:HIS Proteine einzeln aufgereinigt und im Anschluß vermengt. Unter den gewählten Bedingungen, könnten die stabilen Dodekamere dafür verantwortlich sein, daß es zu keiner Durchmischung der nach der Aufreinigung schon vorliegenden AtPDX1.2:HIS und AtPDX1.3:HIS Komplexe kommen konnte. In diesem Fall ließe sich die Aussage tätigen, daß sich ein AtPDX1 Dodekamer direkt nach der Proteinsynthese bildet und dann nicht mehr veränderlich ist.

Um diesem möglichen Problem in zukünftigen Untersuchungen zu begegnen, sollte der Versuchsansatz so modifiziert werden, daß zu Beginn der Analyse die beiden eingesetzten AtPDX1 Proteine zuerst als Monomere vorliegen und sich dann Komplexe bilden können. Dies könnte zum einen durch Koexpression in *E. coli* oder zum anderen auch durch sanfte Denaturierung der Proteine und anschließender Renaturierung erreicht werden. Eine andere Möglichkeit für die Aufklärung der AtPDX1 Dodekamer Zusammensetzung wäre eine Aufreinigung von pflanzlichen AtPDX1 Dodekameran durch eine Größenaufschluß-

chromatographie. Nachfolgend müßte dann durch eine Immunpräzipitation mit spezifischen z.B. anti-AtPDX1.2 Antikörpern AtPDX1.2 enthaltene Dodekamere isoliert werden. Im Anschluß daran wäre es möglich, die im Dodekamer gebundenen AtPDX1 Proteine durch eine Analyse über SDS-Page und einer Immunodetektion mit AtPDX1 spezifischen Antikörpern zu identifizieren. Allerdings wären für diesen Ansatz sehr spezifische Antikörper notwendig, um die drei unterschiedlichen sehr konservierten AtPDX1 Proteine getrennt nachweisen zu können.

Bisherige Arbeiten über AtPDX Protein-Protein Interaktionen zeigten, daß AtPDX2 nur mit AtPDX1.1 und AtPDX1.3 interagiert, aber nicht mit AtPDX1.2 (Wagner et al. 2006). Geht man von einer solchen Situation aus und nimmt AtPDX1 Mischkomplexe an, dann müßte die Anzahl von AtPDX1.2 Proteinen in einem AtPDX1 Dodekamer einen direkten Einfluß auf die Menge der gebundenen AtPDX2 Proteine haben. Dies könnte Konsequenzen für die Größe des AtPDX1/AtPDX2 Komplexes und möglicherweise auch für die Vitamin B6 Syntheserate haben.

Allerdings haben Studien zur Untersuchung der AtPDX1 und AtPDX2 Aktivität gezeigt, daß AtPDX2 scheinbar nicht fest an einen AtPDX1 Komplex gebunden ist. AtPDX2 kann nach der Hydrolysierung von Glutamin sowie der Übertragung eines Ammoniummoleküls auf AtPDX1 vom Dodekamer abdissoziieren. Anschließend kann es dann mit neu aufgenommenem Glutamin an weitere AtPDX1 Komplexe binden und dort ebenfalls eine Stickstoffübertragung bewerkstelligen (Tambasco-Studart et al. 2007). In diese Richtung weist auch die im Vergleich zu *AtPDX1* Expression generell niedrigere *AtPDX2* Expression, was in der Pflanzenzelle auf ein ungleiches Verhältnis von AtPDX1 zu AtPDX2 Proteinen schließen läßt. Dementsprechend könnten wenige AtPDX2 Proteine, die in relativer Überzahl vorhandenen stabilen AtPDX1 Dodekamere mit Stickstoff für die Synthese von Vitamin B6 versorgen. Es läßt sich hierdurch erklären, daß in der Größenausschlußchromatographie AtPDX1 Proteine vorwiegend im Bereich der molekularen Größe von Dodekameren vorzufinden waren.

Interessanterweise konnte jedoch bei der BNP Analyse von AtPDX1:HIS Fusionsproteinen keine Proteinbande unterhalb der Größe von Ferritin identifiziert werden (Abbildung 3.11), was auf ein Vorhandensein von Monomeren oder Hexameren hätte schließen können. Hingegen konnte in der Größenausschlußchromatographie ein Vorhandensein von AtPDX1.2 sowie AtPDX2 in ca. 100 kDa großen Komplexen nachgewiesen werden (Abbildung 3.10), was auf eine Interaktion der beiden genannten AtPDX Proteine mit anderen, bisher

unbekannten Proteinen hinweist. Im Gegensatz zu AtPDX1.2 und AtPDX2 scheint es sicher, daß AtPDX1.1 oder AtPDX1.3 nur in hochmolekularen Komplexen im Bereich von 400-800 kDa auftreten. Inwieweit sich andere Proteine außer AtPDX2 an den AtPDX1 Dodekameren Komplex anlagern, bleibt Spekulation. Es wäre allerdings denkbar, daß Proteine die Bindungsposition von AtPDX2 im Komplex übernehmen könnten.

Leider konnte in der vorgelegten Arbeit das AtPDX2 Protein nicht in die BIFC Analysen mit einbezogen werden, da es Probleme mit der Proteinexpression der AtPDX2-Split-YFP Konstrukte in *N. benthamiana* gab. Es konnten auch keine Experimente zu dessen Bindungseigenschaften über Blue Native Page durchgeführt werden, weil kein AtPDX2:HIS Protein in ausreichender Menge aus den Bakterien aufgereinigt werden konnte. Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, ob das Protein die gleichen Bindungsfähigkeiten zu AtPDX1 Proteinen und Komplexbildungseigenschaften besitzt, wie sie in Kristallisationsstudien für PDX2 Proteine aus *P. falciparum*, *B. subtilis*, *G. stearothermophilus* und *S. cerevisiae* gezeigt werden konnten (Strohmeier et al. 2006; Zein et al. 2006; Flicker et al. 2007; Neuwirth et al. 2009).

Mit den durchgeführten Arbeiten wurde indirekt nachgewiesen werden, daß AtPDX1.2 die Fähigkeit besitzt, zusammen mit anderen AtPDX1 Proteinen einen hochmolekularen Komplex zu bilden. Da wie bereits diskutiert, heteromere Komplexe zwischen AtPDX1.1 bzw. AtPDX1.3 mit AtPDX1.2 Auswirkungen auf die Anlagerung von AtPDX2 Proteinen haben sollten, wäre es wichtig, eine detaillierte Untersuchung der Komposition des AtPDX Komplexes durchzuführen. Hierfür würden sich *in vitro* Kristallisationsstudien anbieten. Eine andere Möglichkeit wäre die bereits vorgeschlagene, gezielte Aufreinigung von pflanzlichen AtPDX1 Dodekameren über Größenausschlußchromatographie, Immunopräzipitation und Nachweis der im Dodekamer gebundenen AtPDX1 Proteinen über Immunodetektion (siehe oben).

4.3 Funktionelle Redundanz von AtPDX1 Proteinen

Eine funktionelle Redundanz von AtPDX1.1 und AtPDX1.3 ist bisher durch ähnliche Expressions- sowie Interaktionsmuster als wahrscheinlich angenommen worden (Leuendorf 2006; Wagner et al. 2006). Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse untermauern diese Annahme. So konnte durch eine ektopische Expression von AtPDX1.1 bzw. AtPDX1.3 die *rsr4-1/atpdx1.3^{G54S}* Mutante komplementiert werden (Abbildung 3.5). Dies macht deutlich,

daß AtPDX1.1 die Funktion des mutierten und nicht mehr funktionalen AtPDX1.3^{G54S} Proteins der *rsr4-1* Mutante übernehmen kann. Letztlich scheint dies eine Frage der Expressionsstärke zu sein, denn im Komplementationsansatz konnte nachgewiesen werden, daß nur eine starke Expression von AtPDX1.1 oder AtPDX1.3 den *rsr4-1* Phänotyp komplementieren kann.

Zusätzlich zeigten die beiden Proteine in den Untersuchungen mittels Größenausschlußchromatographie die gleiche Fähigkeit der Komplexbildung an. Zusammenfassend scheinen die beiden Proteine in *A. thaliana* funktionell redundant zu sein. Allerdings zeigte der *gain-of-function* Ansatz auch, daß es einen Unterschied in der Erfassung und Regulation der verschiedenen *AtPDX1* Transkripte gibt. Wie bereits diskutiert, taucht der drastische *-stunted-* Phänotyp nur bei *myc:AtPDX1.3* exprimierenden Pflanzen auf.

Es ist bemerkenswert, daß deutliche Defekte in der Entwicklung und in der Vitamin B6 Biosynthese sehr stark mit AtPDX1.3 in Verbindung stehen und nicht unmittelbar mit AtPDX1.1 (Titiz et al. 2006; Wagner et al. 2006 und in dieser Arbeit). Anscheinend nimmt das AtPDX1.3 Protein in der Vitamin B6 Biosynthese eine wichtigere Funktion ein. Dies deuten auch die Ergebnisse der Untersuchungen an den *P35S:myc:PDX1.3^{normal}* Pflanzen an, welche eine starke Reduktion der *AtPDX1.1* Expression aufwiesen (55 % Reduktion im Vergleich zum Wildtyp), sich jedoch in allen anderen Analysen wie der Wildtyp Col0 verhielten. Die Reduktion der *AtPDX1.1* Expression kann demnach besser von den Pflanzen toleriert werden, als dies bei der *AtPDX1.3* Expression der Fall ist. In dieselbe Richtung weisen auch die Ergebnisse der Analyse von *atpdx1.1* Mutanten bzw. *atpdx1.1/atpdx1.3* Doppelmutanten welche heterozygot für *atpdx1.3* (*atpdx1.1 +/+ atpdx1.3 +/-*) sind, die sich deutlich besser entwickelten als *atpdx1.3* Einzelmutanten (Titiz et al. 2006). Der komplette Verlust von AtPDX1.3 hat somit deutlich drastischere Auswirkungen auf die Pflanze, während ein funktionales *AtPDX1.3* Allel in den *atpdx1.1 +/+ atpdx1.3 +/-* Doppelmutanten eine Wildtyp ähnliche Entwicklung ermöglicht. Wie bereits erwähnt sollte auch hierfür die generell höhere AtPDX1.3 Basisexpression verantwortlich sein. So scheint der Hauptanteil von biosynthetisch aktiven PDX1 Proteinen in der Pflanzenzelle aus AtPDX1.3 Proteinen zu bestehen. Eine Reduktion der AtPDX1.3 Menge wäre demnach auch folgenschwerer für die Vitamin B6 Biosynthese als dies bei AtPDX1.1 der Fall wäre. Eine mögliche andere Erklärung könnte sein, daß die AtPDX1.1 und AtPDX1.3 Proteine mit weiteren anderen Proteinen

Interaktionen eingehen und dadurch unterschiedlich reguliert werden. Die Findung solcher Interaktoren wäre ein interessantes Projekt für zukünftige Untersuchungen.

Eine funktionelle Redundanz von AtPDX1.1 bzw. AtPDX1.3 zu dem AtPDX1.2 Protein war nicht festzustellen. Zwar zeigte AtPDX1.2 gleiche Bindungseigenschaften in den durchgeführten BIFC sowie Pulldown Studien, jedoch konnte in der hier durchgeführten Untersuchung die Überexpression des AtPDX1.2 Proteins weder die Vitamin B6 defiziente *rsr4-1* Mutante komplementieren, noch eine Steigerung der Vitamin B6 Werte in den *P35S:myc:AtPDX1.2* Pflanzen beobachtet werden. Im Gegenteil, die Überexpression des Gens führte sogar zu einem leicht verringerten Vitamin B6 Gehalt (Abbildung 3.7). Im Vergleich der Aminosäuresequenzen von AtPDX1 Proteinen weist AtPDX1.2 zudem die größten Unterschiede auf (Tabelle 1.1). Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß AtPDX1.2 eine zu den AtPDX1.1 und AtPDX1.3 Proteinen gesonderte Funktion ausübt.

Allerdings muß hier angefügt werden, daß ein direkter Nachweis über die Funktionalität des genutzten *P35S:myc:AtPDX1.2* Konstruktes nicht vorhanden ist. Es läßt sich aufgrund der Ähnlichkeit zu den anderen AtPDX1 Proteinen und dem gleichen genutzten Vektor spekulieren, daß die Rettung der *rsr4-1* Mutante durch die eingebrachten *P35S:myc:AtPDX1.1* und *P35S:myc:AtPDX1.3* Konstrukte ein *proof of concept* darstellt, jedoch fehlt ein direkter Nachweis der myc:AtPDX1.2 Aktivität.

4.4 Charakterisierung des *Ginkgo biloba* PDX1 Proteins

In einem Kooperationsprojekt mit Prof. Eckhard Leistner und Dr. Christel Drewke (Institut für Pharmazeutische Biologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, Deutschland) konnte zum ersten Mal eine Analyse des *G. biloba* PDX1 Proteins durchgeführt und eine biosynthetische Aktivität des Proteins indirekt nachgewiesen werden. Dabei wurde belegt, daß die PDX1 Proteine einen sehr hohen Konservierungsgrad zwischen den Spezies *Ginkgo biloba* und *Arabidopsis thaliana* aufweisen (siehe Anhang Tabelle 12.5). Die konservierte Funktion konnte über die durch ektoische Expression des *GbPDX1* Gens erzielte Komplementation der *Arabidopsis rsr4-1* Mutante gezeigt werden. Darüber hinaus konnte in den durchgeführten Interaktionsstudien eine Übereinstimmung der Bindungseigenschaften von GbPDX1 zu den AtPDX Proteinen festgestellt werden. Dies führt zu der Annahme, daß *Ginkgo* und *Arabidopsis* PDX Proteine vergleichbare Proteinkomplexe aufbauen können. Die hohe Homologie in der Struktur und der Aktivität der PDX1 Proteine unterstreicht die Wichtigkeit der Proteine für die Vitamin B6 Biosynthese und damit für den pflanzlichen Metabolismus.

Die ektoische Expression von *GbPDX1* führte allerdings nicht zu einer vollständigen Normalisierung des Vitamin B6 Gehaltes in *Arabidopsis rsr4-1*. Die Pyridoxal- und Pyridoxamingehalte erreichten nur Werte bis 51 % bzw. 77 % des Wildtyp C24 Niveaus (Abbildung 3.15). Die Erhöhung war jedoch für eine Normalisierung des Wachstums, ermittelt im Frischgewicht und in der Wurzellänge (Abbildung 3.14), ausreichend. Die Ergebnisse deuten erneut daraufhin, daß es einen gewissen Toleranzbereich gibt, in welchem die Veränderung des Vitamin B6 Gehaltes keine negativen Folgen für die Pflanzen hat.

Leider konnte in dieser Untersuchung nicht weiter aufgeklärt werden, ob *G. biloba* für weitere *PDX1* Gene kodiert, wie es z.B. bei *A. thaliana* oder Reis (*Oryza sativa*) der Fall ist. Dementsprechend ist es auch unklar, ob es in *Ginkgo* ein Ortholog zu dem *Arabidopsis* PDX1.2 Protein gibt. Die durchgeführte Analyse mit degenerierten *PDX1* spezifischen Primern führte nur zur Klonierung des in dieser Arbeit funktional charakterisierten *GbPDX1* Gens. Hier würde möglicherweise ein Ansatz über einen Southern Blot mit einer *PDX1* spezifischen Sonde weitere Klarheit schaffen.

Darüber hinaus wäre es wichtig, zu erfahren, ob in *G. biloba* ebenfalls ein *PDX2* Gen existiert, und es zu bereits bekannten *PDX2* Proteinen funktional konserviert ist. In diesem Fall wäre es interessant, ob das *GbPDX2* Protein die *Arabidopsis pdx2* Mutante komplementieren kann, wie dies beim *GbPDX1* Protein für die *rsr4-1* Mutante möglich war. Es wurde versucht durch eine PCR mit degenerierten Primern ein *PDX2* Gen in *G. biloba* zu identifizieren. Leider konnte durch die PCR kein *PDX2* spezifisches Amplifikat auf genomischer DNA oder auf RNA detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist nicht weiter verwunderlich, da jedes der bisher in den verschiedenen Organismen identifizierten *PDX2* Gene im Gegensatz zu den bekannten *PDX1* Genen Intronbereiche enthält und einen viel geringeren Konservierungsgrad in der Nukleotidstruktur aufweist. Es scheint also zum jetzigen Zeitpunkt keine Hinweise auf die Existenz eines *GbPDX2* Gens zu geben. Allerdings ist zu erwarten, daß *G. biloba* mindestens für ein *GbPDX2* kodiert, da alle bisherigen Arbeiten zum DXP-unabhängigen *de novo* Syntheseweg in *P. falciparum*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* und in *A. thaliana* gezeigt haben, daß ein solches Protein benötigt wird (Dong et al. 2004; Raschle et al. 2005; Tambasco-Studart et al. 2005; Wrenger et al. 2005; Tambasco-Studart et al. 2007). Möglicherweise wird in Zukunft eine Sequenzierung des *G. biloba* Genoms die Frage nach der Existenz eines *GbPDX2* Gens eindeutig beantworten.

Die Analyse der *GbPDX1* Expression über Northern Blot zeigte, daß im Samen die größte *GbPDX1* Transkriptmenge vorhanden ist (Abbildung 3.13). 4'-O-Methylpyridoxin (Ginkgotoxin), ein nicht funktionales Vitamin B6 Derivat, welches unter anderem beim Menschen zu neuronalen Störungen führt (siehe 1.1.3), konnte ebenfalls in der höchsten Konzentration im Samen gefunden werden (Wada et al. 1985; Arenz et al. 1996). Diese Beobachtung läßt die Hypothese zu, daß es einen Zusammenhang zwischen der Vitamin B6 Biosyntheseaktivität und der Menge an synthetisierten Ginkgotoxin gibt.

Allerdings konnte die entsprechende Methylase, die eine Methylierung von Vitamin B6 zu 4'-O-Methylpyridoxin vermittelt, bisher nicht identifiziert werden. In Zukunft wäre es sicherlich wichtig, das entsprechende Enzym zu identifizieren und zu charakterisieren. Das Verstehen und die Aufklärung des gesamten Ginkgotoxin Synthesewegs ist für die Humanmedizin von großem Interesse, da der Baum viele wirksame sekundäre Pflanzenstoffe bildet. Unter ihnen befinden sich verschiedenste Stoffe, die im Gespräch sind, bei der Alzheimer Krankheit oder Erkrankungen des Herzkreislaufsystems zu helfen (Stoll et al. 1996; Maurer et al. 1997; Yoshikawa et al. 1999). Der Baum ist reich an Flavonoiden, welche freie

Radikale reduzieren können. Ebenfalls kommen Terpenoiden wie z.B. Ginkgolide oder Bilobalide vor, die entzündungshemmende Wirkung besitzen (Martin et al. 1994). Darüber hinaus können sie den sogenannten plättchenaktivierenden Faktor (PAF) hemmen (Braquet und Bourgain 1987). PAF ist ein Phospholipid, welches unter anderem die Aggregation von Thrombozyten im menschlichen Blut auslöst und bei verminderter Hemmung die Schwere von anaphylaktischen Reaktionen beeinflusst (Vadas et al. 2008). Diese Pflanzenstoffe sind aber schwierig zu gewinnen, da in verwendeten *Ginkgo* Blatt- und Samengeweben auch das giftige Ginkgotoxin vorhanden ist. Das Verständnis über die Biosynthese von Ginkgotoxin könnte helfen, eine Akkumulation des Giftes in bestimmten Geweben zu verhindern, und damit therapeutisch wichtige Pflanzenstoffe besser zugänglich zu machen.

4.5 Funktionale Charakterisierung des *Arabidopsis thaliana* PDX1.2 Proteins

Dem *Arabidopsis* AtPDX1.2 Protein kommt in der Gruppe der bekannten AtPDX1 Proteine eine besondere Bedeutung zu. Beispielsweise zeigte das Protein Interaktionen mit anderen AtPDX1 Proteinen, jedoch nicht mit AtPDX2. Basierend auf *in vitro* Enzymaktivitätsstudien scheint AtPDX1.2 nicht an der Vitamin B6 Biosynthese beteiligt zu sein. Allerdings ist AtPDX1.2 auf der Proteinebene nur zu rund 60 % identisch zu den AtPDX1.1 und AtPDX1.3 Proteinen. Im Vergleich dazu beträgt die Übereinstimmung von AtPDX1.1 zu AtPDX1.3 fast 90 % (Tabelle 1.1).

4.5.1 Hinweise auf eine embryospezifische Aktivität des AtPDX1.2 Proteins

Die Analysen der AtPDX1 Komplexe sowie des AtPDX1.2 *gain-of-function* Ansatzes erbrachten einige neue Erkenntnisse über das AtPDX1.2 Protein. Das Protein konnte in der Pflanzenzelle in hochmolekularen Komplexen beobachtet werden, was zusammen mit den Interaktionsdaten darauf hindeutet, daß AtPDX1.2 die Fähigkeit besitzt, als Untereinheit in AtPDX1 Dodekameren vorzukommen. Das Protein ließ sich in *A. thaliana* gut überexprimieren und es zeigte sich, daß eine Erhöhung der Expression keine oder nur geringe Effekte in der Vitamin B6 Biosynthese bzw. auf den Phänotyp der transgenen Pflanzen auslöste. Leider ließ sich dadurch keine genaue Funktion des AtPDX1.2 Proteins ableiten. Der nachfolgend gewählte *loss-of-function* Ansatz deutet jedoch an, daß AtPDX1.2 eine essentielle Funktion in die Entwicklung von *A. thaliana* ausübt.

So konnte für die *AtPDX1.2* Insertionslinie (*atpdx1.2-1*; Tabelle 2.2; Abbildung 3.21) beobachtet werden, daß heterozygote *atpdx1.2-1* Pflanzen (*atpdx1.2-1 +/-*) in der nachfolgenden Generation nur *atpdx1.2-1 +/-* oder Wildtyppflanzen erzeugten. Eine homozygote *atpdx1.2-1* Mutante wäre demnach nicht lebensfähig und es ist denkbar, daß ein embryonal letaler Phänotyp vorliegt. Die Beobachtungen an den durchgeführten Kreuzungen mit dem Wildtyp wiesen zusätzlich auf eine erhöhte Gametensterblichkeit bei den *atpdx1.2-1* Pflanzen hin (Tabelle 3.3). Jedoch müßten für eine definitive Aussage weitere Analysen zur Gametenvitalität, wie z.B. Studien zum Pollenkeimungsverhalten, durchgeführt werden.

Eine zusätzlich durchgeführte Kreuzung von *atpdx1.2-1* Pflanzen mit den beiden *AtPDX1* *atpdx1.1* und *atpdx1.3* Mutanten brachte ebenfalls keine neuen Erkenntnisse, da hier

erwartungsgemäß ebenfalls keine homozygoten *atpdx1.2-1* Nachkommen beobachtet werden konnten (siehe Anhang Tabelle 12.3). Es ist jedoch anzumerken, daß es im *AtPDX1.2* Antisense Ansatz ebenfalls nicht gelang, effektive und stabile *AtPDX1.2* Antisense Linien zu generieren. Es ist denkbar, daß die Herabregulation des *AtPDX1.2* Transkriptes starke Effekte in den transgenen Pflanzen auslösen konnte. Möglicherweise überlebten nur die Pflanzen, welche in einer Gegenreaktion eine *de novo* Methylierung des antisense Konstruktes durchführten, sodaß lediglich Pflanzen ohne *AtPDX1.2* Antisense-Effekt in der T2 Generation beobachtet werden konnten. Ähnliche Effekte und Reaktionen auf die Expression von Transgenen in Pflanzen werden ausführlich bei Matzke und Matzke (1993; 1995) beschrieben. Der Antisense Ansatz könnte nach dieser Betrachtung ebenfalls auf einen letalen Effekt einer *AtPDX1.2* Defizienz hinweisen.

Die lichtmikroskopische Analyse von *atpdx1.2-1* Samen bestätigte eine Störung in der Embryogenese. Es konnte gezeigt werden, daß die Embryonen sich nicht über das globuläre-Stadium hinaus entwickelten und später degenerierten (Abbildung 3.23). Da die durchgeführten Segregationsanalysen auf eine klare Kopplung zwischen Embryo-Letalität und T-DNA Insertion hindeuten, scheint der Abbruch der Embryonalentwicklung auf den Verlust von *AtPDX1.2* zurückzuführen zu sein. Das *AtPDX1.2* Protein könnte folglich in der Embryogenese beim Übergang vom globulärem-Stadium zum Herz-Stadium eine entscheidende Rolle spielen.

Die Analyse der subzellulären *AtPDX1.2* Expression bzw. Lokalisation mittels eines *AtPDX1.2*:GFP Fusionsproteins unter der transkriptionellen Kontrolle des natürlichen *AtPDX1.2* Promotors bestätigte die Annahme, daß *AtPDX1.2* in der frühen Embryogenese exprimiert wird. So konnte die spezifische Lokalisation des *AtPDX1.2*:GFP Fusionsproteins in jungen Embryonen des globulären Entwicklungsstadiums nachgewiesen werden (Abbildung 3.24). Interessanterweise zeigte sich eine starke Expression, speziell im basalen Teil des Embryos. In der späteren Embryonenentwicklung konnte ebenfalls eine hohe Expression von *AtPDX1.2*:GFP im Embryo ermittelt werden. Hierbei zeigten Embryonen im Torpedo-Stadium eine vermehrte Lokalisation des Proteins im Wurzelmeristem (Abbildung 3.24 F). Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß *AtPDX1.2* im Embryo in dem sich bildenden Wurzelgewebe eine Funktion innehat. Dies steht in Übereinstimmung mit den Expressionsdaten älterer *A. thaliana* Pflanzen, in denen die stärkste *AtPDX1.2* Expression

ebenfalls in der Wurzel nachgewiesen werden konnte (Leuendorf 2006; Titiz et al. 2006; Wagner et al. 2006).

Leider konnte in dieser Arbeit nicht der Beweis erbracht werden, daß es sich bei dem Phänotyp der *atpdx1.2-1* Pflanzen ausschließlich um eine *AtPDX1.2* Defizienz handelt. So konnte die Expression des *P35S:myc:AtPDX1.2* Konstruktes in den *atpdx1.2-1* Pflanzen keine Komplementation des Phänotyps bewirken (Daten nicht gezeigt). Eine Hypothese ist, daß der verwendete *P35S* Blumenkohl Mosaik Virus Promotor der Grund für ein Scheitern des Komplementationsansatzes war. Es konnte in diversen Arbeiten gezeigt werden, daß der *P35S* Promotor im wachsenden Embryo erst ab dem Herz-Stadium eine transkriptionelle Aktivität aufweist (Odell et al. 1994; Volker et al. 2001). Die betroffenen Embryonen der *atpdx1.2-1* Linie zeigten aber bereits im früheren globulären-Stadium einen Entwicklungsstopp. Der Mangel an *AtPDX1.2* Transkript bzw. *AtPDX1.2* Protein konnte in dieser Entwicklungsphase möglicherweise nicht mit dem *P35S:myc:AtPDX1.2* Konstrukt behoben werden. Ein weiteres Problem des durchgeführten Komplementationsansatzes könnte das an *AtPDX1.2* fusionierte myc-Epitop gewesen sein. In dieser Arbeit konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, daß die Fusion die Funktionalität von *AtPDX1.2* nicht beeinträchtigt. Aus diesem Grund sollte in einem erneuten Komplementationsansatz darauf geachtet werden, daß ein unfusioniertes *AtPDX1.2* Gen unter einer anderen transkriptionellen Kontrolle als dem *P35S* Promotor in den *atpdx1.2-1* Pflanzen exprimiert wird. Es würde sich dafür der natürliche *AtPDX1.2* Promotor anbieten. Eine andere Möglichkeit wäre die Expression des *AtPDX1.2* Gens über diverse embryospezifische Promotoren, wie z.B. dem Promotor des *A. thaliana* Lipid Transfer Proteins 1 (*AtLPT1*), der seine transkriptionelle Aktivität bereits im globulärem-Stadium aufweist (Thoma et al. 1994; Vroemen et al. 1996). Im Falle einer *atpdx1.2-1* Komplementation könnte man dann durch die Spezifität von verschiedenen embryospezifischen Promotoren zusätzlich das genaue Entwicklungsstadium und den genauen Funktionsort, in dem die *AtPDX1.2* Aktivität benötigt wird, aufklären.

Es sollte allerdings angeführt werden, daß bereits Untersuchungen an einer *AtPDX1.2* Insertionslinie durchgeführt wurden, die zu der Analyse von *atpdx1.2-1* abweichenden Ergebnissen führte. Die in der Doktorarbeit von Rueschhoff verwendete *AtPDX1.2* Insertionslinie (SALK_148199.19.20.x; Abbildung 3.21; Tabelle 2.2) zeigte nicht die bei den

atpdx1.2-1 Pflanzen beobachteten Entwicklungsdefekte. Die Mutante wies zudem keine Veränderung im Vitamin B6 Gehalt auf (Rueschhoff 2010). Eine Überprüfung des Insertionsortes der SALK_148199.19.20.x Linie in der vorliegenden Arbeit zeigte, daß die SALK T-DNA Kasette direkt vor dem *ATPDX1.2* Stopcodon lokalisiert ist (siehe Anhang Abbildung 12.2). Die Konsequenz ist ein C-terminal um 9 Aminosäuren vergrößertes AtPDX1.2 Protein. Es scheint sich deshalb nicht um eine wirkliche *AtPDX1.2* Nullmutante zu handeln. Die mit der *AtPDX1.2* SALK Linie in der Arbeit von Rueschhoff (2010) gewonnenen Ergebnisse sollten deshalb mit Bedacht verwendet werden.

4.5.2 Die Funktion von AtPDX1.2 in *Arabidopsis thaliana*

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten über die embryonale Lokalisation von AtPDX1.2 und die abnorme Embryonalentwicklung der *atpdx1.2-1* Mutante, weisen darauf hin, daß das Protein eine wichtige Rolle für das Überleben bzw. für die Entwicklung von *A. thaliana* spielt. AtPDX1.2 zeigt in den durchgeführten Interaktionsstudien über Y2H Ansätze, *in vitro* Pulldown Ansätze und BIFC Analysen (Wagner et al. 2006 und diese Arbeit) Bindungen mit allen anderen AtPDX1 Proteinen. Ebenfalls zeigen die Untersuchungen mittels Größenchromatographie und BNP, daß AtPDX1.2 in hochmolekularen Komplexen vorkommt, die etwa der Größe eines AtPDX1 Dodekamers bzw. eines Dodekamers mit zusätzlich angelagerten AtPDX2 Proteinen entsprechen. AtPDX1.2 könnte demnach das Potential besitzen, mit den anderen AtPDX Proteinen in einem hochmolekularen PLP-Synthasekomplex zu stehen.

Zusätzlich wird die Expression des *AtPDX1.2* Gens deutlich durch Stress reguliert. Transkriptomanalysen zeigten eine Induzierbarkeit des Gens bei der Behandlung von *Arabidopsis* mit dem Herbizid Norflurazon (www.genevestigator.com/gv [Genevestigator]). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit die Induzierbarkeit der *AtPDX1.2* Expression durch erhöhte Temperaturen demonstriert werden. Hierbei ist beachtlich, wie schnell die Expression von *AtPDX1.2* induziert wird, und unter erhöhten Temperaturbedingungen konstant stabil bleibt (Abbildung 3.17). Eine vergleichbare schnelle Initiation der Transkription findet man bei Hitzeschockproteinen (Hsp) (Waters 1995; Li et al. 1999). Viele Hsp Proteine sind molekulare Chaperone, die eine Denaturierung von Proteinen unter Stressbedingungen (z.B. Hitzeschock) unterbinden, indem sie Aggregatbildungen auflösen bzw. die natürliche Faltung der Proteine erleichtern (Sheffield et al. 1990). Im Gegensatz zu

AtPDX1.2 konnte allerdings für bestimmte Hsp70 Proteine in *Arabidopsis* nachgewiesen werden, daß auf die stressbedingte Induktion der Expression direkt eine Abnahme der Expression erfolgt (Sung et al. 2001).

Die Untersuchungen an dem AtPDX1.2 Protein bestätigten, daß AtPDX1.2 nach einem Hitzeschock auch auf Proteinebene vermehrt exprimiert wird und, daß nach der Beendigung des Hitzestresses das Proteinniveau über die nächsten Stunden konstant hoch bleibt (Abbildung 3.18). AtPDX1.2 könnte demnach nicht nur in der Embryogenese eine Funktion ausüben, sondern auch in der Antwort auf Stressbedingungen. Im Speziellen könnte AtPDX1.2 eine Rolle beim Schutz gegen erhöhte Temperaturen oder oxidativen Stress spielen. Auf eine Schutzrolle gegen ROS kann auch die langandauernde AtPDX1.2 Präsenz nach Beendigung des Hitzestresses hindeuten, da hier ein Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies zu erwarten ist (Jung et al. 2000; Larkindale und Knight 2002; Saini et al. 2011). Die Beobachtung einer erhöhten *AtPDX1.2* Transkription bei Ozon-Stress (Denslow et al. 2007), welcher ebenfalls zu einem erhöhten ROS Level führt (Langebartels et al. 2002), unterstützt die diskutierte Schutzrolle von AtPDX1.2. ROS können eine stark zellschädigende Wirkung haben, die bis hin zum Zelltod führen kann (Larkindale und Knight 2002; Van Breusegem und Dat 2006). Da Vitamin B6 als sehr potentes Antioxidant gilt (siehe 1.1.2.2), wäre hier eine mögliche Verbindung zwischen der erhöhten AtPDX1.2 Transkription und der Vitamin B6 Funktion zu sehen. Allerdings ist nicht klar, inwieweit eine erhöhte *AtPDX1.2* Expression vorteilhaft für die Vitamin B6 Biosyntheserate sein könnte, da außer den Bindungsstudien kein Zusammenhang zu der Vitamin B6 *de novo* Synthese zu finden ist. Die in dieser Arbeit generierten *AtPDX1.2* Überexpressionspflanzen, die gegenüber dem Wildtyp einen leicht geringeren Vitamin B6 Gehalt aufwiesen, deuten sogar eher auf einen negativen Einfluss von AtPDX1.2 auf die Vitamin B6 Synthese hin (Abbildung 3.7). Es erscheint daher wahrscheinlicher, daß die erhöhte AtPDX1.2 Expression von der Vitamin B6 Biosynthese abgekoppelt ist. Auch deshalb bleibt es unklar, wie AtPDX1.2 den Schutz gegen ROS im Detail vermittelt.

Eine andere interessante Option wäre, daß AtPDX1.2 eine schützende Funktion gegenüber dem gezielten Abbau von AtPDX1.1 und AtPDX1.3 Proteinen ausübt. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß AtPDX1 Proteine scheinbar nicht als Monomere auftreten, sondern fast ausschließlich in hochmolekularen Komplexen vorliegen. Möglicherweise werden ungebundene, nicht in den hochmolekularen Komplexen stehende AtPDX1 Proteine,

gezielt abgebaut. Da eine Polyubiquitinierung oft zu einem gezielten Abbau über den 26S Ubiquitin-Proteasomweg führt (Vierstra 2009), könnte der publizierte Nachweis von ubiquitinierten AtPDX1.1 und AtPDX1.3 Proteinen diese Annahme unterstützen (Manzano et al. 2008; Igawa et al. 2009; Saracco et al. 2009). AtPDX1.2 besitzt die Fähigkeit, mit den anderen AtPDX1 Proteinen im Komplex zu stehen (in Teil 4.2 diskutiert), daher könnte eine erhöhte AtPDX1.2 Expression zu einer vermehrten Bildung von AtPDX1 Dodekameren führen. AtPDX1.1 und AtPDX1.3 Proteine würden damit vermehrt in hochmolekulare Komplexe gebunden und vor dem Abbau geschützt. Geht man von einer prozentualen Erhöhung der in Komplexen geschützten AtPDX1.1 und AtPDX1.3 Proteinen aus, wäre es möglich, daß sich die Vitamin B6 Biosyntheserate erhöht. Dies könnte einen positiven Effekt speziell bei ROS Stress haben.

Allerdings sollte betont werden, daß diese Annahme sehr spekulativ ist. Es müßte erst bewiesen werden, daß die Ubiquitinierung der AtPDX1.1 und AtPDX1.3 Proteine destabilisierend wirkt und, daß sich die Anzahl von AtPDX1 Dodekameren in der Pflanzenzelle bei einer vermehrten AtPDX1.2 Expression erhöht. Weiterhin bleibt es unklar, ob eine vermehrte Vitamin B6 Synthese von den gebildeten Dodekamer ausgeht, da schließlich AtPDX1.2 als nicht biosynthetisch aktives Protein ein Hauptanteil des Komplexes ausmacht.

Es war leider nicht möglich eine definitive Aussage über die Funktion des AtPDX1.2 Proteins zu treffen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen geben aber Hinweise und machen den Weg frei für weitere Untersuchungen, die zu einer Aufklärung der AtPDX1.2 Proteinfunktion führen könnten.

4.6 Charakterisierung des AtPDX1 Interaktors At5g65840

Die Funktion der AtPDX1 und AtPDX2 Proteine in der *de novo* Vitamin B6 Synthese ist bereits recht gut charakterisiert worden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten zu neuen AtPDX1 Interaktoren zeigen, daß es möglicherweise neue Funktionen der AtPDX Proteine gibt, die nicht unmittelbar mit der Vitamin B6 Biosynthese zusammenhängen.

Es wurde mit verschiedenen Ansätzen der neu gefundene Interaktor At5g65840 untersucht, und versucht, Erklärungsansätze zur Funktion des Proteins zu liefern.

4.6.1 Allgemeine Beschreibung des At5g65840 Proteins

Das At5g65840 Protein wird als mögliche Alkyl-Hydroperoxid Reduktase und Thiol-spezifisches Antioxidant beschrieben (IPR000866, *EMBL-EBI*). Diese Proteine gehören zu dem antioxidativen Schutzmechanismus der Zelle und bauen reaktive Schwefelverbindungen ab bzw. formen reaktive Alkyl-Hydroperoxide in ihren korrespondierenden Alkohol um.

In der vorangegangenen Arbeit von Liese (2007), konnte gezeigt werden, daß *At5g65840* im Blatt-, Stängel- und Blütengewebe exprimiert wird. *At5g65840* wurde aufgrund von Sequenzanalysen als chloroplastidär lokalisiert eingestuft (*TAIR*). In einer Analyse von chloroplastidären Proteinen konnte zudem das Protein im Stroma von Chloroplasten nachgewiesen werden (Zybailov et al. 2008). Die in der vorgelegten Arbeit durchgeführten Untersuchung zur Lokalisation mit Hilfe eines *At5g65840:GFP* Fusionsproteins zeigten ebenfalls, daß das Protein ausschließlich im Chloroplasten vorhanden ist (Abbildung 3.29 B).

Das *At5g65840* Protein wird in den öffentlichen Datenbanken nicht als Mitglied einer Genfamilie beschrieben (*EMBL-EBI*). In *A. thaliana* wird aufgrund der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz als nächstverwandtes Protein *At2g37240* angegeben (34 % Identität der Aminosäuresequenz gegenüber *At5g65840*; *TAIR*). Interessanterweise zeigen die beiden Proteine einige übereinstimmende Eigenschaften auf. *At2g37240* ist wie *At5g65840* chloroplastidär lokalisiert beschrieben (*TAIR*) und konnte im plastidären Stroma nachgewiesen werden (Zybailov et al. 2008). Darüber hinaus wird *At2g37240* ebenfalls als mögliche Alkyl-Hydroperoxid Reduktase und Thiol-spezifisches Antioxidant beschrieben (IPR000866; *EMBL-EBI*). Die beiden Gene zeigten zudem die gleiche transkriptionelle Regulation in der *dpa1* Mutante, die einen Defekt in der ATP Synthase besitzt und erhöhtes *non-photochemical quenching* zeigte (Bosco et al. 2004).

Alkyl-Hydroperoxid Reduktasen oder Thiol-spezifische Antioxidantien erfüllen oft ihre Funktion als Homodimere oder Oligomere (Chae et al. 1994; Papinutto et al. 2005). Allerdings konnte die Fähigkeit zur Selbstinteraktion von At5g65840 in den durchgeführten Y2H Bindungsstudien nicht gesehen werden (Abbildung 3.25). At5g65840 konnte ebenfalls nicht mit dem ähnlichen Protein At2g37240 interagieren (siehe Anhang Abbildung 12.5). Die beobachtete Interaktion von At5g65840 mit den AtPDX1 Proteinen könnte deswegen von besonderer Bedeutung sein. Möglicherweise ist die Interaktion eine Voraussetzung für eine Aktivität von At5g65840.

Die untersuchte At5g65840 Insertionsmutante (*at5g65840-1*) sowie die *P35S:At5g65840:myc* Überexpressionspflanzen wiesen keine phänotypischen Defekte auf. So zeigten die Pflanzen keine Veränderungen im Wuchs bzw. in der Entwicklung (Daten nicht gezeigt). Die Kreuzungen der *at5g65840-1* Pflanze mit den AtPDX1 Mutanten *atpdx1.1* und *atpdx1.3* brachten ebenfalls ausschließlich normal entwickelte Pflanzen hervor (Daten nicht gezeigt). Allerdings sollte betont werden, daß die Pflanzen im Gewächshaus unter stressfreien Wachstumsbedingungen angezogen wurden. Da Antioxidantien ihre Funktion z.B. bei der Abwehr gegen reaktive Sauerstoffverbindungen erfüllen, wäre ein Defekt in den *at5g65840-1* Pflanzen bzw. ein positiver Effekt in *P35S:At5g65840:myc* Pflanzen wahrscheinlich erst unter Wachstumsbedingungen zu beobachten, die einen erhöhten oxidativen Stress hervorrufen. Als Beispiel wären hier Bedingungen wie Hitzestress, Salzstress oder osmotischer Stress (Miller et al. 2008) zu nennen. Ein weiterer Aspekt ist die relativ hohe Anzahl, von 9 Proteinen, die in *Arabidopsis* als Alkyl-Hydroperoxid Reduktase und Thiol-spezifisches Antioxidant eingeordnet werden (IPR000866; *EMBL-EBI*). Bei einer redundanten Funktion könnten die Proteine die Rolle von At5g65840 übernehmen.

Es wäre in zukünftigen Arbeiten wichtig eine genaue Analyse der *at5g65840-1* Einzel- sowie der Doppelmutanten (*at5g65840-1:atpdx1.1*; *at5g65840-1:atpdx1.3*) unter oxidativen Stressbedingungen zu testen. Ebenfalls wäre es interessant, Mehrfachmutanten von *at5g65840-1* mit den in *Arabidopsis* als Alkyl-Hydroperoxid Reduktase und Thiol-spezifisches Antioxidant beschriebenen Proteinen anzufertigen.

4.6.2 Möglicher funktioneller Zusammenhang von At5g65840 und den AtPDX1 Proteinen

Die Bindung von At5g65850 an die AtPDX1 Proteine in den durchgeführten Y2H und *in vitro* Pulldown Ansätzen legt nahe (Abbildung 3.25, Abbildung 3.26), daß ein Zusammenhang

zwischen den bindenden Proteinen zu vermuten ist. Dagegen zeigt At5g65840 keine Interaktion mit dem AtPDX2 Protein. Demnach ist die Interaktion spezifisch auf die AtPDX1 Proteine beschränkt. Interessanterweise konnte At5g65840 ebenfalls mit dem AtPDX1.2 Protein interagieren. Scheinbar gibt es bestimmte übereinstimmende Bindemotive in allen AtPDX1 Proteinen. Die beobachtete Interaktion von At5g65840 mit dem funktionale AtPDX1.3 Protein und nicht mit dem aufgrund einer Punktmutation unfunktionalen AtPDX1.3^{G54S} Protein der *rsr4-1* Mutante könnte darauf hinweisen, daß der mutierte Bereich bzw. die korrekte Faltung des Proteins wichtig für eine Bindung ist. AtPDX1.3^{G54S} hat die Fähigkeit verloren, mit den anderen AtPDX Proteinen zu interagieren (Wagner et al. 2006). So ist es wahrscheinlich, daß dieses Protein aufgrund der Mutation eine falsche Faltung aufweist und deshalb die Interaktionen mit AtPDX bzw. At5g65840 nicht mehr eingeht. Es ist allerdings ungewiss, ob die Bindung von At5g65840 an die AtPDX1 Proteine zu einer neuen Funktion der AtPDX1 Proteinen führen kann. Denkbar wäre, daß At5g65840 als Alkyl-Hydroperoxid Reduktase und Thiol-spezifisches Antioxidant Vitamin B6 in Form von PLP als Kofaktor benötigt oder PLP die Funktion des Proteins unterstützt. At5g65840 könnte den benötigten Kofaktor direkt vom Vitamin B6 Synthasekomplex übernehmen, wie dies bereits für ein anderes PLP abhängiges Enzym beschrieben wurde (Moccand et al. 2011). Die AtPDX1 Proteine würden in diesem Fall direkt die Aktivität von At5g65840 beeinflussen.

Zum jetzigen Zeitpunkt stellt allerdings die chloroplastidäre Lokalisation von At5g65840 einen Widerspruch zu den Ergebnissen der Interaktionsstudie dar. Die Interaktion mit den AtPDX1 Proteinen würde erfordern, daß AtPDX1 Proteine ebenfalls im Chloroplasten vorhanden sind. Arbeiten verschiedener Gruppen haben jedoch gezeigt, daß AtPDX1 Proteine vorwiegend im Cytosol lokalisiert sind (Chen und Xiong 2005; Tambasco-Studart et al. 2005; Leuendorf 2006; Denslow et al. 2007). Aufgrund dieser Arbeiten ist daher zu erwarten, daß das At5g65840 Protein subzellulär nicht in räumlicher Nähe zu AtPDX1 steht und daher in der Pflanzenzelle wahrscheinlich keine Interaktion stattfindet. Allerdings wird das AtPDX1.3 Protein auch als Membran-assoziiert beschrieben (Chen und Xiong 2005; Denslow et al. 2007; Chen und Xiong 2009; Ristilä et al. 2011). Das Protein wurde sowohl in der Kernhüllmembran als auch in der Chloroplastenmembran nachgewiesen. Darüber hinaus gibt es Hinweise, daß das AtPDX1.1 Protein im Stroma von Chloroplasten vorhanden ist (Zybailov et al. 2008).

Es bleibt deshalb unklar, inwieweit die beobachteten Interaktionen wirkliche physiologische Relevanz haben oder ob sie Artefakte der Y2H und *in vitro* Pulldown System darstellen. Die diskutierten AtPDX1 Lokalisationen könnten allerdings darauf hinweisen, daß zwischen AtPDX1 und At5g65840 Proteinen auch in der Pflanzenzelle eine Bindung möglich ist. Es ist darüber hinaus auffällig, daß in der Arbeit von Rueschhoff (2010) ebenfalls eine Oxidoreduktase (*At3g28670* ;Tabelle 1.2) als AtPDX1.3 Interaktionspartner identifiziert werden konnte. Die Interaktionen von AtPDX1 Proteinen mit dem At5g65840 Protein scheint demnach wahrscheinlicher. Um eine sichere Aussage über die Interaktion treffen zu können, sollte in zukünftigen Arbeiten *in planta* Interaktionsuntersuchungen, wie beispielsweise mit dem BIFC System oder ein Kolokalisationsansatz mit anschließender Koimmunopräzipitation durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Vitamin B6 übt in Form von Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP) als Kofaktor eine entscheidende Funktion für viele essentielle enzymatische Reaktionen in diversen Stoffwechselwegen aus und ist damit unverzichtbar für alle Organismen. Pflanzen, Pilze, Archaeen und einige Bakterien besitzen die Fähigkeit, Vitamin B6 selbst herzustellen. Tierische Organismen, der Mensch eingeschlossen, können dagegen Vitamin B6 nicht neu synthetisieren und sind auf dessen Aufnahme durch die Nahrung angewiesen. In Pflanzen wird das Vitamin durch die Aktivität der Enzyme PDX1 und PDX2 gebildet. In der vorliegenden Arbeit wurde die pflanzliche Vitamin B6 Biosynthese in *Arabidopsis thaliana* und *Ginkgo biloba* untersucht und wichtige Informationen über die Funktion der PDX Proteine erlangt.

A. thaliana kodiert für drei PDX1 Proteine, AtPDX1.1, AtPDX1.2 und AtPDX1.3, sowie ein PDX2 Protein. Anhand von *AtPDX* Überexpressionslinien konnte gezeigt werden, daß der Gehalt an Vitamin B6 im Blattgewebe durch die ektopische Expression eines einzelnen AtPDX1 Proteins, AtPDX1.1, signifikant erhöht werden kann. Dagegen führte die ektopische Expression von AtPDX1.3 zu lichtsensiblen Pflanzen mit einem verringerten Vitamin B6 Gehalt und stark veränderten Metabolitwerten.

Analysen der AtPDX1 und AtPDX2 Proteine durch Größenausschlußchromatographie und Blue Native Page zeigten, daß die Proteine in hochmolekularen Komplexen in der Pflanzenzelle vorliegen. Die Untersuchungen mit dem BIFC System wiesen zudem nach, daß die AtPDX1 Proteine in homomeren und heteromeren Komplexen *in planta* vorliegen können. Die Daten geben damit erstmals Hinweise auf die Bildung einer pflanzlichen PLP Synthase. Überraschenderweise konnte das biosynthetisch inaktive AtPDX1.2 Protein ebenfalls in hochmolekularen Komplexen nachgewiesen werden, was eine Bedeutung des Proteins in PLP Synthasekomplexen denkbar macht. Die weiteren Untersuchungen an AtPDX1.2 weisen zudem auf eine Beteiligung des Proteins an Vorgängen in der Embryogenese sowie bei der zellulären Stressantwort hin.

Darüber hinaus konnte At5g65840 als AtPDX1 Interaktor bestätigt werden und könnte somit neue Funktionen für AtPDX1 aufzeigen. At5g65840 ist als putative Alkyl-Hydroperoxid Reduktase und Thiol-spezifisches Antioxidant beschrieben und könnte daher zusammen mit AtPDX1 Proteinen eine wichtige Rolle unter Stressbedingungen spielen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde zum ersten Mal eine Analyse des Vitamin B6 biosynthetisch aktiven PDX1 Proteins von *G. biloba* durchgeführt. Die PDX1 Proteine von *Ginkgo* und *Arabidopsis* weisen einen hohen Konservierungsgrad auf, der durch eine phänotypische Komplementation der Vitamin B6 defizienten *Arabidopsis rsr4-1* Mutante bestätigt werden konnte. Zudem zeigen die PDX1 Proteine der beiden Spezies eine hohe Übereinstimmung in ihren Bindungseigenschaften. Die subzelluläre Expression von *GbPDX1* in *G. biloba* weist darüber hinaus auf eine Kopplung der Vitamin B6 Biosyntheseaktivität und dem 4'-O-methylpyridoxine-(Ginkgotoxin)-gehalt, was für das Verständnis der Ginkgotoxinbildung einen wichtigen Schritt darstellt.

Insgesamt zeigen die in der vorgelegten Arbeit gesammelten Daten die Wichtigkeit der PDX Proteine für die Vitamin B6 Biosynthese und unterstreichen damit deren Bedeutung für den pflanzlichen Metabolismus.

6 Summary

Vitamin B6 is an important compound for all living organisms and serves as pyridoxal 5'-phosphate (PLP) as an enzymatic cofactor for a broad range of biochemical reactions. Plants, fungi, archaea and some bacteria are able to *de novo* synthesize vitamin B6, whereas animals, including humans, rely on the external supply of the vitamin B6. In plants, the vitamin B6 is synthesized by the action of PDX1 and PDX2 proteins. The present work provides new information about plant PDX proteins and their function in vitamin B6 biosynthesis of *Arabidopsis thaliana* and *Ginkgo biloba*.

Arabidopsis encodes for three different PDX1 proteins, named AtPDX1.1, AtPDX1.2 and AtPDX1.3 but only for one AtPDX2 protein. Analysis of plants overexpressing the different AtPDX proteins show that ectopic expression of AtPDX1.1 protein is sufficient to significantly increase the vitamin B6 content in *Arabidopsis* leaves. Interestingly, ectopic expression of specifically *AtPDX1.3* caused a light sensitive plant phenotype, as well as reduced vitamin B6 levels and widely changed metabolite profile.

Size exclusion chromatography and blue native page analysis revealed that AtPDX1 and AtPDX2 proteins assemble in high molecular weight complexes. By using BIFC technology, *in planta* assembly of the different AtPDX1 proteins was demonstrated. This allows postulation of homomeric and heteromeric AtPDX1 complexes. The data provide first insights into plant vitamin B6 PLP synthase complex formation. Noteworthy, AtPDX1.2 is also present in the described high molecular order complexes, although it has no vitamin B6 biosynthetic activity *in vitro*. This suggests a role of AtPDX1.2 in the PLP synthase complex. Further studies on AtPDX1.2 connect the function of the protein with embryo development and cellular stress response.

The work on the AtPDX1 binding protein At5g65840 suggests new functions for AtPDX1 proteins. At5g65840 is described as a putative alkyl-hydroperoxide reductase und thiol-specific antioxidant, and it is potentially possible that AtPDX1 and At5g65840 proteins are connected in their function in abiotic stress response.

The second part of this thesis focuses on the functional characterization of a GbPDX1 protein. *Ginkgo* and *Arabidopsis* PDX1 proteins show a high degree of functional conservation which was demonstrated by yeast-two-hybrid assays and functional

complementation of the *Arabidopsis PDX1.3* mutant *rsr4-1*. Furthermore the high expression of *GbPDX1* in *G. biloba* tissues with increased amounts of 4'-O-methylpyridoxine (ginkgotoxin) leads to the assumption, that the formation of ginkgotoxin depends on the rate of vitamin B6 biosynthesis.

Overall the work presented in this thesis underscores the significance of PDX proteins for vitamin B6 biosynthesis and whole metabolism in plants.

7 Literaturverzeichnis

- Alonso, J. M., A. N. Stepanova, T. J. Leisse, C. J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk, C. Gadriab, C. Heller, A. Jeske, E. Koesema, C. C. Meyers, H. Parker, L. Prednis, Y. Ansari, N. Choy, H. Deen, M. Geralt, N. Hazari, E. Hom, M. Karnes, C. Mulholland, R. Ndubaku, I. Schmidt, P. Guzman, L. Aguilar-Henonin, M. Schmid, D. Weigel, D. E. Carter, T. Marchand, E. Risseuw, D. Brogden, A. Zeko, W. L. Crosby, C. C. Berry, und J. R. Ecker. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301 (5633):653-657.
- Arenz, A., M. Klein, K. Fiehe, J. Gross, C. Drewke, T. Hemscheidt, und E. Leistner. 1996. Occurrence of neurotoxic 4'-O-methylpyridoxine in Ginkgo biloba leaves, Ginkgo medications and Japanese Ginkgo food. *Planta Med* 62 (6):548-551.
- AtEnsembl* NASC. [cited. Available from http://atensembl.arabidopsis.info/Arabidopsis_thaliana_TAIR/].
- Bilski, P., M. E. Daub, und C. F. Chignell. 2002. Direct detection of singlet oxygen via its phosphorescence from cellular and fungal cultures. *Methods Enzymol* 352:41-52.
- Bilski, P., M. Y. Li, M. Ehrenshaft, M. E. Daub, und C. F. Chignell. 2000. Vitamin B6 (Pyridoxine) and Its Derivatives Are Efficient Singlet Oxygen Quenchers and Potential Fungal Antioxidants. *Photochemistry and Photobiology* 71 (2):129-134.
- Birnboim, H. C., und J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7 (6):1513-1523.
- Bognår, A., und O. Velimatti. 1996. Influence of extraction on the determination of vitamin B6 in food by HPLC. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 204 (5):327-335.
- Bosco, C. D., L. Lezhneva, A. Biehl, D. Leister, H. Strotmann, G. Wanner, und J. Meurer. 2004. Inactivation of the chloroplast ATP synthase gamma subunit results in high non-photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279 (2):1060-1069.
- Braquet, P., und R. H. Bourgain. 1987. Anti-anaphylactic properties of BN 52021: a potent platelet activating factor antagonist. *Adv Exp Med Biol* 215:215-235.
- Brenner, W. G., G. A. Romanov, I. Kollmer, L. Burkle, und T. Schmulling. 2005. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J* 44 (2):314-333.
- Burns, K. E., Y. Xiang, C. L. Kinsland, F. W. McLafferty, und T. P. Begley. 2005. Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5'-phosphate biosynthetic pathway. *J Am Chem Soc* 127 (11):3682-3683.
- Cabrini, L., D. Bochicchio, A. Bordoni, S. Sassi, M. Marchetti, und M. Maranesi. 2005. Correlation between dietary polyunsaturated fatty acids and plasma homocysteine concentration in vitamin B6-deficient rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15 (2):94-99.
- Campanella, J. J., L. Bitincka, und J. Smalley. 2003. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* 4:29.

- Cane, D. E., Y. Hsiung, J. A. Cornish, J. K. Robinson, und I. D. Spenser. 1998. Biosynthesis of Vitamin B6: The Oxidation of 4-(Phosphohydroxy)-l-threonine by PdxA. *Journal of the American Chemical Society* 120 (8):1936-1937.
- Chae, H. Z., T. B. Uhm, und S. G. Rhee. 1994. Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (15):7022-7026.
- Cheltsov, A. V., W. C. Guida, und G. C. Ferreira. 2003. Circular permutation of 5-aminolevulinate synthase: effect on folding, conformational stability, and structure. *J Biol Chem* 278 (30):27945-27955.
- Chen, H., und L. Xiong. 2005. Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses. *The Plant Journal* 44 (3):396-408.
- Chen, H., und L. Xiong. 2009. Enhancement of vitamin B(6) levels in seeds through metabolic engineering. *Plant Biotechnol J* 7 (7):673-681.
- Clough, S. J., und A. F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16 (6):735-743.
- Collakova, E., A. Goyer, V. Naponelli, I. Krassovskaya, J. F. Gregory, 3rd, A. D. Hanson, und Y. Shachar-Hill. 2008. *Arabidopsis* 10-formyl tetrahydrofolate deformylases are essential for photorespiration. *Plant Cell* 20 (7):1818-1832.
- Czechowski, T., M. Stitt, T. Altmann, M. K. Udvardi, und W. R. Scheible. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139 (1):5-17.
- Daub, M. E., und M. Ehrenshaft. 2000. THE PHOTOACTIVATED CERCOSPORA TOXIN CERCOSPORIN: Contributions to Plant Disease and Fundamental Biology. *Annu Rev Phytopathol* 38:461-490.
- Denslow, S. A. 2005. Regulation of biosynthetic genes and antioxidant properties of vitamin B6 vitamers during plant defense responses. 66 (6):244-255.
- Denslow, S. A., E. E. Rueschhoff, und M. E. Daub. 2007. Regulation of the *Arabidopsis thaliana* vitamin B6 biosynthesis genes by abiotic stress. *Plant Physiol Biochem* 45 (2):152-161.
- di Salvo, M. L., M. K. Safo, F. N. Musayev, F. Bossa, und V. Schirch. 2003. Structure and mechanism of *Escherichia coli* pyridoxine 5'-phosphate oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1647 (1-2):76-82.
- Dong, Y. X., S. Sueda, J. Nikawa, und H. Kondo. 2004. Characterization of the products of the genes SNO1 and SNZ1 involved in pyridoxine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 271 (4):745-752.
- Drewke, C., und E. Leistner. 2001. Biosynthesis of vitamin B6 and structurally related derivatives. *Vitam Horm* 61:121-155.
- eFP-Browser*. [cited. Available from <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>.
- Ehrenshaft, M., P. Bilski, M. Y. Li, C. F. Chignell, und M. E. Daub. 1999a. A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B6 biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (16):9374-9378.
- Eliot, A. C., und J. F. Kirsch. 2004. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem* 73:383-415.
- EMBL-EBI*. [cited. Available from <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>.
- Engel, N., K. van den Daele, U. Kolukisaoglu, K. Morgenthal, W. Weckwerth, T. Parnik, O. Keerberg, und H. Bauwe. 2007. Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under nonphotorespiratory conditions. *Plant Physiol* 144 (3):1328-1335.
- Estelle, M. A., und C. Sommerville. 1987. Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Molecular and General Genetics MGG* 2:200-206.

- Fiehe, K., A. Arenz, C. Drewke, T. Hemscheidt, R. T. Williamson, und E. Leistner. 2000. Biosynthesis of 4'-O-methylpyridoxine (Ginkgotoxin) from primary precursors. *J Nat Prod* 63 (2):185-189.
- Flicker, K., M. Neuwirth, M. Strohmeier, B. Kappes, I. Tews, und P. Macheroux. 2007. Structural and thermodynamic insights into the assembly of the heteromeric pyridoxal phosphate synthase from *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 374 (3):732-748.
- Flors, C., und S. Nonell. 2006. Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenalenone phytoalexins. *Acc Chem Res* 39 (5):293-300.
- Fouad, W., und B. Rathinasabapathi. 2006. Expression of Bacterial L-aspartate- α -decarboxylase in Tobacco Increases β -Alanine and Pantothenate Levels and Improves Thermotolerance. *Plant Molecular Biology* 60 (4):495-505.
- Foyer, C. H., A. J. Bloom, G. Queval, und G. Noctor. 2009. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annu Rev Plant Biol* 60:455-484.
- Franco, M. G., B. Laber, R. Huber, und T. Clausen. 2001. Structural basis for the function of pyridoxine 5'-phosphate synthase. *Structure* 9 (3):245-253.
- Frenkel, M., C. Kulheim, H. J. Jankanpaa, O. Skogstrom, L. Dall'Osto, J. Agren, R. Bassi, T. Moritz, J. Moen, und S. Jansson. 2009. Improper excess light energy dissipation in Arabidopsis results in a metabolic reprogramming. *BMC Plant Biol* 9:12.
- Fulton, T., J. Chunwongse, und S. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 13 (3):207-209.
- Funk, C., W. P. Schroder, B. R. Green, G. Renger, und B. Andersson. 1994. The intrinsic 22 kDa protein is a chlorophyll-binding subunit of photosystem II. *FEBS Lett* 342 (3):261-266.
- Funk, C., W. P. Schroder, A. Napiwotzki, S. E. Tjus, G. Renger, und B. Andersson. 1995. The PSII-S protein of higher plants: a new type of pigment-binding protein. *Biochemistry* 34 (35):11133-11141.
- Gengenbacher, M., T. B. Fitzpatrick, T. Raschle, K. Flicker, I. Sinning, S. Muller, P. Macheroux, I. Tews, und B. Kappes. 2006. Vitamin B6 biosynthesis by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: biochemical and structural insights. *J Biol Chem* 281 (6):3633-3641.
- Gietz, R. D., und R. A. Woods. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350:87-96.
- Goehler, H., M. Lalowski, U. Stelzl, S. Waelter, M. Stroedicke, U. Worm, A. Droege, K. S. Lindenberg, M. Knoblich, C. Haenig, M. Herbst, J. Suopanki, E. Scherzinger, C. Abraham, B. Bauer, R. Hasenbank, A. Fritzsche, A. H. Ludewig, K. Bussow, S. H. Coleman, C. A. Gutekunst, B. G. Landwehrmeyer, H. Lehrach, und E. E. Wanker. 2004. A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol Cell* 15 (6):853-865.
- Gonzalez, E., D. Danehower, und M. E. Daub. 2007. Vitamer levels, stress response, enzyme activity, and gene regulation of Arabidopsis lines mutant in the pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase (PDX3) and the pyridoxal kinase (SOS4) genes involved in the vitamin B6 salvage pathway. *Plant Physiol* 145 (3):985-996.
- Grant, S. G., J. Jessee, F. R. Bloom, und D. Hanahan. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (12):4645-4649.

- Gregory, J. F., und S. L. Ink. 1987. Identification and quantification of pyridoxine .beta.-glucoside as a major form of vitamin B6 in plant-derived foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35 (1):76-82.
- Grogan, D. W. 1988. Temperature-sensitive murein synthesis in an Escherichia coli pdx mutant and the role of alanine racemase. *Archives of Microbiology* 150 (4):363-367.
- György, P. 1934. Vitamin B2 and the Pellagra-like Dermatitis in Rats. *Nature* 133 (3361): 498-499.
- György, P., und R. E. Eckardt. 1939. Vitamin B6 and Skin Lesions in Rats. *Nature* 144:512-512.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166 (4):557-580.
- Hanes, J. W., K. E. Burns, D. G. Hilmey, A. Chatterjee, P. C. Dorrestein, und T. P. Begley. 2008. Mechanistic studies on pyridoxal phosphate synthase: the reaction pathway leading to a chromophoric intermediate. *J Am Chem Soc* 130 (10):3043-3052.
- Havaux, M., B. Ksas, A. Szewczyk, D. Rumeau, F. Franck, S. Caffarri, und C. Triantaphylides. 2009. Vitamin B6 deficient plants display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress. *BMC Plant Biol* 9:130.
- Hellens, R., P. Mullineaux, und H. Klee. 2000. Technical Focus:a guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* 5 (10):446-451.
- Hellmann, H., und S. Mooney. 2010. Vitamin B6: a molecule for human health? *Molecules* 15 (1):442-459.
- Helmreich, E. J. 1992. How pyridoxal 5'-phosphate could function in glycogen phosphorylase catalysis. *Biofactors* 3 (3):159-172.
- Herrero, S., und M. E. Daub. 2007. Genetic manipulation of Vitamin B-6 biosynthesis in tobacco and fungi uncovers limitations to up-regulation of the pathway. *Plant Science* 172 (3):609-620.
- Hoshida, H., Y. Tanaka, T. Hibino, Y. Hayashi, A. Tanaka, und T. Takabe. 2000. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol Biol* 43 (1):103-111.
- Igarashi, D., H. Tsuchida, M. Miyao, und C. Ohsumi. 2006. Glutamate:glyoxylate aminotransferase modulates amino acid content during photorespiration. *Plant Physiol* 142 (3):901-910.
- Igawa, T., M. Fujiwara, H. Takahashi, T. Sawasaki, Y. Endo, M. Seki, K. Shinozaki, Y. Fukao, und Y. Yanagawa. 2009. Isolation and identification of ubiquitin-related proteins from Arabidopsis seedlings. *Journal of Experimental Botany* 60 (11):3067-3073.
- Jung, S., J. S. Kim, K. Y. Cho, G. S. Tae, und B. G. Kang. 2000. Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFDs. *Plant Science* 153 (2):145-154.
- Karimi, M., D. Inze, und A. Depicker. 2002. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7 (5):193-195.
- Kiyosue, T., Y. Yoshiba, K. Yamaguchi-Shinozaki, und K. Shinozaki. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis. *Plant Cell* 8 (8):1323-1335.
- Koncz, C., und J. Schell. 1986. THE PROMOTER OF TL-DNA GENE 5 CONTROLS THE TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION OF CHIMERIC GENES CARRIED BY A NOVEL TYPE OF AGROBACTERIUM BINARY VECTOR. *Molecular & General Genetics* 204 (3):383-396.

- Kopka, J., N. Schauer, S. Krueger, C. Birkemeyer, B. Usadel, E. Bergmuller, P. Dormann, W. Weckwerth, Y. Gibon, M. Stitt, L. Willmitzer, A. R. Fernie, und D. Steinhauser. 2005. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* 21 (8):1635-1638.
- Kuhn, R., und G. Wendt. 1938. Über das antidermatitische Vitamin der Hefe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* 71 (4):780-782.
- Laber, B., W. Maurer, S. Scharf, K. Stepusin, und F. S. Schmidt. 1999. Vitamin B6 biosynthesis: formation of pyridoxine 5'-phosphate from 4-(phosphohydroxy)-L-threonine and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate by PdxA and PdxJ protein. *FEBS Lett* 449 (1):45-48.
- Lalonde, S., D. W. Ehrhardt, D. Loque, J. Chen, S. Y. Rhee, und W. B. Frommer. 2008. Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations. *Plant J* 53 (4):610-635.
- Langebartels, C., H. Wohlgemuth, S. Kschieschan, S. Grün, und H. Sandermann. 2002. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40 (6-8):567-575.
- Larkindale, J., und M. R. Knight. 2002. Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol* 128 (2):682-695.
- Leistner, E., und C. Drewke. 2010. Ginkgo biloba and ginkgotoxin. *J Nat Prod* 73 (1):86-92.
- Leuendorf, J. E. 2006. Diplomarbeit: Charakterisierung der PDX1 und PDX2 Gene in Arabidopsis thaliana.
- Li, Q. B., D. W. Haskell, und C. L. Guy. 1999. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Mol Biol* 39 (1):21-34.
- Liese, A. 2007. Diplomarbeit: Identifizierung und Charakterisierung neuer PDX1 Interaktoren in Arabidopsis thaliana.
- Liu, J., und J. K. Zhu. 1997. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol* 114 (2):591-596.
- Lopez, P. J., I. Marchand, S. A. Joyce, und M. Dreyfus. 1999. The C-terminal half of RNase E, which organizes the Escherichia coli degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Mol Microbiol* 33 (1):188-199.
- Manzano, C., Z. Abraham, G. Lopez-Torrejon, und J. C. Del Pozo. 2008. Identification of ubiquitinated proteins in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 68 (1-2):145-158.
- Martin, T., H. Hellmann, R. Schmidt, L. Willmitzer, und W. B. Frommer. 1997. Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *Plant J* 11 (1):53-62.
- Martin, T., J. E. Losa, M. J. Garcia-Salgado, und J. L. Perez-Arellano. 1994. The role of platelet-activating factor (PAF) in interstitial pulmonary disease. *J Investig Allergol Clin Immunol* 4 (3):149-157.
- Matxain, J. M., D. Padro, M. Ristila, A. Strid, und L. A. Eriksson. 2009. Evidence of high $^{\bullet}\text{OH}$ radical quenching efficiency by vitamin B6. *J Phys Chem B* 113 (29):9629-9632.
- Matzke, M., und A. J. M. Matzke. 1993. Genomic Imprinting in Plants: Parental Effects and Trans-Inactivation Phenomena. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44 (1):53-76.
- Matzke, M. A., und A. J. M. Matzke. 1995. How and Why Do Plants Inactivate Homologous (Trans)genes? *Plant Physiology* 107 (3):679-685.
- Maurer, K., R. Ihl, T. Dierks, und L. Frolich. 1997. Clinical efficacy of Ginkgo biloba special extract EGb 761 in dementia of the Alzheimer type. *J Psychiatr Res* 31 (6):645-655.
- Miller, G., V. Shulaev, und R. Mittler. 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* 133 (3):481-489.

- Moccand, C., M. Kaufmann, und T. B. Fitzpatrick. 2011. It takes two to tango: defining an essential second active site in pyridoxal 5'-phosphate synthase. *PLoS One* 6 (1):e16042.
- Mooney, S., und H. Hellmann. 2010. Vitamin B6: Killing two birds with one stone? *Phytochemistry*.
- Mooney, S., J. E. Leuendorf, C. Hendrickson, und H. Hellmann. 2009. Vitamin B6: a long known compound of surprising complexity. *Molecules* 14 (1):329-351.
- Murashige, T., und F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nakagawa, T. 2002. GATEWAY Binary Vector (pGWB): Research Institute of Molecular Genetics.
- Nakamura, M. T., und T. Y. Nara. 2004. Structure, function, and dietary regulation of delta-6, delta-5, and delta-9 desaturases. *Annual Review of Nutrition* 24 (1 %R doi:10.1146/annurev.nutr.24.121803.063211):345-376.
- Neuwirth, M., M. Strohmeier, V. Windeisen, S. Wallner, S. Deller, K. Rippe, I. Sinning, P. Macheroux, und I. Tews. 2009. X-ray crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* Pdx1 provides insights into the oligomeric nature of PLP synthases. *FEBS Lett*.
- Nijhout, H. F., J. F. Gregory, C. Fitzpatrick, E. Cho, K. Y. Lamers, C. M. Ulrich, und M. C. Reed. 2009. A mathematical model gives insights into the effects of vitamin B-6 deficiency on 1-carbon and glutathione metabolism. *J Nutr* 139 (4):784-791.
- Nosaka, K. 2006. Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 72 (1):30-40.
- Notheis, C., C. Drewke, und E. Leistner. 1995. Purification and characterization of the pyridoxol-5'-phosphate:oxygen oxidoreductase (deaminating) from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1247 (2):265-271.
- Odell, J. T., J. L. Hoopes, und W. Vermerris. 1994. Seed-specific gene activation mediated by the Cre/lox site-specific recombination system. *Plant Physiol* 106 (2):447-458.
- Opassiri, R., Y. Hua, O. Wara-Aswapati, T. Akiyama, J. Svasti, A. Esen, und J. R. Ketudat Cairns. 2004. Beta-glucosidase, exo-beta-glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGLu1. *Biochem J* 379 (Pt 1):125-131.
- Palm, D., H. W. Klein, R. Schinzel, M. Buehner, und E. J. M. Helmreich. 1990. The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis. *Biochemistry* 29 (5):1099-1107.
- Papinutto, E., H. J. Windle, L. Cendron, R. Battistutta, D. Kelleher, und G. Zanotti. 2005. Crystal structure of alkyl hydroperoxide-reductase (AhpC) from *Helicobacter pylori*. *Biochim Biophys Acta* 1753 (2):240-246.
- Percudani, R., und A. Peracchi. 2009. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics* 10:273.
- Peterson, R. B., und E. A. Havir. 2001. Photosynthetic properties of an *Arabidopsis thaliana* mutant possessing a defective *PsbS* gene. *Planta* 214 (1):142-152.
- Raschke, M., S. Boycheva, M. Crevecoeur, A. Nunes-Nesi, S. Witt, A. R. Fernie, N. Amrhein, und T. B. Fitzpatrick. 2011. Enhanced levels of vitamin B(6) increase aerial organ size and positively affect stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J*.
- Raschle, T., N. Amrhein, und T. B. Fitzpatrick. 2005. On the two components of pyridoxal 5'-phosphate synthase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 280 (37):32291-32300.

- Ristilä, M., H. Strid, L. A. Eriksson, Å. Strid, und H. Sävenstrand. 2011. The role of the pyridoxine (vitamin B6) biosynthesis enzyme PDX1 in ultraviolet-B radiation responses in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* In Press, Corrected Proof.
- Rodriguez-Navarro, S., B. Llorente, M. T. Rodriguez-Manzanares, A. Ramne, G. Uber, D. Marchesan, B. Dujon, E. Herrero, P. Sunnerhagen, und J. E. Perez-Ortin. 2002. Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B1 and B6. *Yeast* 19 (14):1261-1276.
- Roessner-Tunali, U., E. Urbanczyk-Wochniak, T. Czechowski, A. Kolbe, L. Willmitzer, und A. R. Fernie. 2003. De novo amino acid biosynthesis in potato tubers is regulated by sucrose levels. *Plant Physiol* 133 (2):683-692.
- Roessner, U., C. Wagner, J. Kopka, R. N. Trethewey, und L. Willmitzer. 2000. Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J* 23 (1):131-142.
- Rosso, M. G., Y. Li, N. Strizhov, B. Reiss, K. Dekker, und B. Weisshaar. 2003. An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology* 53 (1):247-259.
- Rottmann, W. H., G. F. Peter, P. W. Oeller, J. A. Keller, N. F. Shen, B. P. Nagy, L. P. Taylor, A. D. Campbell, und A. Theologis. 1991. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J Mol Biol* 222 (4):937-961.
- Rueschhoff, E. E., Ph.D. 2010. Vitamin B6 metabolism in Arabidopsis thaliana.
- Safo, M. K., F. N. Musayev, M. L. di Salvo, S. Hunt, J. B. Claude, und V. Schirch. 2006. Crystal structure of pyridoxal kinase from the Escherichia coli pdxK gene: implications for the classification of pyridoxal kinases. *J Bacteriol* 188 (12):4542-4552.
- Safo, M. K., F. N. Musayev, S. Hunt, M. L. di Salvo, N. Scarsdale, und V. Schirch. 2004. Crystal structure of the PdxY Protein from Escherichia coli. *J Bacteriol* 186 (23):8074-8082.
- Saini, G., R. Meskauskiene, W. Pijacka, P. Roszak, L. L. Sjogren, A. K. Clarke, M. Straus, und K. Apel. 2011. 'happy on norflurazon' (hon) mutations implicate perturbation of plastid homeostasis with activating stress acclimatization and changing nuclear gene expression in norflurazon-treated seedlings. *Plant J* 65 (5):690-702.
- Sambrook, J., und D. Russel 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual (Sambrook J and Russel DW, eds.)*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sang, Y., J. M. Barbosa, H. Wu, R. D. Locy, und N. K. Singh. 2007. Identification of a pyridoxine (pyridoxamine) 5'-phosphate oxidase from Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett* 581 (3):344-348.
- Sang, Y., R. D. Locy, L. R. Goertzen, A. M. Rashotte, Y. Si, K. Kang, und N. K. Singh. 2010. Expression, in vivo localization and phylogenetic analysis of a pyridoxine 5'-phosphate oxidase in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology and Biochemistry* 49 (1):88-95.
- Saracco, S. A., M. Hansson, M. Scalf, J. M. Walker, L. M. Smith, und R. D. Vierstra. 2009. Tandem affinity purification and mass spectrometric analysis of ubiquitylated proteins in Arabidopsis. *The Plant Journal* 59 (2):344-358.
- Schauer, N., D. Steinhauser, S. Strelkov, D. Schomburg, G. Allison, T. Moritz, K. Lundgren, U. Roessner-Tunali, M. G. Forbes, L. Willmitzer, A. R. Fernie, und J. Kopka. 2005. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Lett* 579 (6):1332-1337.
- Schultes, N. P., und R. B. Peterson. 2007. Phylogeny-directed structural analysis of the Arabidopsis PsbS protein. *Biochem Biophys Res Commun* 355 (2):464-470.

- Scott, P. M., B. P. Lau, G. A. Lawrence, und D. A. Lewis. 2000. Analysis of Ginkgo biloba for the presence of ginkgotoxin and ginkgotoxin 5'-glucoside. *J AOAC Int* 83 (6):1313-1320.
- Servaites, J. C., und D. R. Geiger. 2002. Kinetic characteristics of chloroplast glucose transport. *J Exp Bot* 53 (374):1581-1591.
- Sessions, A., E. Burke, G. Presting, G. Aux, J. McElver, D. Patton, B. Dietrich, P. Ho, J. Bacwaden, C. Ko, J. D. Clarke, D. Cotton, D. Bullis, J. Snell, T. Miguel, D. Hutchison, B. Kimmerly, T. Mitzel, F. Katagiri, J. Glazebrook, M. Law, und S. A. Goff. 2002. A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* 14 (12):2985-2994.
- Sheffield, W. P., G. C. Shore, und S. K. Randall. 1990. Mitochondrial precursor protein. Effects of 70-kilodalton heat shock protein on polypeptide folding, aggregation, and import competence. *J Biol Chem* 265 (19):11069-11076.
- Shi, H., L. Xiong, B. Stevenson, T. Lu, und J. K. Zhu. 2002. The Arabidopsis salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B6 in plant salt tolerance. *Plant Cell* 14 (3):575-588.
- Shi, H., und J. K. Zhu. 2002. SOS4, a pyridoxal kinase gene, is required for root hair development in Arabidopsis. *Plant Physiol* 129 (2):585-593.
- Sivaraman, J., Y. Li, J. Banks, D. E. Cane, A. Matte, und M. Cygler. 2003. Crystal structure of Escherichia coli PdxA, an enzyme involved in the pyridoxal phosphate biosynthesis pathway. *J Biol Chem* 278 (44):43682-43690.
- Smirnoff, N., und Q. J. Cumbes. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28 (4):1057-1060.
- Smyth, D. R., J. L. Bowman, und E. M. Meyerowitz. 1990. Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* 2 (8):755-767.
- Snell, E. E. 1944. THE VITAMIN ACTIVITIES OF "PYRIDOXAL" AND "PYRIDOXAMINE". *J. Biol. Chem.* 154: 313-314.
- Snell, E. E., B. M. Guirard, und R. J. Williams. 1942. Occurrence in natural products of a physiologically active metabolite of pyridoxine. *J. Biol. Chem.* 143:519-530.
- Sparkes, I. A., J. Runions, A. Kearns, und C. Hawes. 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc* 1 (4):2019-2025.
- Sprenger, G. A., U. Schorken, T. Wiegert, S. Grolle, A. A. de Graaf, S. V. Taylor, T. P. Begley, S. Bringer-Meyer, und H. Sahm. 1997. Identification of a thiamin-dependent synthase in Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (24):12857-12862.
- Stambuk, B. U., B. Dunn, S. L. Alves, Jr., E. H. Duval, und G. Sherlock. 2009. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. *Genome Res* 19 (12):2271-2278.
- Stanulovic, M., V. Jeremic, V. Leskovac, und S. Chaykin. 1976. New pathway of conversion of pyridoxal to 4-pyridoxic acid. *Enzyme* 21 (4):357-369.
- Stoll, S., K. Scheuer, O. Pohl, und W. E. Muller. 1996. Ginkgo biloba extract (EGb 761) independently improves changes in passive avoidance learning and brain membrane fluidity in the aging mouse. *Pharmacopsychiatry* 29 (4):144-149.
- Stolz, J., und M. Vielreicher. 2003. Tpn1p, the plasma membrane vitamin B6 transporter of Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* 278 (21):18990-18996.

- Stolz, J., H. J. Wohrmann, und C. Vogl. 2005. Amiloride uptake and toxicity in fission yeast are caused by the pyridoxine transporter encoded by *bsu1+* (*car1+*). *Eukaryot Cell* 4 (2):319-326.
- Strohmeier, M., T. Raschle, J. Mazurkiewicz, K. Rippe, I. Sinning, T. B. Fitzpatrick, und I. Tews. 2006. Structure of a bacterial pyridoxal 5'-phosphate synthase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (51):19284-19289.
- Stubbs, C. D., und A. D. Smith. 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 779 (1):89-137.
- Sundaresan, V., P. Springer, T. Volpe, S. Haward, J. D. Jones, C. Dean, H. Ma, und R. Martienssen. 1995. Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev* 9 (14):1797-1810.
- Sung, D. Y., E. Vierling, und C. L. Guy. 2001. Comprehensive Expression Profile Analysis of the Arabidopsis Hsp70 Gene Family. *Plant Physiology* 126 (2):789-800.
- Suzuki, Y., und K. Uchida. 1998. Formation of 5'-O-(β -D-Glucopyranosyl) pyridoxine in soybean seedlings and suspension cells cultured in the presence of pyridoxine. *Bull. Res. Inst. Bioresour Okayama Univ.* 5:107-120.
- TAIR. [cited. Available from <http://www.arabidopsis.org/>].
- Tambasco-Studart, M., I. Tews, N. Amrhein, und T. B. Fitzpatrick. 2007. Functional analysis of PDX2 from Arabidopsis, a glutaminase involved in vitamin B6 biosynthesis. *Plant Physiol* 144 (2):915-925.
- Tambasco-Studart, M., O. Titiz, T. Raschle, G. Forster, N. Amrhein, und T. B. Fitzpatrick. 2005. Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 102 (38):13687-13692.
- Tanaka, T., Y. Tateno, und T. Gojobori. 2005. Evolution of vitamin B6 (pyridoxine) metabolism by gain and loss of genes. *Mol Biol Evol* 22 (2):243-250.
- Thoma, S., U. Hecht, A. Kippers, J. Botella, S. De Vries, und C. Somerville. 1994. Tissue-Specific Expression of a Gene Encoding a Cell Wall-Localized Lipid Transfer Protein from Arabidopsis. *Plant Physiology* 105 (1):35-45.
- Thomas, P. S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (9):5201-5205.
- Timm, S., A. Nunes-Nesi, T. Parnik, K. Morgenthal, S. Wienkoop, O. Keerberg, W. Weckwerth, L. A. Kleczkowski, A. R. Fernie, und H. Bauwe. 2008. A cytosolic pathway for the conversion of hydroxypyruvate to glycerate during photorespiration in Arabidopsis. *Plant Cell* 20 (10):2848-2859.
- Tissier, A. F., S. Marillonnet, V. Klimyuk, K. Patel, M. A. Torres, G. Murphy, und J. D. Jones. 1999. Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in Arabidopsis: a tool for functional genomics. *Plant Cell* 11 (10):1841-1852.
- Titiz, O., M. Tambasco-Studart, E. Warzych, K. Apel, N. Amrhein, C. Laloi, und T. B. Fitzpatrick. 2006. PDX1 is essential for vitamin B6 biosynthesis, development and stress tolerance in Arabidopsis. *Plant J* 48 (6):933-946.
- Triantaphylides, C., und M. Havaux. 2009. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci* 14 (4):219-228.
- Triantaphylides, C., M. Krischke, F. A. Hoeberichts, B. Ksas, G. Gresser, M. Havaux, F. Van Breusegem, und M. J. Mueller. 2008. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiol* 148 (2):960-968.

- Vadas, P., M. Gold, B. Perelman, G. M. Liss, G. Lack, T. Blyth, F. E. R. Simons, K. J. Simons, D. Cass, und J. Yeung. 2008. Platelet-Activating Factor, PAF Acetylhydrolase, and Severe Anaphylaxis. *New England Journal of Medicine* 358 (1):28-35.
- Van Aken, O., B. Zhang, C. Carrie, V. Uggalla, E. Paynter, E. Giraud, und J. Whelan. 2009. Defining the Mitochondrial Stress Response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 2 (6):1310-1324.
- Van Breusegem, F., und J. F. Dat. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol* 141 (2):384-390.
- Vierstra, R. D. 2009. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (6):385-397.
- Volker, A., Y. D. Stierhof, und G. Jurgens. 2001. Cell cycle-independent expression of the *Arabidopsis* cytokinesis-specific syntaxin KNOLLE results in mistargeting to the plasma membrane and is not sufficient for cytokinesis. *J Cell Sci* 114 (Pt 16):3001-3012.
- Voll, L. M., A. Jamai, P. Renne, H. Voll, C. R. McClung, und A. P. M. Weber. 2006. The Photorespiratory *Arabidopsis* shm1 Mutant Is Deficient in SHM1. *Plant Physiol.* 140 (1):59-66.
- Vroemen, C. W., S. Langeveld, U. Mayer, G. Ripper, G. Jurgens, A. Van Kammen, und S. C. De Vries. 1996. Pattern Formation in the *Arabidopsis* Embryo Revealed by Position-Specific Lipid Transfer Protein Gene Expression. *The Plant Cell Online* 8 (5):783-791.
- Wada, K., S. Ishigaki, K. Ueda, M. Sakata, und M. Haga. 1985. An antivitamin B6, 4'-methoxypyridoxine, from the seed of *Ginkgo biloba* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 33 (8):3555-3557.
- Wagner, S., A. Bernhardt, J. E. Leuendorf, C. Drewke, A. Lytovchenko, N. Mujahed, C. Gurgui, W. B. Frommer, E. Leistner, A. R. Fernie, und H. Hellmann. 2006. Analysis of the *Arabidopsis* rsr4-1/pdx1-3 mutant reveals the critical function of the PDX1 protein family in metabolism, development, and vitamin B6 biosynthesis. *Plant Cell* 18 (7):1722-1735.
- Walter, M., C. Chaban, K. Schutze, O. Batistic, K. Weckermann, C. Nake, D. Blazevic, C. Grefen, K. Schumacher, C. Oecking, K. Harter, und J. Kudla. 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40 (3):428-438.
- Wang, T., N. Zhang, und L. Du. 2005. Isolation of RNA of high quality and yield from *Ginkgo biloba* leaves. *Biotechnol Lett* 27 (9):629-633.
- Waters, E. R. 1995. The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics* 141 (2):785-795.
- Weber, H., A. Bernhardt, M. Dieterle, P. Hano, A. Mutlu, M. Estelle, P. Genschik, und H. Hellmann. 2005. *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiol* 137 (1):83-93.
- Weber, H., und H. Hellmann. 2009. *Arabidopsis thaliana* BTB/ POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *Febs J* 276 (22):6624-6635.
- Weigel, D., und J. Glazebrook. 2001. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wingler, A., P. J. Lea, W. P. Quick, und R. C. Leegood. 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355 (1402):1517-1529.
- Wittig, I., H. P. Braun, und H. Schagger. 2006. Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1 (1):418-428.

- Wrenger, C., M. L. Eschbach, I. B. Muller, D. Warnecke, und R. D. Walter. 2005. Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 280 (7):5242-5248.
- Xiang, C., P. Han, I. Lutziger, K. Wang, und D. J. Oliver. 1999. A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol Biol* 40 (4):711-717.
- Yang, Y., H. C. Tsui, T. K. Man, und M. E. Winkler. 1998. Identification and function of the *pdxY* gene, which encodes a novel pyridoxal kinase involved in the salvage pathway of pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 180 (7):1814-1821.
- Yang, Y., G. Zhao, und M. E. Winkler. 1996. Identification of the *pdxK* gene that encodes pyridoxine (vitamin B6) kinase in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiology Letters* 141 (1):89-95.
- Yoshikawa, T., Y. Naito, und M. Kondo. 1999. Ginkgo biloba leaf extract: review of biological actions and clinical applications. *Antioxid Redox Signal* 1 (4):469-480.
- Zein, F., Y. Zhang, Y. N. Kang, K. Burns, T. P. Begley, und S. E. Ealick. 2006. Structural insights into the mechanism of the PLP synthase holoenzyme from *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* 45 (49):14609-14620.
- Zeng, X. Q., W. S. Chow, L. J. Su, X. X. Peng, und C. L. Peng. 2010. Protective effect of supplemental anthocyanins on *Arabidopsis* leaves under high light. *Physiol Plant* 138 (2):215-225.
- Zhao, G., und M. E. Winkler. 1996. 4-Phospho-hydroxy-L-threonine is an obligatory intermediate in pyridoxal 5'-phosphate coenzyme biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiology Letters* 135 (2-3):275-280.
- Zhu, J., J. W. Burgner, E. Harms, B. R. Belitsky, und J. L. Smith. 2005. A new arrangement of (beta/alpha)₈ barrels in the synthase subunit of PLP synthase. *J Biol Chem* 280 (30):27914-27923.
- Zybailov, B., H. Rutschow, G. Friso, A. Rudella, O. Emanuelsson, Q. Sun, und K. J. van Wijk. 2008. Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS One* 3 (4):e1994.

8 Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	Copy-DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.h.	das heißt
EMS	Ethylmethansulfonat
G	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
Hetero	heterozygot
H	Stunden
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria-Broth-Medium
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	Multiple Cloning Site
Mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
Min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
Rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RNA	messenger RNA
μ Ci	Mikrocurie
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
Nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
pH	potentia Hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
P35S	35S Blumenkohl-Mosaik Virus
U	Unit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Strukturelle Darstellung der Vitamin B6 Derivate.	1
Abbildung 1.2: Darstellung der von PLP-abhängigen Enzymen katalysierten Reaktionen.	3
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Vitamin B6 Biosynthesewege.	7
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Assemblierung der <i>B. subtilis</i> PLP-Synthase	9
Abbildung 1.5: Übersicht über die Interaktionen zwischen den AtPDX Proteinen.	13
Abbildung 2.1: Aufreinigung von HIS-Fusionsprotein anhand des Beispiels AtPDX1.2:HIS.	36
Abbildung 2.2: Standardisierung der HiLoad™ 16/60 Superdex 200 Säule für die Größenausschluß-Chromatographie.	43
Abbildung 3.1: Phänotypische Analyse von <i>P35S:myc:AtPDX</i> exprimierenden Pflanzen.	50
Abbildung 3.2: Frischgewichtsanalyse von <i>P35S:myc:AtPDX</i> Pflanzen.	52
Abbildung 3.3: Wurzellängenanalyse von <i>P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}</i> Pflanzen	53
Abbildung 3.4: Expressionsanalyse der <i>AtPDX</i> Gene in <i>P35S:myc:AtPDX</i> Pflanzen.	54
Abbildung 3.5: Komplementationsansatz der <i>rsr4-1</i> Mutante mittels eingebrachter <i>AtPDX1</i> Expressionskonstrukte.	56
Abbildung 3.6: Phänotypischer Vergleich von mit myc-Epitop fusionierten und unfusionierten <i>AtPDX1.3</i> exprimierenden Pflanzenlinien.	58
Abbildung 3.7: Analyse des Vitamin B6 Gehaltes von <i>P35S:myc:AtPDX</i> Pflanzen.	60
Abbildung 3.8: Analyse des Metabolitgehaltes der <i>P35S:myc:AtPDX</i> Pflanzen.	62
Abbildung 3.9: AtPDX BIFC Analyse in <i>N. benthamiana</i>	64
Abbildung 3.10: Analyse der Komplexbildung von AtPDX Proteinen mittels <i>fast protein liquid chromatography</i> (FPLC) Größenausschlußchromatographie.	66
Abbildung 3.11: Komplexbildungsanalyse von AtPDX1 Proteinen mittels Blue Native Page	68
Abbildung 3.12: Komplexbildungsanalyse von AtPDX1.2 und AtPDX1.3 Mischkomplexen mittels Blue Native Page.	69
Abbildung 3.13: Expressionsanalyse von <i>G. biloba PDX1 (GbPDX1)</i> in <i>G. biloba</i>	70
Abbildung 3.14: Analyse der GbPDX1 Aktivität durch Komplementationsstudien in der <i>A. thaliana rsr4-1</i> Mutante.	72
Abbildung 3.15: Analyse des Vitamin B6 Gehaltes von C24, <i>rsr4-1</i> und der komplementierten Linie <i>P35S:GbPDX1#7/rsr4-1</i>	73
Abbildung 3.16: Interaktionsanalyse von GbPDX1 mit den AtPDX1 und AtPDX2 Proteinen.	74
Abbildung 3.17: Expressionsanalyse von <i>AtPDX1.1</i> und <i>AtPDX1.2</i> in <i>Arabidopsis Col0</i> Pflanzen unter Hitzeschockbedingungen.	75
Abbildung 3.18: Expressionsanalyse von myc:AtPDX1.2 Protein unter Hitzeschockbedingungen in den <i>PPDX1.2:myc:AtPDX1.2</i> Pflanzen.	76
Abbildung 3.19: Genomische Karte des DNA Bereiches von <i>AtPDX1.2 (At3g16050)</i> . Insertionsorte der GABI Kat Linie (GABI_468B06/-019015), der SALK Linie (SALK_148199.19.20.x) und der John Innes Gene Trap Linie (GT_5.7122)	77

Abbildung 3.20: Test des Antisenseeffektes in <i>P35S:AtPDX1.2 Antisense</i> Pflanzen	78
Abbildung 3.21: Genomische Karte des DNA Bereiches von <i>AtPDX1.2 (At3g16050)</i> . Insertionsort der SAIL_640_D11 Linie	79
Abbildung 3.22: Genotypische Analyse von <i>atpdx1.2-1</i> und Col0 Pflanzen	79
Abbildung 3.23: Mikroskopische Analyse der Samenentwicklung von <i>atpdx1.2-1 +/-</i> Pflanzen.	82
Abbildung 3.24: Lokalisationsstudien von <i>AtPDX1.2:GFP</i> in jungen <i>Arabidopsis</i> Samen.	85
Abbildung 3.25: Interaktionstest mittels Y2H Matrix Ansatz von <i>At5g65840 (A)</i> bzw. <i>AtACS10 (B)</i> gegen die Vertreter der <i>AtPDX</i> Proteine..	87
Abbildung 3.26: Interaktionstest durch einen <i>in vitro</i> Pulldown Ansatz mit aus Pflanzen aufgereinigtem <i>myc:AtPDX1.1</i> Protein und aus <i>E.coli</i> aufgereinigten <i>GST:AtPDX</i> , <i>GST:At5g65840</i> und <i>GST:AtACS10</i> Fusionsproteinen.....	88
Abbildung 3.27: Schematische Darstellung des genomischen DNA Bereiches von <i>At5g65840</i> . Insertionsort der Linie SALK_018173 eingezeichnet.	89
Abbildung 3.28: (A) Genotypische Analyse von SALK_018173 Pflanzen durch PCR	90
Abbildung 3.29: (A) Expressionsanalyse durch Western Blot in <i>P35S:At5g65840:myc</i> Pflanzen	91
Abbildung 12.1: Expressionsanalyse von endogener <i>AtPDX1.2</i> Expression in den <i>P35S:AtPDX1.2 Antisense</i> Pflanzen (T2 Generation).	154
Abbildung 12.2 Sequenzierung des Insertionsortes von SALK_148199.19.20.x.....	155
Abbildung 12.3 Sequenzierung des Insertionsortes von SAIL_640_D11	156
Abbildung 12.4: Genotypische Analyse der Insertionenlinien <i>atpdx1.1/atpdx1.2-1/atpdx1.3</i>	157
Abbildung 12.5: Y2H Interaktionstest von <i>At5g65840</i> gegen das ebenfalls als putativ Alkyl-Hydroperoxid Reduktase und Thiol-spezifisches Antioxidant sowie Chloroplasten lokalisierte Protein <i>At2g37240</i>	161
Abbildung 12.6: Schematische Darstellung von Klonierungs- bzw. T-DNA-Bereichen der verwendeten Vektoren (vergl. Tabelle 2.3).	162

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Vergleich der Aminosäuresequenz von AtPDX1 Proteinen in Ähnlichkeit.	10
Tabelle 1.2:	Beispiele putativer AtPDX1 Interaktoren gefunden in verschiedenen Y2H Screens...	13
Tabelle 2.1:	Übersicht über die verwendeten Bakterien- und Hefe-Stämme.....	19
Tabelle 2.2:	Übersicht über die verschiedenen verwendeten Pflanzen	20
Tabelle 2.3:	Übersicht über die verwendeten Vektoren.....	21
Tabelle 2.4:	Wachstumsmedien für die Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	22
Tabelle 2.5:	Wachstumsmedien für die Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	23
Tabelle 2.6:	Verwendete Aminosäuren und deren Konzentration im SD-Medium	23
Tabelle 2.7:	Verwendete Antibiotika bzw. Herbizide und deren Konzentration im Medium.....	24
Tabelle 2.8:	PCR Standardansätze für die <i>Taq</i> und <i>Pfu</i> Polymerase	28
Tabelle 2.9:	Cycler Standard Protokoll für PCR	28
Tabelle 2.10:	Cycler Standard Protokoll für qRT-PCR.....	29
Tabelle 2.11:	Standard Ligationsansatz.....	31
Tabelle 2.12:	Ansätze für die Fertigung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	38
Tabelle 2.13:	Verwendete Antikörper.....	39
Tabelle 2.14:	Standardprotokoll zur Anfertigung von einem Gradienten-Trenngel für BNP.....	40
Tabelle 2.15:	Standardisierung der HiLoad™ 16/60 Superdex 200 Säule.....	42
Tabelle 2.16:	Wachstumsmedien für eine sterile Anzucht von <i>A. thaliana</i>	44
Tabelle 2.17:	Auflistung der für die Identifizierung der Insertionslinien verwendeten Primerpaare	44
Tabelle 3.1:	Aufstellung der molekularen Komplexgrößen in denen myc:AtPDX Proteine gehäuft auftraten	67
Tabelle 3.2:	Genotypische Untersuchung der SAIL <i>atpdx1.2-1</i> Pflanzen	80
Tabelle 3.3:	Analyse der F1 Generation von Kreuzungen zwischen heterozygoten <i>atpdx1.2-1</i> Mutanten (<i>atpdx1.2-1 +/-</i>) mit dem Wildtyp Col0 (WT Col0)..	81
Tabelle 12.1:	Liste der verwendeten Oligonukleotide	149
Tabelle 12.2:	Metabolitmessung der <i>P35S:myc:AtPDX</i> Pflanzenlinien.	152
Tabelle 12.3:	Genotypische Untersuchung der Pflanzen der F2 Generation von <i>atpdx1.2-1 +/-</i> Kreuzungen mit <i>atpdx1.1</i> bzw. mit <i>atpdx1.3</i>	158
Tabelle 12.4:	Vergleich der Aminosäuresequenz von CnPDX1 und AtPDX1 Proteinen	159
Tabelle 12.5:	Vergleich der Aminosäuresequenz von GbPDX1 und AtPDX1 Proteinen.....	160

11 Erfolgte Publikationen

„Analysis of the *Arabidopsis* *rsr4-1/pdx1-3* mutant reveals the critical function of the PDX1 protein family in metabolism, development, and vitamin B6 biosynthesis.”

Wagner, S., A. Bernhardt, J. E. Leuendorf, C. Drewke, A. Lytovchenko, N. Mujahed, C. Gurgui, W. B. Frommer, E. Leistner, A. R. Fernie, und H. Hellmann.

Plant Cell 18 (7):1722-1735. (2006)

„The Pdx1 family is structurally and functionally conserved between *Arabidopsis thaliana* and *Ginkgo biloba*.”

Leuendorf, J. E., A. Genau, A. Szewczyk, S. Mooney, C. Drewke, E. Leistner, und H. Hellmann.

Febs J 275 (5):960-969. (2008)

„Vitamin B6: a long known compound of surprising complexity.”

Mooney, S., J. E. Leuendorf, C. Hendrickson, und H. Hellmann.

Molecules 14 (1):329-351. (2009)

„Application of GC-MS for the detection of lipophilic compounds in diverse plant tissues.”

Lytovchenko, A., R. Beleggia, N. Schauer, T. Isaacson, J. E. Leuendorf, H. Hellmann, J. K. Rose, und A. R. Fernie.

Plant Methods 5:4. (2009)

„Complex Assembly and Metabolic Profiling of *Arabidopsis thaliana* Plants Overexpressing Vitamin B6 Biosynthesis Proteins.“

Leuendorf, J. E., S. Osorio, A. Szewczyk, A. R. Fernie, und H. Hellmann.

Mol Plant :ssq041. (2010)

12 Anhang

Tabelle 12.1: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Gen-spezifische Oligonukleotide (Sequenz 5' → 3')

1	AtPDX1.1FW1	ATGGCAGGAACCGGAGTTGTGG
2	AtPDX1.1RW930	TACTCAGAACGACTAGCGAACC
3	AtPDX1.2FW1	ATGGCGGATCAAGCTATGACG
4	AtPDX1.2RW945	TCAAACACTGCCTTGGCCAAAG
5	AtPDX1.2CheckFW	GCGAGATTATCTGTTGCG
6	AtPDX1.3FW	ATGGAAGGAACCGCGTTGTGG
7	AtPDX1.3RW	TCACTCGGAGCGATTAGCGAAC
8	AtPDX2FW2	ATGACCGTCGGAGTTTTAGCTTTGC
9	AtPDX2RW2	TTATTGAAATATAGGAAGATCAGGCTTAGC
10	AtACS10FW	ATGACCCGTACCGAACCAAACC
11	AtACS10RW	TCAATTTTGAGATTTACATGTTTGAG
12	At5g65840FW	ATGATTTTGGTTTCTGAATCACC
13	At5g65840RW	TCAAGCAACAGTGGCTTTGCAGC
14	At2g37240FW	ATGGCGATTGCTCTCTCGTC
15	At2g37240RW	TCAAGCACAACACGCTTTAAGG
16	GinkgoPDX1FW	ATGGCCAGCGACGGAGTTG
17	GinkgoPDX1RW	CTACTCTGACCTCTCTGC

Promotor-spezifische Oligonukleotide

18	PPDX1,2FW1	GACCAAATTATTCTCACGCTTG
19	PPDX1,2RW1808	TTTTAGGTTCTGTGAGTTTTAG
20	PPDX1.3FW	AACATACCGGTGTTAGTAGC
21	PPDX1.3RW	TATCGGAGATTGAAGAGAAATTTGTG

Oligonukleotide für Gatewayklonierungen

22	attB1AtACS10FW	AAAAAGCAGGCTATATGACCCGTACCG
23	attB2AtACS10RW	AGAAAGCTGGGTTTCAATTTTGAGATTTAC
24	attB1At5g65840FW	AAAAAGCAGGCTATATGATTTTGCTTTC

25	attB2At5g65840FW	AGAAAGCTGGGTTCAAGCAACAGTGG
26	attB2At5g65840noStopFW	AGAAAGCTGGGTCAGCAACAGTGG
27	attB1At2g37240FW	AAAAAGCAGGCTATATGGCGATTGCTC
28	attB2At2g37240RW	AGAAAGCTGGGTTCAAGCACAACACGC
29	attB1GinkgoPDX1FW	AAAAAGCAGGCTATATGGCCAGCGAC
30	attB1GinkgoPDX1RW	AGAAAGCTGGGTCTACTCTTGACC
31	attB1PPDX1,2FW1	AAAAAGCAGGCTGACCAAATTATTCTCACG
32	attB2AtPDX1,2nSRW	AGAAAGCTGGGTAAACACTGCCTTGCCAAAG

Oligonukleotide für Klonierung von AtPDX in den pET21b

33	CheckPDX1,2FW	GCGAGATTATCTCTGTTGCG
34	AtPDX1.1NdeIFW	CATATGGCAGGAACCGGAGTTGTGG
35	AtPDX1.1nSXhoIRW	CTCGAGCTCAGAACGACTAGCGAACC
36	AtPDX1.2NdeIFW	CATATGGCGGATCAAGCTATGACG
37	AtPDX1.2nSXhoIRW	CTCGAGAACACTGCCTTGCC
38	AtPDX1.3NdeIFW	CATATGGAAGGAACCGGCGTTGTGG
39	AtPDX1.3nSXhoIRW	CTCGAGCTCGGAGCGATTAGCG

Standard-Oligonukleotide

40	attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
41	attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGATGGGT
42	M13FW	GTAAAACGACGGCCAG
43	M13RW	CAGGAAACAGCTATGAC
44	Actin2FW	AATGGTGAAGGCTGGTTTTG
45	Actin2RW	TCCACATCTGTTGGAGGGTG
46	SALK Lba1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
47	SAIL LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
48	JIC Spm32	TACGAATAAGAGCGTCCATTTTAGAGTGA
49	P35Sseq	GTTCCAACCACGTCTTCAAAGC
50	pCR2BamHIzuMCS	GGATCCACTAGTAACGGCCG

Oligonukleotide für qRT-PCR

51	qRTAtPDX1.1FW	TCTCCCTTCTCCGTGAAAGTTG
52	qRTAtPDX1.1RW	GCGTTGACGACATCCATGATT
53	qRTAtPDX1.2FW	AGGTCGGATTAGCTCAGGTA

54	qRTAtPDX1.2RW	CGGATTCAGCGAGCTTAGCTT-
55	qRTAtPDX1.3FW	TTTGCGGTTGCCGGAAT
56	qRTAtPDX1.3RW	ATCATCGCCGCACCTTCA
57	qRTAtPDX2FW	GTTCATACTGTGCTCCAGCTGT
58	qRTAtPDX2RW	TTGATGGGACGGGATAATCC
59	AtPDX1.3 3'UTRFW	CTCAGACCATTTTGCAGTAATCTC
60	AtPDX1.3 3'UTRRW	TCTTGCAAAGGGATTACGAGT
61	pGWB18mycqRTFW	ACGGTAGCGCTGTTATCACAAG
62	refqRTAt3g25800FW	CCATTAGATCTTGTCTCTCTGCT
63	refqRTAt3g25800RW	GACAAAACCCGTACCGAG

Tabelle 12.2: Metabolitmessung der *P35S:myc:AtPDX* Pflanzenlinien. Alle Werte sind in Relation zum Wildtyp Col0 angegeben (Col0 =1). Signifikante Veränderungen zum Wildtyp Col0 ($p < 0.01$) sind in dick/fett geschriebenen Ziffern angegeben. SE, Standardfehler. Die angegebenen Werte wurden aus 5 unabhängigen Probemessungen errechnet.

	<i>P35S:myc:AtPDX1.1</i>		<i>P35S:myc:AtPDX1.2</i>		<i>P35S:myc:AtPDX1.3^{stunted}</i>		<i>P35S:myc:AtPDX1.3^{normal}</i>		<i>P35S:myc:AtPDX2</i>	
		SE		SE		SE		SE		SE
Aminosäuren										
Alanine	1,11	0,10	1,00	0,13	1,57	0,10	0,84	0,10	0,67	0,11
Alanine, beta-	0,98	0,07	0,80	0,10	4,79	0,47	0,88	0,06	0,31	0,15
Arginine	1,09	0,09	0,85	0,14	5,27	0,80	0,90	0,12	0,34	0,14
Asparagine	0,99	0,09	0,82	0,13	3,42	0,23	0,90	0,16	0,40	0,14
Aspartate	1,12	0,06	1,27	0,14	2,11	0,10	1,08	0,06	0,68	0,12
GABA	0,58	0,05	0,43	0,07	0,52	0,02	0,46	0,07	0,15	0,10
Glutamine	1,15	0,21	0,78	0,20	1,91	0,41	0,84	0,21	0,22	0,11
Glutamate	0,97	0,05	1,05	0,11	2,05	0,09	0,88	0,08	0,43	0,19
Glycine	1,09	0,24	1,18	0,13	18,99	1,16	7,70	2,25	0,79	0,15
Homoserine	1,28	0,13	1,28	0,18	2,18	0,19	1,47	0,09	0,67	0,09
Isoleucine	0,66	0,06	0,59	0,07	0,77	0,05	0,62	0,03	0,50	0,05
Lysine	0,90	0,08	0,79	0,11	1,53	0,15	0,89	0,04	0,58	0,11
Methionine	1,57	0,19	0,90	0,18	4,28	0,42	1,36	0,14	0,60	0,08
Ornithine	0,93	0,08	0,95	0,16	3,17	0,33	0,97	0,03	0,46	0,10
Phenylalanine	0,76	0,07	0,56	0,07	1,20	0,10	0,74	0,03	0,49	0,05
Proline	4,33	0,39	3,01	0,38	5,54	0,34	3,01	0,17	2,65	0,46
Proline, 4-hydroxy	2,26	0,19	1,59	0,20	1,82	0,14	1,71	0,09	1,52	0,22
Serine	1,15	0,09	0,98	0,14	1,58	0,11	1,22	0,09	0,57	0,09
Serine, O-acetyl-	1,21	0,10	0,94	0,12	2,59	0,20	1,00	0,06	0,48	0,09
Threonine	1,20	0,11	1,03	0,14	0,83	0,06	1,03	0,06	0,76	0,10
Tryptophan	0,65	0,07	0,45	0,12	0,73	0,13	0,53	0,07	0,24	0,04
Tyramine	1,10	0,15	0,93	0,18	1,35	0,11	0,91	0,12	0,86	0,14
Tyrosine	0,72	0,06	0,64	0,08	0,91	0,08	0,82	0,05	0,54	0,06
Valine	0,85	0,08	0,73	0,09	1,01	0,08	1,15	0,05	0,70	0,13
Organische Säuren										
Ascorbic acid	1,34	0,29	0,91	0,18	0,85	0,18	0,99	0,13	0,70	0,13
Citric acid	0,99	0,10	1,04	0,16	4,15	0,38	0,76	0,07	0,55	0,10
Dehydroascorbic acid	1,26	0,14	1,08	0,26	1,37	0,12	0,95	0,13	0,91	0,17
Fumaric acid	0,82	0,07	0,83	0,09	1,01	0,05	0,81	0,05	0,74	0,07
Gluconic acid/Galactonic acid	1,11	0,12	0,92	0,11	1,23	0,09	0,95	0,09	0,93	0,04
Glyceric acid	1,01	0,08	0,83	0,08	0,80	0,05	1,20	0,05	0,75	0,07
Malic acid	0,96	0,08	0,99	0,10	3,07	0,15	0,82	0,06	0,84	0,07
Pyroglutamic acid	0,90	0,08	0,92	0,12	1,60	0,15	0,97	0,10	0,87	0,11
Pyruvic acid	1,22	0,14	1,01	0,16	1,27	0,07	1,21	0,13	0,71	0,11
Succinic acid	0,96	0,06	0,96	0,12	1,44	0,11	0,90	0,03	0,82	0,07
Threonic acid	0,63	0,06	0,92	0,14	0,86	0,07	0,66	0,03	0,61	0,06

Zucker										
Erythritol	0,96	0,09	0,82	0,09	1,60	0,20	0,89	0,06	0,81	0,11
Fructose	0,87	0,08	1,06	0,06	0,89	0,07	0,91	0,05	1,12	0,06
Fucose	0,88	0,07	0,82	0,10	1,07	0,04	0,89	0,05	0,85	0,09
Galactinol	1,01	0,12	0,71	0,09	0,16	0,01	0,87	0,10	1,02	0,13
Galactose	0,77	0,07	0,56	0,07	0,45	0,02	0,72	0,04	1,05	0,13
Glucose	0,81	0,07	0,47	0,06	0,56	0,03	0,81	0,05	0,65	0,07
Isomaltose	1,68	0,30	0,87	0,11	7,91	0,68	1,66	0,36	1,13	0,14
Maltitol	0,78	0,04	0,76	0,08	1,35	0,07	0,87	0,13	0,86	0,14
Mannose	0,70	0,06	0,60	0,08	1,68	0,08	0,77	0,07	0,66	0,07
Mannopyranoside, 1-O-methyl-, alpha-	0,89	0,08	0,83	0,12	0,86	0,08	0,86	0,05	0,78	0,09
Raffinose	1,11	0,20	0,70	0,21	0,24	0,03	1,04	0,29	0,73	0,12
Rhamnose	0,96	0,09	0,86	0,09	1,44	0,11	0,92	0,06	0,82	0,08
Sucrose	0,88	0,09	0,83	0,10	1,23	0,07	0,89	0,05	0,75	0,09
Xylose	1,00	0,10	0,82	0,11	0,77	0,06	0,87	0,06	0,83	0,08
Sonstige Metabolite										
Adenine	1,05	0,08	0,74	0,15	2,34	0,51	0,87	0,03	0,59	0,06
Glycerol	0,61	0,04	0,69	0,06	0,82	0,07	0,66	0,03	0,76	0,09
Inositol, myo-	0,98	0,09	0,90	0,12	0,36	0,03	0,94	0,06	1,06	0,11
Nicotinic acid	0,96	0,08	0,73	0,13	1,00	0,12	0,84	0,06	0,98	0,16
Putrescine	1,07	0,10	0,97	0,13	0,53	0,04	0,98	0,06	0,41	0,15
Spermidine	1,02	0,10	0,92	0,12	0,83	0,08	1,09	0,05	0,75	0,07
Trehalose, alpha,alpha'-	0,82	0,12	0,75	0,09	1,63	0,09	0,80	0,05	0,74	0,08
Uracil	0,87	0,06	0,92	0,11	1,58	0,13	0,78	0,01	0,86	0,14

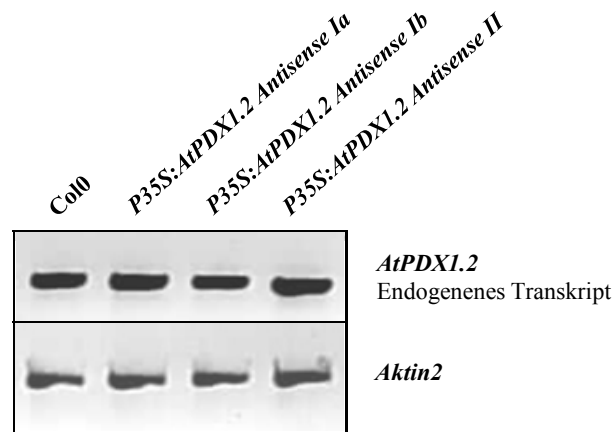


Abbildung 12.1: Expressionsanalyse von endogener *AtPDX1.2* Expression in den *P35S:AtPDX1.2 Antisense* Pflanzen (T2 Generation) im Vergleich zum Wildtyp Col0 nach 3 stündigem Hitzeschock bei 39° C durch semiquantitative RT-PCR. Als RNA Einsatz Kontrolle wurde eine RT-PCR auf des Aktin Transkript (*Aktin2*) durchgeführt.

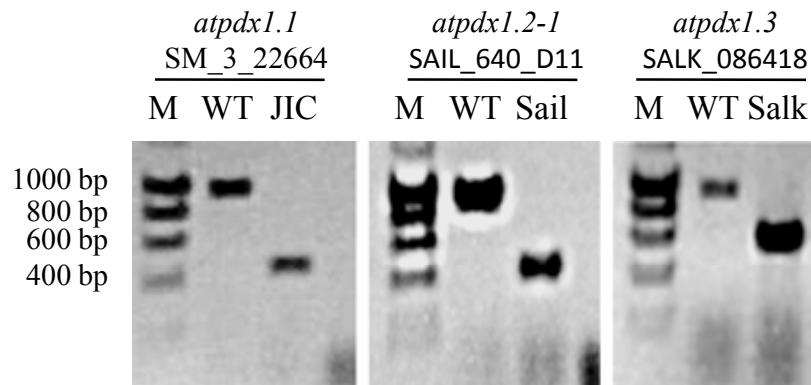


Abbildung 12.4: Genotypische Analyse der Insertionslinien *atpdx1.1/atpdx1.2-1/atpdx1.3* durch PCR. Analyse des Wildtypallels (WT) mit genspezifischen Primern und Identifizierung der Insertion (JIC/SAIL/SALK) mit insertionsspezifischen Primern (Tabelle 2.17). Dargestellt ist je ein Ergebnis von heterozygot die Insertion tragenden *atpdx1.1/atpdx1.2-1/atpdx1.3* Pflanzen, wie sie bei der Kreuzung von *atpdx1.2-1* mit *atpdx1.1* und *atpdx1.3* in der F1 Generation identifiziert worden sind.

Tabelle 12.3: Genotypische Untersuchung der Pflanzen der F2 Generation von *atpdx1.2-1 +/-* Kreuzungen mit *atpdx1.1* bzw. mit *atpdx1.3* durch PCR mit *AtPDX1.2* genspezifischen Primern sowie SAIL insertionsspezifischen Primern.

Kreuzung: <i>atpdx1.2-1 +/-</i> x <i>atpdx1.1</i>				
	<i>atpdx1.2-1 -/-</i>	<i>atpdx1.2-1 +/-</i>	<i>atpdx1.2-1 +/+</i>	Anzahl der getesteten Pflanzen
F2	29	29	0	58
Verhältnis	1	1	0	-
Kreuzung: <i>atpdx1.2-1 +/-</i> x <i>atpdx1.3</i>				
	<i>atpdx1.2-1 -/-</i>	<i>atpdx1.2-1 +/-</i>	<i>atpdx1.2-1 +/+</i>	Anzahl der getesteten Pflanzen
F2	25	36	0	61
Verhältnis	1	1,4	0	-

Tabelle 12.4: Vergleich der Aminosäuresequenz von *Cercospora nicotiana* PDX1 und AtPDX1 Proteinen in Ähnlichkeit (grau unterlegt) und Identität; angegebene Werte in Prozent. Analyse der Sequenzen mit dem MatGat v2.0 Programm unter Verwendung der Blossum62 Matrix (Campanella et al. 2003).

	CnPDX1	AtPDX1.1	AtPDX1.2	AtPDX1.3
CnPDX1		63,6	45,3	64,7
AtPDX1.1	73,5		59,7	89,0
AtPDX1.2	64,4	79,0		61,3
AtPDX1.3	75,8	96,4	80,6	

Tabelle 12.5: Vergleich der Aminosäuresequenz von *Ginkgo biloba* PDX1 und AtPDX1 Proteinen in Ähnlichkeit (grau unterlegt) und Identität; angegebene Werte in Prozent. Analyse der Sequenzen mit dem MatGat v2.0 Programm unter Verwendung der Blossum62 Matrix (Campanella et al. 2003).

	GbPDX1	AtPDX1.1	AtPDX1.2	AtPDX1.3
GbPDX1		83,9	58,8	87,1
AtPDX1.1	92,6		59,7	89,0
AtPDX1.2	78,7	79,0		61,3
AtPDX1.3	92,6	96,4	80,6	

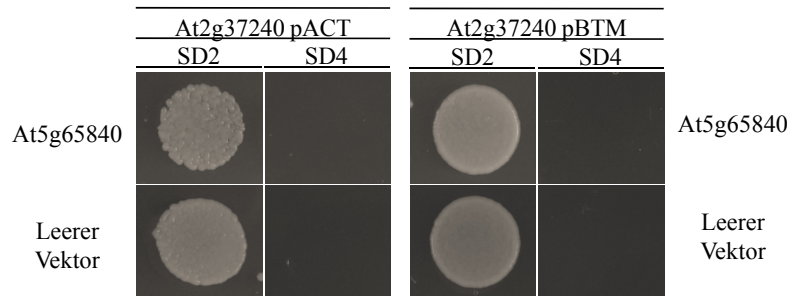


Abbildung 12.5: Y2H Interaktionstest von At5g65840 gegen das ebenfalls als putativ Alkyl-Hydroperoxid Reduktase und Thiol-spezifisches Antioxidant sowie Chloroplasten lokalisierte Protein At2g37240.

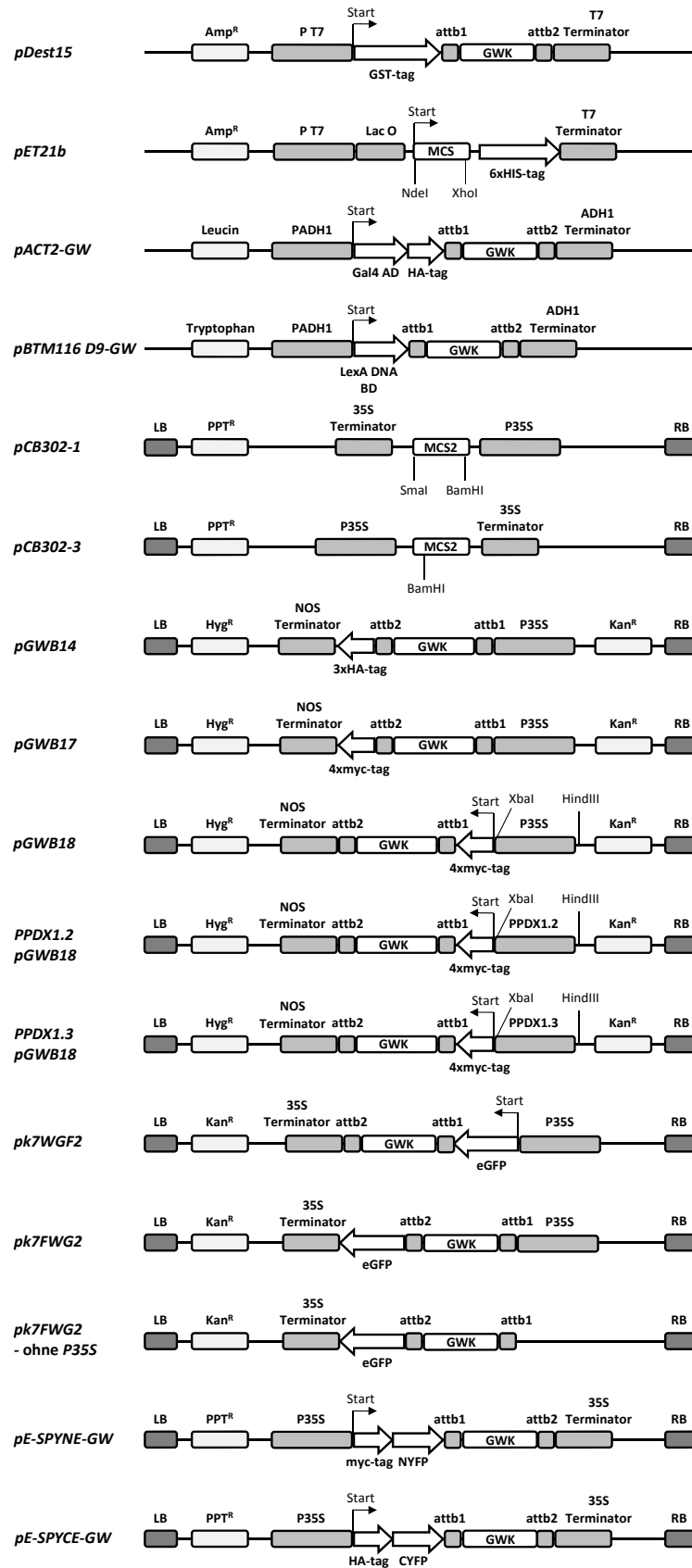


Abbildung 12.6: Schematische Darstellung von Klonierungs- bzw. T-DNA-Bereichen der verwendeten Vektoren (vergl. Tabelle 2.3). GWK-Gatewaykassette; LB-left boarder; RB-right boarder; AD-Aktivierungsdomäne; DNA BD-DNA Bindedomäne; LAC O-Laktose Operator; PPDX1.2, PPDX1.3-Promotor von *AtPDX1.2* (1,8 kb Fragment) bzw. *AtPDX1.3* (1,1kb Fragment).