Charakterisierung der Urat-Oxidase-Mutante von *Arabidopsis thaliana* und Beschreibung eines peroxisomalen Defekts ihrer Embryonen

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

Oliver Kai Hauck

aus Frankfurt am Main

2014

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden in der Zeit von Januar 2011 bis Dezember 2013 am Institut für Biologie der Freien Universität Berlin, Abteilung Biochemie der Pflanzen, unter Anleitung von PD Dr. Claus-Peter Witte durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Claus-Peter Witte

2. Gutachter: Prof. Dr. Tina Romeis

Disputation am 15. Juli 2014

Inhaltsverzeichnis

Abbildu	Abbildungsverzeichnis IV		
Abkürz	AbkürzungenV		
Zusamı	menfassungVII		
Summa	Iry IX		
1 Einle	eitung1		
1.1 U	rat-Oxidase1		
1.1.1	Urat-Oxidase und Stickstoffmobilisierung1		
1.1.2	Verlust der UOX-Funktion in Arabidopsis		
1.1.3	UOX und Harnsäure im Menschen		
1.2 Pe	eroxisomen5		
1.2.1	"Microbodies"		
1.2.2	Glyoxysomen und Peroxisomen in Pflanzen		
1.2.3	Peroxisomen in Keimung und Etablierung8		
1.2.4	Peroxisomendefekte in Arabidopsis9		
1.2.5	Peroxisomendefekte bei Menschen		
1.3 Sa	amenentwicklung, Keimung und Etablierung14		
1.3.1	Samen und Samenentwicklung14		
1.3.2	Dormanz16		
1.3.3	Keimung und Etablierung des Keimlings17		
1.4 Zi	ielsetzung dieser Arbeit19		
2 Mate	erial und Methoden20		
2.1 M	Iaterial20		
2.1.1	Verwendete Geräte und Software		
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial		

2.1.3	Pflanzenlinien	.21
2.1.4	Antikörper	.23
2.2 M	lethoden	.23
2.2.1	Anzucht von Arabidopsis	.23

2.2.2	PCR-Nachweis der T-DNA in uox, xdh und xdh uox2	4
2.2.3	Immunblots und Aktivitätstests für UOX und XDH2	5
2.2.4	Immunblot und GUS-Färbung zur UOX-Expressionsanalyse2	8
2.2.5	Bestimmung der Harnsäure- und Xanthin-Gehalte in Pflanzenmaterial2	9
2.2.6	GC-MS Metabolitenanalyse der Samen von Wildtyp, uox und xdh uox3	1
2.2.7	Lipidanalyse der Samen von Wildtyp, uox und xdh uox	1
2.2.8	Differenzielle Interferenzkontrast-Mikroskopie	2
2.2.9	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	2
2.2.10	SDS-PAGE der Speicherproteine in Wildtyp, uox- und xdh uox-Samen	3
2.2.11	Katalase-Nachweis in Embryonen aus Samen mit DAB-Färbung34	4
2.2.12	Lipidfärbung mit Nilrot	4
2.2.13	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM)	5
2.2.14	Test auf funktionale β -Oxidation in <i>uox</i> -Keimlingen mittels 2,4-DB	б
2.2.15	Test auf funktionale β -Oxidation in adulten <i>uox</i> -Pflanzen mittels Dunkelstress3	7
2.2.16	Statistische Verfahren	7

3 Erg	gebnisse	38
3.1	Nachweis der T-DNA in uox, xdh und xdh uox	38
3.2	UOX- und XDH-Nachweis und -Enzymaktivität in Blattextrakten	
3.3	Der Keimungs- und Etablierungs-Phänotyp der uox-Mutante.	39
3.3.	1 Vergleichende Phänotypenanalyse von <i>uox</i> , <i>xdh</i> , <i>xdh uox</i> und <i>p35S:UOX</i>	41
3.3.	2 Gestörter Abbau der Speicherlipide in der <i>uox</i> -Mutante	42
3.3.	3 Variabilität des <i>uox</i> -Phänotyps	42
3.3.4	4 Die frühembryonale Entwicklung von <i>uox</i>	43
3.4	Das Expressionsmuster von UOX in Arabidopsis	44
3.4.	1 UOX-Promotor-GUS-Analyse	45
3.4.2	2 UOX-Expression im Immunblot	45
3.5	Die Akkumulation von Harnsäure in <i>uox</i>	46
3.5.	1 Harnsäure- und Xanthin-Akkumulation in Samen	46
3.5.	2 Harnsäuregehalt im zeitlichen Verlauf in <i>uox</i> -Geweben	46
3.6	Das Metabolitenprofil von uox- und xdh uox-Samen	48
3.6.	1 Analytik der Primärmetaboliten	48
3.6.	2 Lipidanalytik	49

3.7	K	otyledonen und Speicherproteine in Samen von uox und xdh uox	.51
3.7	.1	Subzelluläre Struktur von uox- und xdh uox-Kotyledonen	.51
3.7	.2	SDS-PAGE der Speicherproteine aus Samen	.53
3.8	Fı	unktionalität von Peroxisomen und β-Oxidation in <i>uox</i>	.53
3.8	.1	Zytochemischer Katalase-Nachweis in Kotyledonen	.53
3.8	.2	Funktionalität des peroxisomalen GFP-Imports in Kotyledonen und Hypokotyle	n
		von <i>uox</i>	.55
3.8	.3	Funktionalität der β-Oxidation in <i>uox</i>	.65

4 Diskussion	68
4.1 <i>uox</i> und andere Mutanten mit Keimungs- und Etablierungs-Phänotyp	68
4.2 Harnsäure- versus Xanthin-Akkumulation	71
4.3 Harnsäurewirkung in Pflanze und Mensch	71
4.3.1 Harnsäure in Arabidopsis	71
4.3.2 Harnsäure im Menschen	72
4.4 Molekulare Wirkungen von Harnsäure	73
4.4.1 Prooxidans oder Antioxidans ?	73
4.4.2 Harnsäure als schwache Säure	73
4.5 Primärmetaboliten-Gehalte in <i>uox</i> -Samen	74
4.6 Lipide und Speicherproteine in <i>uox</i> -Samen	75
4.7 Der Peroxisomendefekt in Samenentwicklung und Keimung von <i>uox</i>	76
4.8 Sensitivität für 2,4-DB als Folge des Mosaizismus	78
4.9 Ausblick	79

5	Literatur	
---	-----------	--

6	An	hang	93
6.	.1	Alle mittels GC-MS identifizierten Metaboliten	.93
6.	.2	Alle Spezies der Lipidanalyse im Detail	.95
6.	.3	PCR-Primer	.98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Purinabbau und Stickstoff-Remobilisierung aus Purinnukleobasen in Arabidopsis	2
Abbildung 1.2: Lokalisation der Enzyme des Glyoxylatzyklus	8
Abbildung 1.3: An der Speicherlipidverwertung beteiligte Enzyme und Transporter	.11
Abbildung 1.4: Peroxine in Arabidopsis	. 13
Abbildung 1.5: Samenentwicklung in Arabidopsis	. 15
Abbildung 1.6: Phasenmodell der Keimung von Samenpflanzen.	. 18
Abbildung 2.1: SALK-Linie 131438	. 21
Abbildung 2.2: Gabi-KatLinie GK-049D04.	. 22
Abbildung 2.3: Vektorkonstrukte für <i>pUOX-GUS</i> -Linie und <i>p35S:UOX</i>	. 22
Abbildung 3.1: Genotypisierung der verwendeten Arabidopsis-Linien.	. 38
Abbildung 3.2: Expression und Aktivität von UOX und XDH in Blattextrakten.	. 39
Abbildung 3.3: Wachstum von Wildtyp und <i>uox</i> mit und ohne Zuckerzusatz	. 40
Abbildung 3.4: Entwicklungsdynamik von <i>uox</i> im Vergleich zum Wildtyp	. 40
Abbildung 3.5: Keimung und Etablierung von <i>uox</i> im Vergleich	.41
Abbildung 3.6: Lipidfärbung von Keimlingen	. 42
Abbildung 3.7: Variabilität des uox-Phänotyps	. 43
Abbildung 3.8: Frühe Embryonalentwicklung von uox	. 43
Abbildung 3.9: UOX-Promotor-Aktivität und Expression von UOX.	.44
Abbildung 3.10: Harnsäure- und Xanthin-Gehalte in Samen und Geweben.	. 47
Abbildung 3.11: Metabolitenanalyse von Samenextrakten	. 49
Abbildung 3.12: Lipidanalyse von Samenextrakten	. 50
Abbildung 3.13: Subzelluläre Struktur der Kotyledonen von Embryonen aus Samen	. 52
Abbildung 3.14: SDS-PAGE der Samenproteine von Wildtyp, uox und xdh uox	. 53
Abbildung 3.15: Katalase-Nachweis mittels DAB-Färbung	. 54
Abbildung 3.16: GFP-Lokalisation in Embryonen von <i>uox</i> und Wildtyp	. 55
Abbildung 3.17: GFP-Lokalisation in <i>uox</i> - und Wildtyp-Embryonen aus Samen	. 60
Abbildung 3.18: Untersuchung der Peroxisomen-Funktionalität mittels 2,4-DB-Test.	. 66
Abbildung 3.19: Wirkung von Dunkelstress auf adulte Pflanzen von uox, pxa1-1 und Wildtyp	. 67
Abbildung 6.1: Übersicht der mittels GC-MS identifizierten Primärmetaboliten	. 93
Abbildung 6.2: Übersicht aller Spezies der Lipidanalyse	. 96

Abkürzungen

°C	Grad Celsius	DTT	Dithiothreitol
μg	Mikrogramm	EDTA Ethylendiamintetraessigsäure	
μl	Mikroliter	ER Endoplasmatisches Retikulum	
μM	mikromolar	et al.	und andere
µmol	Mikromol	FG	Feuchtgewicht
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	FS	Fettsäure
2,4-DB	4-(2,4-Dichlorphenoxy)buttersäure	g	Erdbeschleunigung
ABA	Abscisinsäure	g	Gramm
Abb.	Abbildung	GA	Gibberellinsäure
ACX	Acyl-CoA-Oxidase	GC-MS	Gaschromatographie, gekoppelt mit
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid	~~~	Massenspektrometrie
AMP	Adenosinmonophosphat	GFP	Grünfluoreszierendes Protein
ANOVA	Varianzanalyse	GUS	β-Glucuronidase
AP	Alkalische Phosphatase	h	Stunde
APS	Ammoniumpersulfat	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat	HS	Harnsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	IAA	Indolessigsäure
bp	Basenpaare	IBA	Indolbuttersäure
cDNA	komplementäre DNA	ICL	Isocitrat-Lyase
CLSM	Konfokale Raster-Laser-Mikroskopie	IgG	Immunglobulin G
cm	Zentimeter	JA	Jasmonsäure
СоА	Coenzym A	KAT2	3-Ketoacyl-CoA-Thiolase-2
CSY	Citrat-Synthase	kDa	kilo Dalton
DAB	Diaminobenzidin	1	Liter
dai	<i>days after imbibition</i> = Tage nach dem Auslegen	LACS	Langkettige-Fettsäuren-CoA-Synthetase
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	LT	Langtag
dl	Deziliter	Μ	molar
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	mg	Milligram
dpa	days post anthesis	min	Minute
A	= Tage nach Blütenöffnung	ml	Milliliter

MLS	Malat-Synthase	w/v	Gewie	
mМ	millimolar	Ws	Wassi	
MS	Murashige-Skoog	WT	Wildt	
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid	XDH	Xanth	
mU	Milliunits	X-Gluc	5-Bro Glucu	
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	XO	Xanth	
nm	Nanometer			
OPDA	12-Oxophytodiensäure			
PA	Polyacrylamid			
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese			
PCR	Polymerase-Kettenreaktion			
PEG	Polyethylenglykol			
PEX	Peroxin			
PMS	5-Methylphenaziniummethylsulfat			
PSV	Proteinspeichervakuole			
PTS	peroxisomal targeting signal = peroxisomales Lokalisierungssignal			
PXA	peroxisomaler ABC-Transporter			
RNA	Ribonukleinsäure			
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies			
RT	Raumtemperatur			
s	Sekunde			
SDS	Natriumdodecylsulfat			
-SKL	-Serin-Lysin-Leucin			
TAE	Tris-Acetat-EDTA			
TAG	Triacylglyceride			
Taq	Thermus aquaticus			
TBS-T	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween			
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie			
TG	Trockengewicht			
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan			
UOX	Urat-Oxidase			
v/v	Volumen pro Volumen			

w/v	Gewicht pro Volumen
Ws	Wassilewskija
WT	Wildtyp Col-0
XDH	Xanthin-Dehydrogenase
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D- Glucuronsäure

nin-Oxidase

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Urat-Oxidase-Mutante (*uox*) von *Arabidopsis thaliana* charakterisiert. Urat-Oxidase (UOX) ist ein peroxisomales Enzym des Purinringkatabolismus, welches die Oxidation von Harnsäure zu 5-Hydroxyisourat katalysiert. UOX wird während der späten Embryonalentwicklung und im Keimling, aber auch in Blättern, Wurzeln und Blüten exprimiert. In jeder Nullmutante des Purinringabbaus akkumuliert das Substrat des betroffenen Enzyms, aber unter Standardwachstumsbedingungen zeigt nur *uox* einen auffälligen Phänotyp: Die Keimungsrate ist verringert und die Keimlinge bleiben auf Erde in einem unentwickelten Stadium stecken. Die Keimlinge können die Speicherlipide der Kotyledonen nicht mobilisieren, bilden keine Primärwurzel und die Keimblätter ergrünen nicht. Daher benötigen sie Zuckerzusatz im Medium, um zur Autotrophie zu gelangen. Der *uox*-Phänotyp tritt in der Xanthin-Dehydrogenase-Mutante (*xdh*) nicht auf und ist in *xdh uox* komplett revertiert. Somit ist weder der Ausfall des Purinringabbaus, noch eine etwaige strukturelle Funktion von UOX in Peroxisomen für den Phänotyp verantwortlich.

Eine kolorimetrische Methode zur Quantifizierung von Harnsäure in Pflanzengeweben wurde entwickelt und zeigte ihr Vorkommen ausschließlich in allen Geweben von *uox*, vor allem aber ihre Anhäufung in sich entwickelnden Samen. In *xdh*- und *xdh uox*-Samen akkumulierte Xanthin in vergleichbarer Konzentration, ohne einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp zu verursachen. Im Gegensatz zu anderen Oxopurinen, wie Xanthin, hat HS offenbar eine toxische Wirkung auf die Samen- und Keimlingsentwicklung.

Eine Metaboliten-Analyse von Samen wurde durchgeführt. Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie zeigte einen drastisch erhöhten Gehalt an Uridin und Sorbitol/Galaktitol in *uox*. Letzteres deutet auf starken osmotischen Stress während der Austrocknungsphase der *uox*-Samen hin. Eine Lipidanalyse mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie zeigte in *uox* signifikant mehr freie Fettsäuren aber weniger Glycerophospholipide und kurzkettige Triacylglyceride verglichen mit Wildtyp- und *xdh uox*-Samen.

Transmissionselektronenmikroskopie von Kotyledonen aus Samen zeigte eine veränderte Morphologie der Proteinspeichervakuolen in *uox* mit Einschlüssen unbekannter Zusammensetzung, wohingegen *xdh uox* dem Wildtyp glich. Gleichzeitig wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Gehalt an Speicherproteinen, wie Cruciferin, in *uox*-Samen signifikant verringert gefunden.

Eine konfokalmikroskopische Analyse verschiedener *uox*-Linien, in denen die Peroxisomen GFP-markiert waren, zeigte einen fortschreitenden Verlust der Zahl der punktförmigen GFP-Signale während der späten Samenentwicklung, zeitlich beginnend nach der Harnsäure-Akkumulation. In Embryonen aus *uox*-Samen wies die Mehrzahl der Kotyledonen keine oder nur wenige funktionale Peroxisomen auf. Hypokotyle waren weniger stark betroffen, hier waren apikal häufig noch GFP-Signale vorhanden. Der peroxisomale Defekt in *uox*-Kotyledonen wurde durch den zytochemischen Katalasenachweis mit Diaminobenzidin (DAB) bestätigt. Während Wildtyp und *xdh uox* vergleichbar zahlreiche DAB-Signale in Semidünnschnitten von Keimblättern zeigten, fehlten diese in *uox*-Präparaten.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, dass die Harnsäure-Akkumulation während der Samenentwicklung von *uox* die wahrscheinliche Ursache für den Funktionsverlust von Peroxisomen in Kotyledonen und Hypokotylen ist, was dann den Keimungsdefekt in *uox*-Samen und das Ausbleiben der Autotrophie bei *uox*-Keimlingen zur Folge hat.

Summary

In this study, a urate oxidase mutant of *Arabidopsis thaliana* (*uox*) was characterized. Urate oxidase (UOX) is a peroxisomal enzyme involved in purine ring catabolism which catalyzes the oxidation of uric acid to 5-hydroxyisourate. UOX is expressed in late embryogenesis and during germination of the seedling, but also at later stages in leaves, roots and flower parts. In each of the mutants of purine ring degradation the substrate of the affected enzyme accumulates, but under standard growth conditions only *uox* shows a characteristic phenotype. Its germination rate is low and the seedlings are arrested in their growth on soil at an early stage. The seedlings fail to mobilize their lipid reserves and do not develop a primary root or green cotyledons. Therefore they need an external sugar supply to become autotrophic. As *xdh* (the xanthine dehydrogenase mutant) and *xdh uox* look normal, the lack of purine degradation itself or a structural function of UOX in peroxisomes can be ruled out as the cause of the *uox* phenotype.

A colorimetric method to quantify uric acid in plant tissues was established and demonstrated its accumulation exclusively in all tissues of *uox*, but most prominently in developing and mature seeds. The assay showed a comparable accumulation of xanthine (the substrate of XDH) in seeds of *xdh* and *xdh uox* without causing any obvious phenotype. Obviously uric acid exerts a toxic effect during seed and seedling development whereas other oxopurines like xanthine do not.

A metabolic profiling of seeds was performed. Gas chromatography coupled to mass spectrometry revealed a drastic elevation of uridine and sorbitol/galactitol in the seeds of *uox*. The latter indicates increased osmotic stress during the desiccation phase. Lipid analysis by ultraperformance liquid chromatography showed a significant increase of free fatty acids, but a decrease in the content of glycerophospholipids and short-chain triacylglycerides in *uox* in comparison to seeds of wild type and *xdh uox*.

Transmission electron microscopy of cotyledons dissected from seeds revealed an altered morphology of protein storage vacuoles in *uox* with inclusions of unknown composition whereas *xdh uox* resembled the wild type. At the same time, with SDS-polyacrylamide gel

electrophoresis, the content of storage proteins like cruciferin was found to be significantly lower in *uox* seeds.

Confocal laser scanning microscopy of *uox* lines, in which GFP is targeted to peroxisomes, revealed a progressive loss of punctiform GFP signals in *uox* during late seed development, starting after the accumulation of uric acid. In mature embryos dissected from dry seeds of *uox*, most cotyledons contained none or only few functional peroxisomes. Hypocotyls were less affected, often displaying GFP signals in the apical part. The peroxisomal defect in cotyledons of *uox* was confirmed by cytochemical staining for catalase with diamino benzidine (DAB), which demonstrated numerous DAB-signals in semi thin sections of cotyledons of wild type and *xdh uox* but none in preparations of *uox*.

In summary, the results of this study indicate that the accumulation of uric acid during seed development in *uox* is the likely cause of the loss of peroxisomal function in cotyledons and hypocotyls, which then leads to the germination defect in seeds of *uox* and the failure of *uox* seedlings to establish.

1 Einleitung

1.1 Urat-Oxidase

1.1.1 Urat-Oxidase und Stickstoffmobilisierung

Ein wichtiger Unterschied zwischen Pflanzen und Tieren besteht in ihrem Verhältnis zum Stickstoff: Pflanzen sind an ihren Standort gebunden und können dort unter Stickstoffmangel leiden. Sie sind dann auf die optimale Ausnutzung aller verfügbaren Ressourcen angewiesen und remobilisieren z.B. aus ihren seneszenten Blättern den Stickstoff, der in Proteinen und Nukleobasen (Purine und Pyrimidine) gespeichert ist, um ihn für Blüten und Samen oder Speicherorgane verfügbar zu machen. Die Effizienz der Stickstoffverwertung stand in Pflanzen offenbar unter so großem Selektionsdruck, dass die häufigsten Proteine von Arabidopsis thaliana und Reis (Oryza sativa) rund 15% weniger Stickstoff in ihren Seitenketten enthalten als der Durchschnitt aller Proteine in diesen beiden Spezies. Für Kartoffel (Solanum tuberosum) und Sojabohne (Glycine max) ist dieser Wert noch höher, während in den untersuchten Tierarten kein solcher Zusammenhang gefunden wurde (Elser et al., 2006). Tiere nehmen mit ihrer Nahrung mehr als ausreichend organisch gebundenen Stickstoff auf. Um die Akkumulation des neurotoxischen Ammoniums zu vermeiden, hat die Evolution dort Mechanismen hervorgebracht, um überschüssigen Stickstoff aus Aminosäuren und Nukleinsäuren unter möglichst geringem Energie- und Wasserverbrauch auszuscheiden, z.B. als Harnstoff, Harnsäure, Allantoin oder Ammonium selbst.

Stickstoff ist in Organismen überwiegend in Proteinen festgelegt, aber auch Nukleinsäuren enthalten in ihren Pyrimidin- und Purinbasen eine beträchtliche Menge dieses Elements. Pflanzen besitzen alle Enzyme, um sowohl die Pyrimidinbasen als auch die Purinbasen für die Remobilisierung des darin enthaltenen Stickstoffs vollständig abzubauen (Zrenner *et al.*, 2009; Werner und Witte, 2011). Allgemein beinhaltet der Purinabbau in Organismen die Dephosphorylierung der Nukleotide, danach die Hydrolyse der entsprechenden Nukleoside und anschließend die Desaminierung und Oxidation der Purinbasen (Zrenner *et al.*, 2006). Neuere Untersuchungen in *Arabidopsis* zeigten jedoch, dass der Purinabbau dort nach dem in Abbildung 1.1 gezeigten Weg von Adenosinmonophosphat (AMP) über Guanosinmonophosphat (GMP) zu Guanosin verläuft, weil Xanthosin *in vivo* ausschließlich durch Desaminierung von Guanosin entsteht (Dahncke und Witte, 2013).



Abbildung 1.1: Purinabbau und Stickstoff-Remobilisierung aus Purinnukleobasen in *Arabidopsis*. Der Abbau der Purinnukleotide und -nukleoside verläuft in *Arabidopsis* ausgehend vom AMP über Xanthosin nach dem hier gezeigten Weg. Bei der Harnsäureoxidation in Peroxisomen durch UOX entsteht Wasserstoffperoxid (H₂O₂), das durch Katalase entsorgt wird. AMP, Adenosinmonophosphat; GMP, Guanosinmonophosphat; IMP, Inosinmonophosphat; XMP, Xanthosinmonophosphat; NAD, Nicotinamidadenindinukleotid. Abbildung nach Werner und Witte (2011) und Dahncke und Witte (2013).

Möglicherweise trifft dies generell für Pflanzen zu. Xanthosin wird durch eine Nukleosid-Hydrolase in Xanthin und Ribose gespalten. Der Purinheterozyklus wird dann durch zwei Oxidationen zur Öffnung vorbereitet: Xanthin wird im Zytosol durch Xanthin-Dehydrogenase (XDH) in Harnsäure (HS) umgewandelt (Hesberg *et al.*, 2004; Werner und Witte, 2011), diese wird in das Peroxisom importiert, wo durch Urat-Oxidase (UOX) molekularer Sauerstoff in das Molekül eingeführt wird. UOX ist eine Oxidoreduktase und kommt in Organismen von Bakterien bis zu Säugetieren vor. In *Arabidopsis* wird sie vom Locus At2g26230 codiert und hat ein molekulares Gewicht von 35 kDa.

UOX katalysiert die Reaktion: $HS + O_2 + H_2O \rightarrow 5$ -Hydroxyisourat + H_2O_2 , wofür das Enzym weder Metallionen noch einen Redox-Cofaktor benötigt (Gabison *et al.*, 2010). 5-Hydroxyisourat wird im Peroxisom durch zwei weitere Reaktionen zu (*S*)-Allantoin umgesetzt (Lamberto *et al.*, 2010). Dieses gelangt ins Endoplasmatische Retikulum (ER) und wird von mehreren Hydrolasen bis zum Glyoxylat abgebaut, wobei der Stickstoff Schritt für Schritt als NH₃ frei wird (Werner *et al.*, 2010; Werner *et al.*, 2013). Beide Endprodukte werden durch einen noch unbekannten Mechanismus aus dem ER exportiert. Durch die Enzyme Glutaminsynthetase und <u>G</u>lutamin-<u>O</u>xoglutarat-<u>A</u>mino<u>t</u>ransferase (GOGAT/ Glutamat-Synthase) erfolgt dann die Reassimilation des NH₃ durch Einbau in Glutamin und Glutamat.

Der Purinkatabolismus spielt in tropischen Leguminosen eine wichtige Rolle im Stickstoffhaushalt. In der Sojabohne (*Glycine max*) wird der in den Wurzelknöllchen symbiotisch fixierte Stickstoff in den dortigen Plastiden über Glutamin in Purinnukleotide eingebaut. Anschließend ist der Purinabbau über Xanthin und HS zu den Ureiden Allantoin und Allantoat essenziell, weil letztere die Transportform für Stickstoff von den Orten der Fixierung zu den Orten des Verbrauchs sind (Schubert, 1986).

1.1.2 Verlust der UOX-Funktion in Arabidopsis

Im Zuge der Erforschung des Purinabbauweges und der daran beteiligten Enzyme in Arabidopsis wurde bei Vorarbeiten in der AG Witte eine UOX-Nullmutante (uox) in Pflanzen isoliert. Andere Enzymverlustmutanten des Purinringkatabolismus zeigen unter Standardwachstumsbedingungen bei normaler Nährstoffversorgung keinen vom Wildtyp (WT) abweichenden Phänotyp (Todd und Polacco, 2006; Brychkova et al., 2008; Werner et al., 2008; Werner et al., 2013). Im Gegensatz dazu wurde erst nach Genotypisierung einer großen Anzahl von Keimlingen eine homozygote UOX-T-DNA-Insertionsmutante identifiziert. Ergrünte Keimlinge, die auf Erde aus den Samen einer heterozygoten (WT/uox) Mutterpflanze gezogen wurden, hatten nämlich ganz überwiegend den Genotyp WT/WT oder WT/uox. Gleichzeitig wurden viele ungekeimte Samen gefunden und solche, bei denen die Entwicklung der Keimlinge frühzeitig zum Stillstand gekommen war. Diese zeigten einen charakteristischen Phänotyp, bei dem die Keimblätter weiß und unentwickelt blieben. Das kurz gestreckte Hypokotyl ergrünte, aber es wurde keine Primärwurzel gebildet. Mit Zuckerzusatz, auf Festmedium angezogen, konnten uox-Keimlinge, mit zeitlicher Verzögerung, zur Autotrophie gelangen. In der Folge hat in unserem Labor Jana Scharnberg wichtige Erkenntnisse gesammelt, die sie in ihrer Diplomarbeit beschrieben hat. Sie konnte zeigen, dass durch das Wiedereinbringen eines funktionellen UOX-Gens in uox der Phänotyps revertiert wird und in einer XDH UOX-Doppelmutante (xdh uox) komplett supprimiert ist (Scharnberg, 2010).

Da UOX in Peroxisomen bei Pflanzen wie Tieren vorkommt und die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse über das Pflanzenfeld hinaus von Bedeutung sein können, werden im Folgenden auch die Auswirkungen des Verlustes von UOX im Menschen und in der Maus beschrieben.

1.1.3 UOX und Harnsäure im Menschen

Der Mensch stellt gewissermaßen eine natürliche *UOX*-Mutante dar. Während die meisten Säugetiere, wie z.B. Mäuse, in ihren Leberperoxisomen Purinbasen zu dem gut wasserlöslichen Allantoin abbauen und dieses mit dem Harn ausscheiden, ist beim Menschen HS das Endprodukt, weil im Verlaufe der Hominiden-Evolution das *UOX*-Gen durch Mutationen funktionslos wurde (Wu *et al.*, 1992). Dieser Ausfall ging in mehreren Schritten vor sich, wobei anfängliche Mutationen nur die Promotorregion betrafen und eine reduzierte UOX-Aktivität zur Folge hatten (Oda *et al.*, 2002; Álvarez-Lario und Macarrón-Vicente, 2010). So könnte es zu einer allmählichen Adaption an höhere HS-Gehalte gekommen sein, z.B. durch Herunterregulierung der *XDH*-Expression (Ichida *et al.*, 2012). In Mäusen hat die experimentelle Ausschaltung von *UOX* dagegen drastische Folgen. Normalerweise haben diese einen Serumgehalt an HS von unter 1 mg/dl. *UOX-knockout*-Mäuse hatten mehr als 10-fach erhöhte Serumspiegel und innerhalb der ersten 4 Wochen nach Geburt starben mehr als die Hälfte der Neugeborenen an dem Versagen ihrer durch Uratablagerungen zerstörten Nieren (Wu *et al.*, 1994).

Der Komplettausfall der Urat-Oxidase in unseren Vorfahren geschah dann vor ca. 15 Mio. Jahren (Oda et al., 2002). Daraus resultierten erhöhte HS-Serumspiegel nahe seiner Löslichkeitsgrenze (um 7 mg/dl). Einerseits wurde diese Mutation offenbar nicht gegenselektiert, zum anderen wird in den Nieren ein Großteil der HS aktiv resorbiert. Daher wurde schon früh ein nützlicher Effekt des erhöhten HS-Spiegels für die frühen Menschenaffen angenommen (Ames et al., 1981). Diskutiert wird heute seine Funktion als i) Antioxidans mit neuroprotektiver Wirkung (Scott und Hooper, 2001), ii) als Immunstimulans, da nach dem Zelltod freiwerdende HS winzige Kristalle bildet und einen molekularen Marker für Zellschädigung (damage associated molecular pattern) darstellt (Shi et al., 2003) oder iii) seine blutdrucksteigernde Wirkung für unsere Hominiden-Vorfahren, die sich häufig salzarm ernähren mussten (Watanabe et al., 2002). Wenn aber "moderne" Ernährungsgewohnheiten (viel fettes Fleisch und Kohlenhydrate) und eine genetische Veranlagung zusammen kommen, sind HS-Serumspiegel jenseits 7 mg/dl die Folge: Es bilden sich Natriumuratkristalle, die sich in Gelenken und Nieren ablagern und dort entzündliche Prozesse wie Gicht oder Steinbildung auslösen (Rock et al., 2013).

4

1.2 Peroxisomen

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass dem *uox*-Phänotyp ein Peroxisomendefekt zugrunde liegt. Daher sollen diese Organellen etwas ausführlicher eingeführt werden.

1.2.1 "Microbodies"

In den 1950er Jahren fanden Elektronenmikroskopiker in Präparaten von Mäusenieren (Rhodin, 1954) und Rattenlebern (Rouiller, 1956) kleine Organellen, die sie auf den Namen "Microbodies" tauften. Diese waren von einer einfachen Membran umgeben und die biochemische Untersuchung der entsprechenden Fraktionen von ultrazentrifugierten Extrakten ergab, dass in ihnen unter Sauerstoffverbrauch Substrate oxidiert wurden (z.B. durch Urat-Oxidase) wobei H₂O₂ entstand. Dieses wurde durch Katalase wieder zu Sauerstoff und Wasser abgebaut, und so erhielten die Organellen als Orte des Wasserstoffperoxid-Metabolismus den Namen "Peroxisomen" (de Duve und Baudhuin, 1966).

In Pflanzen wurden Peroxisomen zum ersten Mal 1967 im Labor von Harry Beevers aus den ölhaltigen Samen des Wunderbaumes (*Ricinus communis*) isoliert. Eine Fraktion mit gleichem Sedimentationsverhalten und elektronenmikroskopischem Aussehen wie die der Peroxisomen aus Tieren zeigte ebenso Katalase-Aktivität, zusätzlich aber auch die der Enzyme des Glyoxylatzyklus. Diese Organellen erhielten von den Autoren folgerichtig den Namen "Glyoxysomen" (Breidenbach *et al.*, 1968). Bald darauf wurde von der gleichen Gruppe (ebenfalls in *Ricinus*) gezeigt, dass sie auch die Hauptorte der β -Oxidation waren (Cooper und Beevers, 1969).

Im folgenden Jahr wurde in der Peroxisomenfraktion aus Spinatblattextrakten neben Katalase- auch Glykolat-Oxidase- und Glyoxylat-Reduktase-Aktivität gefunden. Damit waren die Blattperoxisomen als die Orte der Photorespiration wahrscheinlich geworden (Tolbert *et al.*, 1968). Später wurden auch die Peroxisomen aus anderen Pflanzengeweben wie Knollen, Früchten und Wurzeln untersucht (Huang und Beevers, 1971). Da diese eine begrenztere Enzymausstattung aufwiesen als Glyoxysomen oder Blattperoxisomen wurden sie zunächst als "unspezialisierte Peroxisomen" bezeichnet.

Die gemeinsamen Merkmale aller bis dahin untersuchten Varianten von Peroxisomen waren die Aktivitäten von Oxidasen und Katalase, das gleiche Sedimentationsverhalten im Saccharosegradienten und das ähnliche Aussehen in elektronenmikroskopischen Präparaten.

5

1.2.2 Glyoxysomen und Peroxisomen in Pflanzen

Aus historischen und praktischen Gründen unterscheidet man in der Botanik bis heute vor allem Glyoxysomen wegen ihrer Bedeutung für den Abbau von Speicherlipiden in keimenden ölhaltigen Samen von Blattperoxisomen, die an der Photorespiration beteiligt sind. Neuere Arbeiten auf dem Feld der Proteomik und Zellbiologie zeigten aber, dass die Gemeinsamkeiten in der Enzymausstattung die Unterschiede bei weitem überwiegen. Peroxisomen enthalten rund 300 Proteine, davon sind über 70 an der Oxidation von Fettsäuren (FS) beteiligt, nur zehn an der Photorespiration und rund 20 am Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (Reumann *et al.*, 2004). Glyoxysomen zeichnen sich wahrscheinlich nur durch den Besitz von Isocitrat-Lyase (ICL), Malat-Synthase (MLS) und Citrat-Synthase (CSY) vor anderen Peroxisomen aus (Kunze *et al.*, 2006; Pracharoenwattana *et al.*, 2007; Kunze und Hartig, 2013). Konsequenterweise wurde daher auch vorgeschlagen, den Terminus "Glyoxysom" ganz aufzugeben und einheitlich von Peroxisomen zu sprechen (Pracharoenwattana und Smith, 2008).

In der β-Oxidation von FS und dem Glyoxylatzyklus kooperieren Peroxisomen mit Ölkörpern und Mitochondrien (Abb. 1.2 und 1.3). Ebenfalls durch β-Oxidation werden in Peroxisomen aus Vorstufen die Phytohormone Jasmonsäure (JA) und Indolessigsäure (IAA) gebildet. In Eukaryoten sind sie die Orte des HS-Katabolismus und maßgeblich an der Entstehung und Entsorgung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS) beteiligt. In der Photorespiration arbeiten Peroxisomen eng mit Chloroplasten und Mitochondrien zusammen, um die Folgen der Oxygenasereaktion der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) zu beseitigen.

1.2.2.1 Neuentstehung von Peroxisomen

Für die Biogenese von Peroxisomen wird heute ein "ER/semi-autonomes Modell" favorisiert, dem hauptsächlich Beobachtungen an Hefe und tierischer Zellkultur zugrunde liegen. Nach diesem entstehen sie *de novo* aus spezifischen Regionen des ER. Weitere Membranproteine werden dann durch Vermittlung von Biogenese-Peroxinen in die Peroxisomenmembran eingebaut (siehe dazu den Übersichtsartikel von Hu *et al.* (2012) und Abb.1.4). Die Anzahl der Peroxisomen wird durch den physiologischen Zustand der Zellen reguliert. Werden mehr benötigt, teilen sie sich. Sie enthalten aber im Gegensatz zu Mitochondrien und Chloroplasten keine eigene DNA und sind daher "semi-autonom". Proteine, die für das Innere der Peroxisomen (Matrix) bestimmt sind, enthalten eine bestimmte Konsensus-Sequenz von Aminosäuren (*peroxisomal targeting signal*, PTS), die C-terminal (PTS1, häufig –SKL, also Serin-

Lysin-Leucin) oder N-terminal (PTS2) gelegen ist und für ihre Erkennung durch Frachtimport-Peroxine nötig sind (Gould et al., 1988; Swinkels et al., 1991). In der Matrix befinden sich außer den Enzymen des Metabolismus auch Proteasen, die z.B. PTS2 abspalten (Abb. 1.4). Weitere Proteasen für den Abbau beschädigter und nicht mehr benötigter Proteine wurden postuliert, konnten bislang aber nicht identifiziert werden. In Pflanzen gibt es keinen direkten Beleg für eine Neubildung von Peroxisomen aus dem ER und auch der Verbleib von oxidationsgeschädigten und überflüssigen peroxisomalen Proteinen ist unklar. Prinzipiell kämen dafür Proteasen, Export oder der komplette Abbau des Organells in Frage. Eine neuere Arbeit in Arabidopsis zeigte, dass bei Import- (pex5-10) und Export-Mutanten (pex4-1 pex22-1) der fristgerechte Abbau von MLS und ICL nach der Keimung verzögert ist (Lingard et al., 2009). Es ist also denkbar, dass für die Entsorgung von Matrixproteinen ein intakter Import-/Export-Zyklus nötig ist, der diese ubiquitiniert und anschließend im Zytosol den Proteasomen zum Abbau überlässt. Im Gegensatz zu Hefe und Säugern gibt es in Pflanzen bislang noch keinen direkten Beweis für Pexophagie, also den intrazellulären Verdau von Peroxisomen durch den Autophagieapparat der Zelle. Neuere Arbeiten, bei denen Autophagiegene in Arabidopsis ausgeschaltet wurden, machen jedoch Pexophagie in Pflanzen zunehmend wahrscheinlich (Farmer et al., 2013; Kim et al., 2013; Shibata et al., 2013).

1.2.2.2 Funktionswechsel von Peroxisomen

Die Umwandlung von Glyoxysomen in Peroxisomen (Titus und Becker, 1985; Nishimura *et al.*, 1986; Sautter, 1986) und umgekehrt (Nishimura *et al.*, 1993) wurde durch Doppelmarkierungs-Experimente mit Immunogold gezeigt, in denen das gleichzeitige Vorkommen peroxisomaler und glyoxysomaler Proteine in den Übergangsstadien, d.h. ihre Colokalisation demonstriert wurde. Diese Befunde sprechen für eine "Eine-Population-Hypothese" (Trelease *et al.*, 1971), nach der für einen Funktionswechsel der Peroxisomen grundsätzlich weder Neubildung noch kompletter Abbau der Organellen erforderlich wäre (Nishimura *et al.*, 1996). Diese Arbeiten wurden an Gurke, Wassermelone und Kürbis durchgeführt und obwohl für *Arabidopsis* gezeigt wurde, dass Enzyme des Glyoxylatzyklus und der Photorespiration vorübergehend gleichzeitig in Kotyledonen vorkommen (Lingard *et al.*, 2009), fehlt der entsprechende Nachweis durch Colokalisation im Organell. Für die Modellpflanze *Arabidopsis* ist also unklar, wie z.B. die Umwandlung der Population photorespirativer Peroxisomen zu einer solchen von Glyoxysomen während der Samenreifung konkret erfolgt, d.h. welchen Anteil daran die Veränderung des Enzymbestandes hat und in welchem Ausmaß Neubildung von Organellen und eventuell Pexophagie daran beteiligt sind.

1.2.3 Peroxisomen in Keimung und Etablierung

Kreuzblütler wie *Arabidopsis thaliana* legen die Speicherreserven ihrer Samen überwiegend als Triacylglyceride (TAG) in den Keimblättern der Embryonen an. Dabei bilden sich mizellenartige Erweiterungen des ER, die als Ölkörper abgeschnürt werden und in Kotyledonenzellen eines reifen Embryos mehr als die Hälfte des Zellvolumens einnehmen (Mansfield und Briarty, 1992). Diese Speicherlipide dienen dem Keimling als Energiequelle und als Kohlenstoffvorrat zur Umwandlung in Zucker bis zum Erreichen der Autotrophie, was in den Pflanzenwissenschaften als "Etablierung" des Keimlings bezeichnet wird.

Peroxisomen werden in der Keimungsphase traditionell als Glyoxysomen bezeichnet. Sie beherbergen die Enzymausstattung, um die aus den Ölkörpern mobilisierten FS zu importieren, zu Thioestern zu aktivieren und sie in der β -Oxidation schrittweise zu Acetyl-CoA abzubauen. Dieses wird dann in einer als Glyoxylatzyklus bezeichneten Reaktionsfolge netto in die C4-Verbindung Succinat umgewandelt. Succinat wird aus den Peroxisomen exportiert und über die Zwischenschritte Fumarat, Malat und Oxalacetat (OAA) entsteht im Zytosol die aktivierte C3-Verbindung Phosphoenolpyruvat (PEP), welche nun für Gluconeogenese und die Bildung des Transportzuckers Saccharose zur Verfügung steht (Abb. 1.2 und 1.3). Neuere Untersuchungen zeigten allerdings, dass Glyoxysomen nicht alle für den Glyoxylatzyklus benötigten Enzyme enthalten (Abb. 1.2): Vielmehr benötigen sie Membrantransporter für Citrat, Isocitrat, Malat und Oxalacetat, weil Aconitase und die für die Malat-Oxidation relevante Malat-Dehydrogenase im Zytosol lokalisiert sind (Kunze *et al.*, 2006; Pracharoenwattana *et al.*, 2007; Kunze und Hartig, 2013).



Abbildung 1.2: Lokalisation der Enzyme des Glyoxylatzyklus.

Der Glyoxylatzyklus ist zum Teil außerhalb der Glyoxysomen lokalisiert. Diese zeichnen sich vor anderen Peroxisomen wahrscheinlich nur durch den Besitz von Citrat-Synthase (CSY), Isocitrat-Lyase (ICL) und Malat-Synthase (MLS) aus. Aus Pracharoenwattana und Smith (2008).

1.2.4 Peroxisomendefekte in Arabidopsis

1.2.4.1 Einzelenzym-Mutanten

Die Aufklärung der Peroxisomenfunktion auf genetischer Ebene begann mit einer Arbeit von Hayashi et al. (1998). Ihr Ansatz machte sich zunutze, dass in der β-Oxidation das synthetische Proherbizid 2,4-Dichlorophenoxybuttersäure (2,4-DB) in das wirksame Herbizid 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (2,4-D) umgewandelt wird, welches konzentrationsabhängig das Wachstum der Primärwurzel des Keimlings hemmt (Wain und Wightman, 1954). In Arabidopsis thaliana wurden nach der Behandlung von Samen mit dem Mutagen Ethylmethansulfonat (EMS) Linien identifiziert, deren Keimlinge mit 2,4-DB im Medium besseres Wurzelwachstum als der Wildtyp zeigten. Gleichzeitig benötigten die Keimlinge der vier am schwersten betroffenen Mutantenlinien nach der Keimung Zuckerzusatz im Medium, um zur Autotrophie zu gelangen. Es handelte sich also offenbar um Mutanten, die durch einen Peroxisomendefekt nicht mehr 2,4-DB in 2,4-D umwandeln, aber gleichzeitig auch ihre Speicherlipide nicht mehr verwerten konnten. Durch eine genetische Analyse konnten die Mutationen (ped 1, ped 2, ped 3-1 und ped 3-2, für peroxisome defective) drei Genloci zugeordnet werden, die in dieser und späteren Arbeiten (Hayashi et al., 2000; Hayashi et al., 2002) als KAT2 (codiert für 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase-2), PEX14 (Peroxin 14) und PXA1 (peroxisomaler ABC Transporter 1) identifiziert wurden.

In den folgenden Jahren wurden weitere Mutanten in *Arabidopsis* identifiziert, die sich graduell in ihrer Keimungsfähigkeit, der Zuckerabhängigkeit der Keimlinge für die Etablierung und ihrer Sensitivität für Vorstufen von Auxinanaloga wie 2,4-DB unterschieden. Dies ist in Übersichtsartikeln dargestellt (Goepfert und Poirier, 2007; Graham, 2008; Theodoulou und Eastmond, 2012). Hier seien die grundlegenden Prinzipien genannt, die sich nach und nach aus den Einzelarbeiten herauskristallisierten:

- Der Ort der Mutation innerhalb eines betroffenen Gens bestimmt maßgeblich die Schwere des Phänotyps. Im Falle des Gens für den peroxisomalen FS-Importer Comatose (*ped3/pxa1/cts*-Mutanten) reicht das Spektrum der Phänotypen von 0% Keimung bis zu normaler Keimung mit Etablierung ohne Zucker (Dietrich *et al.*, 2009).
- Die betroffenen Gene codieren durchweg f
 ür Proteine, die am Speicherlipidabbau in den Ölkörpern (SDP1), Transportprozessen an der Peroxisomenmembran (PED3/PXA1/CTS; PXN/PMP38; PNC), der Fettsäureaktivierung (LACS), der

β-Oxidation (*ACX; MFP2; PED1/KAT2*), am Glyoxylatzyklus (*ICL; MLS; CSY*) oder der Gluconeogenese (*PCK1*) im Zytosol beteiligt sind (Abb. 1.3)

- Die Keimungsrate ist unabhängig von der Fähigkeit zur Mobilisierung der Speicherlipide (Pritchard *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 2011) und auch Zuckerzusatz steigert sie nicht (Pinfield-Wells *et al.*, 2005). Für die Keimung ist die β-Oxidation essenziell, da Mutanten, die in der Funktionsfähigkeit der β-Oxidation beeinträchtigt sind (z.B. *acx1 acx2*, *kat2*; *pxa1-1*; *cts-1* und *cts-2*) eine verminderte Keimungsrate haben (Footitt *et al.*, 2006). Offenbar werden in der β-Oxidation Moleküle umgesetzt, die an der Auslösung des Keimungsvorganges entscheidend beteiligt sind. Hierfür werden z.B. JA-Vorstufen wie OPDA diskutiert (Dave *et al.*, 2011).
- Mutanten, in denen eine bestimmte Enzymaktivität für die Umwandlung von Speicherlipiden zu Acetyl-CoA komplett ausgeschaltet ist, haben Keimlinge, die sich ohne Zuckerzusatz im Medium nicht etablieren können. Die Enzymaktivität kann dabei redundant über mehrere Gene verteilt sein, wie in *lacs6 lacs7* (Fulda *et al.*, 2004) oder *acx1 acx2* (Pinfield-Wells *et al.*, 2005).
- Im Gegensatz zur β-Oxidation ist ein funktionierender Glyoxylatzyklus für Keimung und Etablierung des Keimlings nicht zwingend notwendig: *icl-* und *mls-*Mutanten keimen und kommen auf Erde zur Autotrophie, wenn auch nur unter optimalen Lichtbedingungen. Wahrscheinlich kann aus dem in der β-Oxidation entstehenden Acetyl-CoA in den Mitochondrien ausreichend Energie gewonnen werden und die Nichtlipid-Kohlenstoffreserven des Samens genügen dann zum Erreichen der Autotrophie (Eastmond *et al.*, 2000; Eastmond und Graham, 2001).



Abbildung 1.3: An der Speicherlipidverwertung beteiligte Enzyme und Transporter.

Links: Aus den Ölkörpern werden Fettsäuren durch Lipasen (SDP1, DGL, MGL) aus Tri-, Di- bzw. Monoacylglyceriden (TAG, DAG, MAG) freigesetzt und durch den Transporter Comatose (CTS) in Peroxisomen importiert. Spätestens im Peroxisom werden sie durch Long Chain <u>Acyl-CoA-Synthetasen</u> (LACS6/7) unter ATP-Verbrauch zu Acyl-CoA aktiviert. In der β -Oxidation werden diese durch Acyl-CoA-Oxidase (ACX), ein multifunktionales Protein mit Hydratase (HYD)- und Dehydrogenase (DH)-Funktion und die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (KAT) zyklisch verkürzt. Dabei entsteht jeweils Acetyl-CoA, welches im Glyoxylatzyklus netto Succinat liefert.

Rechts: Zwei der "klassischen" Enzyme des Glyoxylatzyklus sind zytosolisch lokalisiert (Aconitase, ACO und Malat-Dehydrogenase, MDH). Über den mitochondrialen Citratzyklus (TCA cycle) entsteht aus Succinat Oxalacetat (OAA), welches im Zytosol durch Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PCK) in eine energiereiche C3-Verbindung (PEP) überführt wird. Diese steht dann für die Gluconeogenese zur Verfügung.

Aus Theodoulou und Eastmond (2012).

1.2.4.2 Peroxinmutanten

Eine andere Klasse von *Arabidopsis*-Mutanten, die aber einen ähnlichen Keimungs- und Etablierungs-Phänotyp zeigen, ist in der Funktion der Peroxine gestört, die von *PEX*-Genen codiert werden (Abb. 1.4). Grundlegende Erkenntnisse wurden an Hefen gewonnen, bei denen es mehr als 30 *PEX*-Gene gibt (Platta und Erdmann, 2007). Beim Menschen sind 14 *PEX*-Gene bekannt (Waterham und Ebberink, 2012), in *Arabidopsis* über 20. Durch eine

Analyse von RNAi-*knockdown*-Linien konnten sie in *Arabidopsis* in zwei funktionelle Klassen eingeteilt werden (Nito *et al.*, 2007).

Die erste Klasse umfasst Peroxine, die für die frühe Biogenese (PEX3, 16, 19) und die Teilungsfähigkeit (PEX11) der Peroxisomen notwendig sind. PEX3, 16 und 19 werden daher als Biogenese-Peroxine bezeichnet und stellen den Apparat dar, der für den Einbau weiterer peroxisomaler Membranproteine nötig ist. Ihr Totalausfall hat das Verschwinden von Peroxisomen in der Zelle überhaupt und Letalität zur Folge. Mutanten von *pex11* haben dagegen überlange Peroxisomen, die sich nicht mehr teilen können (Erdmann und Blobel, 1995; Hu *et al.*, 2012).

Die zweite, zahlreichere Klasse von Peroxinen ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Peroxisomenfunktion, weil sie den Import (möglicherweise auch den Export) von Proteinen in die Matrix leisten. Matrixproteine, wie ICL oder KAT2, werden im Zytosol synthetisiert und beinhalten eine Lokalisierungssequenz (PTS1 oder PTS2), die von den zytosolischen Rezeptoren PEX5 und PEX7 erkannt wird. Die Komplexe werden vermittelt durch PEX13 und PEX14 importiert und die Rezeptoren anschließend unter Beteiligung von Recycling-Peroxinen ubiquitiniert und wieder ins Zytosol entlassen (Abb. 1.4). Peroxisomale Importmutanten konnten in *Arabidopsis* identifiziert werden, weil in ihnen Fluoreszenzmarker wie GFP-PTS1 im Zytosol mislokalisiert gefunden wurden (Mano *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2011).

In den von Nito *et al.* (2007) untersuchten RNAi-*knockdown*-Linien lag die Restexpression der Peroxine bei 20-40% und es zeigte sich, dass Linien, in denen Biogenese-Peroxine herunterreguliert waren, keinen Zucker im Medium für ihr Ergrünen brauchten und weiter 2,4-DB sensitiv waren. Sie besaßen vergrößerte oder verlängerte, aber meist noch eine ausreichende Zahl funktionsfähiger Peroxisomen. Linien mit gestörtem Proteinimport hingegen waren zuckerabhängig und resistent gegen hohe 2,4-DB-Konzentrationen im Wachstumsmedium. Sie hatten normal aussehende, aber funktionell gestörte Peroxisomen, in denen offenbar die β -Oxidation beeinträchtigt war (Nito *et al.*, 2007).

Für *PEX*-Mutanten gilt auch wieder, dass Transposon-Insertionsmutanten (*pex5-10, pex7-2*) meist schwerere Phänotypen zeigen als Punktmutanten (*pex5-1, pex7-1*), die aus einer EMS-Mutagenese hervorgegangen sind. Viele Nullmutanten sind embryoletal, wie z.B. *pex2* (Hu *et al.*, 2002), *pex10* (Schumann *et al.*, 2003; Sparkes *et al.*, 2003) und *pex12* (Fan *et al.*, 2005),



Abbildung 1.4: Peroxine in Arabidopsis. Peroxine sind hier schematisch als Kreise und Ovale dargestellt. Sie lassen sich nach ihrer Funktion in verschiedene Gruppen einteilen. (A) Biogenese-Peroxine (PEX3, 16, 19) sind für die Bildung von Peroxisomen aus dem ER und den Einbau weiterer peroxisomaler Membranproteine nötig. (B) Frachtimport-Peroxine (PEX5, 7, 13, 14) vermitteln den Rezeptor-vermittelten Import von Matrixproteinen, während Recycling-Peroxine diese Rezeptoren wieder ins Zytosol transportieren. Der komplette Ausfall eines Peroxins hat in der Regel Letalität zur Folge. Bisher sind lediglich zwei peroxisomale Proteasen charakterisiert (LON2 und DEG15). PXA1 ist für den Import von Fettsäuren und Auxinvorstufen (IBA) notwendig. Blau umrandete Peroxine wurden im Bartel-Labor charakterisiert.

http://www.bioc.rice.edu/~bartel/projects/peroxins .jpg, mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Bonnie Bartel, Rice University Houston. (Beschriftung wurde ins Deutsche übertragen).

aber auch Doppelmutanten mit stark reduziertem Transkriptgehalt, wie *pex7-2 pex5-1* oder *pex7-2 pex5-10* (Ramon und Bartel, 2010) können embryoletal sein.

Die *pex5-10*-Mutante, in der ein verkürztes PEX5-Protein gebildet wird, zeigt zytosolische Mislokalisation sowohl von GFP-PTS1 als auch von PTS2-GFP und eine niedrige Keimungsrate. Das Anritzen der Samenschale ermöglicht der Keimwurzel den Durchtritt (ähnliches gilt für viele Mutanten von *PED3/PXA1/CTS*), doch der Keimling ist für die Etablierung auf externen Zucker angewiesen. Er bleibt anschließend in der Entwicklung hinter dem Wildtyp zurück und ist weniger fertil (Khan und Zolman, 2010). Es handelt sich hier also um eine generalisierte, durchgehende Entwicklungsverzögerung aufgrund der anhaltend gestörten Peroxisomenfunktion.

1.2.5 Peroxisomendefekte bei Menschen

Störungen der Peroxisomenfunktion führen beim Menschen zu schwerwiegenden Erkrankungen. Es wird auch hier unterschieden zwischen Einzelenzym-Defizienzen, die Stoffwechselwege in den Peroxisomen betreffen und Störungen der peroxisomalen Biogenese. Letztere werden überwiegend dem Zellweger Syndrom Spektrum (ZSS) zugerechnet. Die ZSS- Erkrankungen werden autosomal-rezessiv vererbt, d.h. beide Allele eines *PEX*-Gens müssen betroffen sein, um die Krankheit hervorzurufen. Das ZSS reicht von Fällen embryonaler Letalität über das eigentliche Zellweger Syndrom, bei dem die Patienten charakteristische Missbildungen des Schädels und der Augen haben und im Säuglingsalter sterben, bis zu Patienten mit vergleichsweise milderen Verlaufsformen (Neurologische sowie Leber- und Nierenfunktionsstörungen), die das Jugend- und Erwachsenenalter erreichen (Steinberg *et al.*, 2006; Waterham und Ebberink, 2012).

1.3 Samenentwicklung, Keimung und Etablierung

1.3.1 Samen und Samenentwicklung

Bei Samenpflanzen entwickelt sich der Embryo in einer vor dem Austrocknen geschützten Umgebung innerhalb (Bedecktsamer) oder auf (Nacktsamer) der Mutterpflanze. Er wird dabei mit Reservestoffen für die Zeit der Heterotrophie unmittelbar nach der Keimung ausgestattet und anschließend weitgehend entwässert. So kann er bei fast ruhendem Stoffwechsel lange Zeit überdauern, um erst dann zu keimen, wenn die Umgebung dafür günstig ist. Abbildung 1.5 gibt einen Überblick des zeitlichen Verlaufs der Samenentwicklung und Einlagerung von Reservestoffen in *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Wassilewskija (Ws).

Die Samenentwicklung verläuft bei Bedecktsamern wie *Arabidopsis* in mehreren Phasen. Nach der typischen doppelten Befruchtung wird in der Morphogenese durch präzis koordinierte Zellteilungen die Grundgestalt des Embryos angelegt, wodurch dieser zu genau definierten Zeitpunkten charakteristische Stadien wie *globus, heart, torpedo* und *bent cotyledon* durchläuft (Jürgens und Mayer, 1994).

Die anschließende Reifungsphase ist durch Zellwachstum und -differenzierung sowie die Einlagerung von Reservestoffen (Samenfüllung) entweder in den Embryo selbst (z.B. in Kreuzblütlern wie *Brassica* und *Arabidopsis*) oder in zusätzlichen Strukturen wie dem Endosperm (z.B. in *Ricinus communis*) gekennzeichnet. Die Samenfüllung wird entscheidend von Phytohormonen (Auxine, ABA und GA) und Transkriptionsfaktoren (FUS3, ABI3 und LEC2) gesteuert (Baud *et al.*, 2008).

In den Ölsamen von *Arabidopsis* bestehen die Energie- und Kohlenstoffreserven überwiegend aus TAG in Ölkörpern, die einen Großteil des Zellvolumens einnehmen. Die Synthese der Speicherlipide im Embryo findet in den Plastiden statt, wobei die benötigten Synthesevorstufen aus dem Zuckerabbau stammen. An dem Fettsäure-Synthase-Komplex werden zyklisch die aus Acetyl-CoA gebildeten Malonyl-CoA-Einheiten angehängt, wodurch



Abbildung 1.5: Samenentwicklung in Arabidopsis. Von oben nach unten: 1) Phasen der Samenentwicklung; 2)+3) relatives Volumen, das Endosperm und Embryo innerhalb des Samens einnehmen; 4) Charakteristische Embryonalstadien: globus, *heart/torpedo, bent cotyledon*, Embryo nach Abschluss der frühen Morphogenese; 5) Speicherreserven des Samens im zeitlichen Verlauf: Öl steht hier im Wesentlichen für Triacylglceride, die in der Spätphase der Samenentwicklung teilweise abgebaut werden. Die Speicherproteine werden in auffälligen Speichervakuolen zusammengelagert. Kohlenhydrate, wie Stärke und Saccharose, treten dagegen mengenmäßig zurück; 6) Die Zeitachse stammt aus der Untersuchung an A. thaliana Ökotyp Ws.

Modifiziert nach Baud *et al.* (2008). Beschriftung wurde ins Deutsche übertragen.

zunächst gesättigte Fettsäuren entstehen. Durch Desaturasen werden Doppelbindungen eingeführt, sodass im reifen Samen schließlich ungesättigte FS (18:1-3, 20:1) überwiegen. Im ER werden sie mit Glycerol-3-Phosphat zu Mono-, Di- und schließlich Triacylglycerolen verestert und diese in Ölkörpern eingelagert (Baud und Lepiniec, 2010). Wie Ölkörper mechanistisch aus dem ER entstehen, ist noch unklar. Ihr Zusammenfließen wird von den sehr zahlreich in die Phospholipid-Halbmembran eingelagerten Oleosinen verhindert (Siloto *et al.*, 2006).

Der reife Embryo von *Arabidopsis* enthält nur geringe Mengen Zucker, Saccharose ist dabei das häufigste Kohlenhydrat (Abb. 1.5, 5). Die Hauptspeicherproteine in *Arabidopsis* sind 12S-Globuline (Cruciferine) und 2S-Albumine (Arabidine). Sie werden als Vorläufer in das ER hinein synthetisiert und mittels einer Prozessierungs- und Sortierungsmaschinerie in Proteinspeichervakuolen (PSV) zusammengelagert (Shimada *et al.*, 2003b; Gruis *et al.*, 2004; Fuji *et al.*, 2007).

In der abschließenden Samenreifung verliert der sich entwickelnde Same in der Austrokknungsphase den Großteil seines Wassers. Es handelt sich hierbei um alles andere als einen Prozess, den der Embryo nur passiv "erleidet". Vielmehr wurde gezeigt, dass sich in dieser Phase die Transkription tausender Gene ändert und die Gehalte an stickstoffreichen Aminosäuren, sowie Fumarat, Succinat und Sorbitol stark ansteigen (Fait *et al.*, 2006; Angelovici *et* *al.*, 2010). Generell birgt zellulärer Wasserverlust die Gefahr der Membranfusion und Denaturierung von Proteinen. In Modellversuchen an Membran- und Proteinsystemen wurden Substanzen identifiziert, die diese Interaktionen verhindern können (Hoekstra *et al.*, 2001). Es sind dies die gleichen Aminosäuren und Aminosäure-Derivate (Prolin, Glycinbetain), Polyole (Glycerol, Sorbitol) und Oligosaccharide (Saccharose, Trehalose), die in Pflanzen und Mikroorganismen als sogenannte kompatible Solute wirken (Hoekstra *et al.*, 2001).

Während der Austrocknungsphase wurde in *Brassica napus* (Eastmond und Rawsthorne, 2000; Chia *et al.*, 2005) und *Arabidopsis* (Baud *et al.*, 2002) auch eine 10-28%-ige Abnahme des Gehaltes an Speicherlipiden beobachtet. Die Bedeutung dieses Vorganges ist noch unklar.

1.3.2 Dormanz

Nach dem "Haltbarmachen" durch Entwässerung tritt der Same in eine metabolische Ruhephase ein. Bei vielen Arten ist zu beobachten, dass die frischen Samen selbst bei ausreichend Wasser, Licht und Wärme nicht sogleich keimen können, was als Samenruhe oder Dormanz bezeichnet wird. In *Arabidopsis* ist Dormanz in den verschiedenen Akzessionen je nach geographischer Herkunft genetisch unterschiedlich stark verankert und wird zudem von Umweltfaktoren während der Samenentwicklung beeinflusst (Bewley, 1997; Alonso-Blanco *et al.*, 2003). Im Ökotyp Col-0 kann sie leicht durch einige Wochen der trockenen Lagerung (Nachreifung) oder einige Tage in feuchter Kälte (Stratifikation) gebrochen werden.

Für die Einleitung der Samenruhe ist Abscisinsäure (ABA) verantwortlich, die Entscheidung über ihre Aufrechterhaltung oder Brechung wird jedoch maßgeblich von dem Verhältnis des Gehalts an Gibberelinsäure (GA) und Abscissinsäure (GA:ABA) im Samen bestimmt, wie aus der Analyse von Mutanten für die Biosynthese oder Deaktivierung dieser Hormone hervorging (Koornneef *et al.*, 2002; Nambara und Marion-Poll, 2005). Defekte in der GA-Synthese oder -Perzeption verhindern Keimung, während solche der ABA-Synthese oder Perzeption Samen noch an der Mutterpflanze keimen lassen (Viviparie). Bei geringerem ABA-Gehalt im Samen wird auch weniger GA zur Keimung benötigt. Keimungsfördernd wirken Faktoren wie Nachreifung (Aufbewahrung in Trockenheit), Licht, Stratifikation (feuchte Kälte), Nitrat und Stickstoffmonoxid, die im Embryo den Gehalt an GA erhöhen oder den von ABA erniedrigen. Licht wirkt zum Beispiel sowohl auf den GA-wie auf den ABA-Gehalt ein (Seo *et al.*, 2009). Schließlich begünstigt ein hohes GA:ABA-Verhältnis das Wachstumspotential der Streckungszone und fördert gleichzeitig den enzymatischen Abbau

des Pektins (hauptsächlich Polygalakturonsäure) in der Samenschale, welche der Keimwurzel mechanischen Widerstand leistet. Eine neuere Arbeit lieferte Belege für das Einwirken des Transporterproteins Comatose (PED3/PXA1/CTS) auf die Kaskade, die zum Pektinabbau durch Galakturonasen in der Samenschale führt (Kanai *et al.*, 2010).

Zusammengefasst stehen Samenentwicklung, Dormanzstatus und Keimungspotential unter der Kontrolle eines molekularen Netzwerkes aus Regulatorproteinen und Hormonen, das Umwelteinflüsse wie Licht und Temperatur integriert und dann über die Modulation des Zytoskeletts und die Induktion von Abbauenzymen (wie Galakturonasen) embryonales Streckungswachstum und Zellwandstabilität beeinflusst (Holdsworth *et al.*, 2008).

1.3.3 Keimung und Etablierung des Keimlings

Der Begriff Keimung wurde und wird oft ungenau definiert. Landläufig wird als Keimung der gesamte Vorgang von der Quellung des Samens bis zum Erscheinen und Ergrünen des Keimlings an der Erdoberfläche bezeichnet. Das Ergrünen setzt aber bereits die erfolgreiche Keimung voraus und benötigt die Mobilisierung und Verwertung der Speicherreserven des Samens. Physiologisch gesehen ist die Keimung ein zweiphasiger Prozess, der mit der Rehydrierung des Samens beginnt (Abb. 1.6). In der Folge nehmen die Gewebe des Embryos die mitochondriale Atmung und damit die Energieerzeugung wieder auf. Kurz darauf setzen DNA-Reparatur und Translation gespeicherter mRNAs, danach RNA-Neusynthese und die Synthese neuer Proteine ein (Nonogaki et al., 2010). Transkriptom-Analysen in Arabidopsis haben gezeigt, dass in der anschließenden zweiten Phase Prozesse wie Glykolyse, Citratzyklus und oxidativer Pentosephosphatweg anlaufen und der Embryo seine Zuckerreserven aufbraucht (Weitbrecht et al., 2011). Sie findet ihren Abschluss, wenn die Keimwurzel das Endosperm durchbrochen hat und äußerlich sichtbar wird. Dafür muss zum einen durch Streckungswachstum im Hypokotyl unmittelbar proximal der Keimwurzel genügend Druck aufgebaut werden (Sliwinska et al., 2009), andererseits müssen vor allem im Bereich der Mikropyle die Pektine der Samenschale durch Polygalakturonasen verdaut werden (Nonogaki et al., 2010; Weitbrecht et al., 2011).

Die Nach-Keimungsphase ist durch DNA-Synthese, Zellteilungen und in *Arabidopsis* durch die Mobilisierung der TAG aus den Ölkörpern und der Proteine aus den PSV gekennzeichnet (Abb. 1.6). Um möglichst schnell autotroph zu werden, muss der Keimling die Primärwurzel mit Wurzelhärchen und den Photosynthese-Apparat aufbauen, wofür im Wesentlichen die Lipidreserven der Kotyledonen zur Verfügung stehen. Dafür ist er auf eine funktionierende

 β -Oxidation in den Peroxisomen zwingend angewiesen (Footitt *et al.*, 2006), während der Glyoxylatzyklus unter nicht-optimalen Lichtverhältnissen einen entscheidenden Überlebensvorteil bietet (Eastmond *et al.*, 2000; Eastmond und Graham, 2001). Die Rolle der Peroxisomen für die Umwandlung von Speicherlipiden in Zucker wurde in Abschnitt 1.2.3 beschrieben.



Abbildung 1.6: Phasenmodell der Keimung von Samenpflanzen.

Die Keimung im eigentlichen Sinne (*sensu stricto*) kann in zwei Phasen unterteilt werden. Phase I beginnt mit der Samenquellung und der Rehydrierung der Embryogewebe. Die zelluläre Atmung setzt ein, es finden Reparaturen, Transkription, Translation und Proteinsynthesen statt. In Phase II laufen diese Prozesse weiter und es werden Zuckerreserven mobilisiert. Sie findet ihren Abschluss, wenn die Keimwurzel die Samenhüllen durchbricht. Nach der Keimung beginnt in *Arabidopsis* die Mobilisierung der Hauptspeicherreserven, der TAG aus den Ölkörpern.

Modifiziert nach Nonogaki (2010). Beschriftung wurde ins Deutsche übertragen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der Fund, dass der Ausfall von Urat-Oxidase in *Arabidopsis* einen ähnlichen Phänotyp erzeugt, wie er bei Nullmutanten für Enzyme der Speicherlipidverwertung auftritt: Geringe Keimungsrate und das Ausbleiben der Kotyledonen-Entwicklung und Autotrophie der Keimlinge. Augenfällig war nun, dass sowohl der HS-Abbau als auch der für die Keimung und Etablierung entscheidende Prozess der β-Oxidation in ein und demselben Organell, nämlich dem Peroxisom, beheimatet sind.

Da hier ein ursächlicher Zusammenhang vermutet wurde, galt ein Hauptinteresse der Untersuchung der Peroxisomen-Funktionalität in *uox* zu verschiedenen Phasen der Pflanzenentwicklung. In Keimlingen und adulten Pflanzen geschah dies mittels 2,4-DB-Test und der Anwendung von Dunkelstress. Für die Untersuchung von Embryonen verschiedener Reifestadien standen transgene Linien von *uox* und Wildtyp zur Verfügung, die unter der Kontrolle eines starken, konstitutiven Promotors GFP2 exprimieren und in die Peroxisomen importieren. Diese Linien wurden am Konfokalmikroskop ausgewertet.

Ferner wurde eine Akkumulation von HS in *uox* erwartet, welche zeitlich und räumlich mit der *UOX*-Expression, d.h. der Aktivität des Purinringabbaus korreliert. Laborintern stand noch kein geeigneter quantitativer Nachweis für HS zur Verfügung, daher war eine weitere Aufgabe die Etablierung eines gekoppelten enzymatischen Nachweises für die HS-Messung in Pflanzenextrakten aus verschiedenen Geweben und während der Embryonalentwicklung. Um die Expression von *UOX*, und damit die Aktivität des Purinringkatabolismus in *Arabidopsis* zu dokumentieren, wurden zum einen Reporter-Linien untersucht, die unter der Kontrolle des *UOX*-Promotors das Enzym β -Glucuronidase (GUS) exprimieren, zum anderen wurden anti-UOX-Immunblots von Proteinextrakten angefertigt.

Ein weiteres Ziel war die Charakterisierung des Gehaltes an Metaboliten in *uox* im Vergleich zum Wildtyp und der *xdh uox*-Doppelmutante, um molekulare Ursachen für die schädliche Wirkung der HS und den Keimungsdefekt zu ermitteln. Hierfür wurden Extrakte aus Samen hergestellt und ihr Gehalt an Primärmetaboliten, Lipiden und Speicherproteinen analysiert.

Schließlich war es notwendig, die reifen *uox*-Embryonen aus Samen auch auf dem subzellulären Niveau zu untersuchen. Dafür wurden Ultradünnschnitt-Präparate durch die Keimblätter angefertigt und mittels Transmissionselektronenmikroskopie zytologische Auffälligkeiten von *uox* im Vergleich zum Wildtyp und *xdh uox* identifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte und Software

- Lichtmikroskop Zeiss Axioplan (Carl Zeiss AG, Oberkochen)
- Stereolupe Nikon Model C-DS mit DN 100 Digital Net Camera System (Nikon GmbH, Düsseldorf)
- Stereolupe Olympus SZX 12 mit Software CellSens 1.3 (Olympus GmbH, Hamburg)
- Lichtmikroskop Zeiss Axiophot, ausgestattet mit Nomarski-Optik sowie Kamera ProgRes CF (Jenoptik AG, Jena) und Software Capture Pro 2.8.8 (Kodak GmbH, Stuttgart)
- TEM Philips EM 208 (Philips GmbH, Hamburg)
- CLSM Leica TCS SP5, ausgestattet mit einem HCX PL APO lambda blue 63.0x 1.20 Water UV-Objektiv und computergesteuert durch LAS AF Software (Leica Camera AG, Solms)
- Photometer MultiSkan Go (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Pflanzenanzuchtschränke APT.line TM KBW 400 (Binder GmbH, Tuttlingen)
- Western Blot Transfersystem Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad Laboratories, München)
- Mini 2-D Electrophoresis System (Hoefer Inc., USA)
- Retschmühle MM400 (Retsch GmbH, Haan)
- MS Office 2010 (Microsoft Corp.)
- Adobe CS6 (Adobe Systems GmbH)
- Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software Inc.)
- Endnote X6 (Thomson Reuters)
- ImageJ v 1.47 (NIH, USA)
- Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen Corp.)

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

- Xanthin-Agarose (Sigma-Aldrich X3128)
- Bio-Rad Protein-Assay-Färbereagenz 500-0006 (Bio-Rad Laboratories, München)
- Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid 29:1-Lösung (Fluka 01708)
- Acrylamid/Bisacrylamid 30%-Lösung (Sigma-Aldrich A3699)
- Murashige-Skoog Medium mit MES-Puffer (Duchefa, Haarlem, NL)
- Phytoagar (Duchefa, Haarlem, NL)
- Urat-Oxidase (Uricase) aus Candida sp. (Sigma-Aldrich U0880)
- Xanthin-Oxidase (SERVA 38418)
- Meerettich-Peroxidase (Sigma-Aldrich P8375)
- X-Gluc-Färbesubstrat (Carl Roth 0018)
- Nilrot-Farbstoff (SIGMA N3013)

- Amplex® Ultra Red (Invitrogen A36006)
- Spurr's Low-Viscosity Einbettmedium, beschrieben in Spurr (1969).
- PageRulerTM Prestained Protein Ladder (Thermo Pierce SM0671)
- 5-fach-konzentrierter GoTaq® Reaktionspuffer (Promega, Mannheim)
- Hyperladder I DNA-Marker (Bioline, Luckenwalde)

Alle übrigen verwendeten Laborchemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad und stammten von den Herstellern Applichem (Darmstadt), GE Healthcare (Freiburg), Bio-Rad (München), Fluka (St. Gallen, Schweiz), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim).

- Nitrocellulose-Membran (HybondTM-ECL, GE-Healthcare)
- Keramikkugeln (1/4 inch Ceramic Spheres, MP Biomedicals, USA)
- 5 ml-HiTrap-Desalting Column (GE Healthcare)
- UV-transparente Platten (UV-Star No. 655899, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)

2.1.3 Pflanzenlinien

Alle Mutantenlinien von *Arabidopsis* werden in dieser Arbeit gleich wie das entsprechende mutierte Allel bezeichnet (z.B. *uox* für die *UOX*-Mutante). Folgende Linien standen für die vorliegende Arbeit zur Verfügung:

- Als Wildtyp (WT) wurde der Arabidopsis thaliana Ökotyp Col-0 benutzt.
- Die homozygote Urat-Oxidase-Mutante (*uox*, Locus At2g26230) wurde in unserem Labor aus der heterozygoten SALK-Linie 131438 hergestellt, die eine bestätigte T-DNA Insertion im ersten Proteincodierenden Exon aufweist (Abb.2.1).



Abbildung 2.1: SALK-Linie 131438.

UOX wird in Arabidopsis von 8 Exons codiert. Gezeigt sind der Insertionsort der T-DNA in der verwendeten uox-Linie sowie Lage und Orientierung der spezifischen PCR-Primer.

 Die homozygote Xanthine Dehydrogenase 1-Mutante (*xdh1*, Locus At4g34890), hergestellt aus der heterozygoten GABI-Kat.-Linie GK-049D04, die eine bestätigte T-DNA Insertion im vierten Proteincodierenden Exon trägt, wurde unserem Labor von Dr. Florian Bittner (TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt (Abb. 2.2).



Abbildung 2.2: Gabi-Kat.-Linie GK-049D04.

XDH1 codiert in *Arabidopsis* für ein Protein von 150 kDa. Gezeigt sind der Insertionsort der T-DNA sowie Lage und Orientierung der spezifischen PCR-Primer.

- Die homozygote *xdh1 uox*-Doppelmutante wurde durch Kreuzung in unserem Labor erhalten.
- Die Linie *pxa1-1* ist beschrieben in Zolman *et al.* (2001), die Linie *pex5-10* in Khan und Zolman (2010).
- *pUOX-GUS-Linie:* Für die Erzeugung eines *UOX-*Promotor-β-Glucuronidase (GUS)-Konstruktes wurde in unserem Labor ein 1554 bp Promotor-Fragment von genomischer DNA durch PCR amplifiziert (Primer 1825 und 1826) und damit der mit AscI und EcoRI ausgeschnittene 35S-Promotor von pI1 (Matschi *et al.*, 2013) ersetzt. Eine *GUS-*cDNA wurde mit den Primern 403 und 438 vom phs23-Vektor (Scholthof, 1999) amplifiziert und mittels EcoRI und SmaI in pI1 inseriert, woraus pI2-*pUOX-GUS* (P83, Abb. 2.3.a) resultierte. Dieses wurde in Col-0 transformiert.
- *p35S-UOX-Linie:* Mit den Primern 1823 und 1824 wurde in unserem Labor aus Blatt-RNA eine UOXcDNA hergestellt und diese zwischen NcoI und XmaI in pXS2pat (Cao *et al.*, 2010) ligiert. Das erhaltene Konstrukt (P93, Abb. 2.3.b), in dem UOX unter der Kontrolle eines 35S-Promotors exprimiert wird, wurde in *uox* transformiert.



Abbildung 2.3: Vektorkonstrukte für *pUOX-GUS-Linie* und *p35S:UOX*. a) *pUOX-GUS*-Konstrukt, mit dem die *UOX*-Expression untersucht wurde, b) *p35S-UOX*-Konstrukt, welches zur Komplementierung des *uox*-Phänotyps verwendet wurde.

 roGFP2-SKL-Linie: Das p35S:GRX1-roGFP2-SKL Konstrukt ist in Meyer et al. (2007) und Rosenwasser et al. (2011) beschrieben. Es wurde in Col-0 transformiert von Prof. Andreas Meyer (Universität Bonn) unserem Labor zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Antikörper

- Für die Entwicklung von anti-UOX und anti-XDH Immunblots wurden verdünnte Seren verwendet, die von immunisierten Kaninchen gewonnen wurden. Eine UOX-cDNA wurde in unserem Labor mit den Primern 1823 und 1824 amplifiziert, genauso wurde mit den Primern 2604 und 2626 der Teil einer XDH-cDNA amplifiziert, der für die FAD-bindende Domäne codiert. Die Fragmente wurden jeweils in pET30a eingefügt und die erhaltenen Konstrukte in *E. coli* exprimiert. Das aufgereinigte Protein aus *E. coli* diente zur Herstellung der Antiseren wie in Dahncke *et al.* (2013) beschrieben.
- anti-Kaninchen IgG, AP-konjugiert (SIGMA A3687)
- anti-GFP aus Maus (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- anti-Maus IgG, AP-konjugiert (SIGMA A3688).

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von Arabidopsis

2.2.1.1 ¹/₂ MS-Festmedium für die Anzucht von *Arabidopsis* in Petrischalen

2,5 g MS-Salz (Duchefa) in 1 Liter ddH₂O lösen und mit 0,1 N KOH den pH-Wert auf 5,7 einstellen, dann 0,8% Phytoagar zugeben, 30 min bei 121°C autoklavieren und vor dem Erkalten in Petrischalen gießen.

2.2.1.2 Oberflächensterilisation der Samen

Vor dem Auslegen auf Anzuchtmedium wurden die Samen 5 min in 70%-igem Ethanol geschüttelt, dann in 100 % Ethanol überführt und mittels einer Pipette auf steriles Whatman-Papier zum Trocknen überführt.

2.2.1.3 Anzuchtbedingungen

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Langtag (LT, 16 h Licht/8 h Dunkelheit)

- in einer Pflanzenkammer, ausgestattet mit Philips Master HPI-T Plus 400 W-Lampen, bei ca. 60% Luftfeuchtigkeit und ca. 100 μmol m⁻² s⁻¹ Lichtstärke auf Mischerde (je 42,5% Einheitserde P und T (Gebr. Patzer GmbH) und 15% PerligranG (Knauf Perlite GmbH) oder alternativ auf ½ MS-Festmedium in Petrischalen.
- in Binder-Klimaschränken mit Osram Lumilux-Leuchtstoffröhren bei ca. 100 μmol m⁻² s⁻¹ Lichtstärke auf ½ MS-Festmedium.

Die *uox*-Mutante wurde stets in der Pflanzenkammer auf ½ MS-Festmedium mit 2% Saccharose bis zur Etablierung der Keimlinge vorgezogen und dann auf Mischerde umgesetzt. Für Experimente, bei denen die Keimung verschiedener Genotypen verglichen werden sollte, wurden die auf Mischerde oder ½ MS-Festmedium ausgelegten Samen für 2 Tage bei 4°C in Dunkelheit gestellt (Stratifikation).

2.2.2 PCR-Nachweis der T-DNA in *uox, xdh* und *xdh uox*.

Die Präparation genomischer DNA aus *Arabidopsis* erfolgte nach der in Edwards *et al.* (1991) beschriebenen Methode mit Isopropanol. Sie wurde so modifiziert, dass der Probenaufschluss mit einigen Stahlkugeln (1 mm) in 200 µl des beschriebenen Puffers in einer Retschmühle erfolgte und das Pellet abschließend mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet wurde.

Alle Proben wurden durch PCR mit den Primern N61 und 1886 (zum Nachweis der SALK-T-DNA in *uox*), 1233 und 1886 (Nachweis des Wildtyp-Allels von *UOX*), 448 und 1969 (Nachweis der GABI-Kat-T-DNA in *xdh*) sowie 1968 und 1969 (Nachweis des Wildtyp-Allels von *XDH*) überprüft. Die Sequenzen aller verwendeten Primer sind in Anhang 6.1 aufgeführt.

2.2.2.1 PCR-Ansatz

20 µl PCR-Ansatz	0,5 µl laboreigene Taq-Polymerase
	4 µl 5-fach konzentrierter Green GoTaq® Reaktionspuffer
	1,5 mM MgCl ₂
	1 mM dNTP-Mix (0,25 mM pro dNTP)
	0,4 µM Primer (0,2 µM pro Primer)
	1 µl DNA-Präparation

2.2.2.2 PCR-Programm

Phase	Temperatur	Dauer
1. Denaturierung	94°C	3 min
2. Denaturierung	94°C	30 s
3. Annealing	55-58°C	30 s
4. Elongation	72°C	1,5 min
5. finale Elongation	72°C	10 min

2-4: 40 Zyklen

55°C: 448 + 1969 (GABI-Kat T-DNA)

58°C: 1233 + 1886 (Wildtyp-Allel von *UOX*), 1968 + 1969 (Wildtyp-Allel von *XDH*), N61 + 1886 (SALK-T-DNA).

2.2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese
---------	---------------------------

TAE-Puffer (pH 8)	40 mM TRIS HCl 1 mM EDTA
	20 mM Essigsaure
Die Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte in 1%-igen (w/v) Agarosegelen aus Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer mit 50 ng ml⁻¹ Ethidiumbromid, die Dokumentation unter UV-Beleuchtung.

2.2.3 Immunblots und Aktivitätstests für UOX und XDH.

2.2.3.1 Proteinextraktion

100 mM HEPES (pH 7.7)	
1 mM EDTA	
0.1% Triton X-100	
5 mM DTT	
0,1 mM AEBSF	
	100 mM HEPES (pH 7,7) 1 mM EDTA 0.1% Triton X-100 5 mM DTT 0,1 mM AEBSF

Für die Proteinextraktion wurde jeweils 1 g frisches Blattmaterial von 4-Wochen-alten Pflanzen von Wildtyp, *uox, xdh, xdh uox* und *p35S:UOX* in einem eisgekühlten Mörser mit wenig Sand in 2,5 ml Extraktionspuffer zermahlen. Nach dem Zentrifugieren (15 min bei 4°C und 20.000g) wurde die Proteinkonzentration in den Überständen mit dem Bio-Rad Färbereagenz unter Verwendung einer Protein-Standardreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) bestimmt.

Sammelgele	 4-5% Acrylamid/Bisacrylamid 125 mM TRIS HCl (pH 6,8) 0,1% (w/v) SDS (fehlte in nativen Gelen) 0,1% (v/v) TEMED 0,1% (w/v) APS
Trenngele	8-10% Acrylamid/Bisacrylamid 375 mM TRIS HCl (pH 8,8) 0,1% (w/v) SDS (fehlte in nativen Gelen) 0,05% (v/v) TEMED 0,1% (w/v) APS
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,5 mM SDS
SDS-PAGE-Ladepuffer (5-fach konzentriert)	300 mM TRIS HCl (pH 6,8) 50% (v/v) Glycerin 10% (w/v) SDS 600 mM DTT 0,1% (w/v) Bromphenolblau

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

PAGE wurde nach dem diskontinuierlichen Verfahren von Laemmli durchgeführt. Für anti-UOX-Immunblots wurde jeweils so viel Überstand mit 5-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer gemischt und 5 min bei 95°C inkubiert, dass pro Bahn 50 µg Protein auf ein 10%-iges Polyacrylamid (PA)-Gel geladen wurde. Für die Immunblots, die mit anti-XDH-Serum inkubiert wurden, wurde jeweils 500 μ l Überstand der Extrakte mit gleichem Volumen 40%igem PEG-4000 gemischt, 15 min auf Eis präzipitiert, zentrifugiert, danach das Pellet in 100 μ l SDS-Ladepuffer resuspendiert, dann 5 min bei 95°C inkubiert und 20 μ l pro Bahn auf ein 8%-iges PA-Gel geladen.

Immunblot-Transferpuffer	48 mM TRIS (pH 9,2) 40 mM Glycin 0,5 mM SDS
	20% (v/v) Methanol
TBS-Tween (TBS-T)-Puffer	20 mM TRIS HCl (pH 7,6) 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween 20
AP-Detektionspuffer	100 mM TRIS (pH 9,5) 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,125 mg ml ⁻¹ BCIP 0,25 mg ml ⁻¹ NBT

2.2.3.3 Immunblots zum Nachweis von UOX und XDH

Nach dem Elektrotransfer der Proteine (über Nacht bei 40 V und 4°C) auf Nitrocellulosemembran erfolgte die Kontrolle des Transfers durch reversible Ponceau-Färbung (5 min in 0,1% (w/v) Ponceau-S in 5% Essigsäure). Die Membran wurde anschließend für 1 h bei RT in TBS-T mit 5% Milchpulver inkubiert, um das unspezifische Binden der Serum-Antikörper an die Membran zu verhindern (*Blocking*). Dann wurde die Membran für 3 mal 5 min in TBS-T gewaschen, anschließend erfolgte die Inkubation mit den verdünnten Seren (anti-UOX 1:600, anti-XDH 1:800) von immunisierten Kaninchen für 1 h bei RT. Danach erfolgte Waschen für 3 mal 5 min in TBS-T, dann die Inkubation mit AP-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (1:5000). Nach erneutem Waschen für 3 mal 5 min in TBS-T und 5 min Waschen in TBS erfolgte abschließend die Entwicklung des Blots in AP-Detektionspuffer.

A TRIS
M Glycin
M TRIS HCl (pH 6,8)
v/v) Glycerin
(w/v) Bromphenolblau
M TRIS Puffer (pH 8,5)
(w/v) Hypoxanthin
% (w/v) PMS
% (w/v) MTT

2.2.3.4 Nachweis der XDH-Aktivität in nativen Polyacrylamid-Gelen

Für den In-Gel-XDH-Aktivitätstest wurde je 500 µl Überstand der Proteinextrakte mit gleichem Volumen PEG-4000 gemischt, für 15 min auf Eis präzipitiert, dann zentrifugiert, danach die Pellets in 100 µl nativem Ladepuffer aufgelöst. Auf ein 8%-iges, natives PA-Gel wurden 20 µl pro Bahn geladen und bei 4°C gefahren. Das Gel wurde lichtgeschützt über Nacht unter leichtem Schütteln bei RT in der Färbelösung inkubiert.

2.2.3.5 Messung der UOX-Aktivität

Puffer 1 (Nachweispuffer):	10 mM Taurin Puffer (pH 9,0) 0,25 mM EDTA 0,01% Triton X-100 1 mM DTT
Puffer 2 (Elutionspuffer)	30 mM Taurin Puffer (pH 9,0) 0,25 mM EDTA 0,01% Triton X-100 1 mM DTT 250 μM Harnsäure

Für den UOX-Aktivitätstest wurden Proteinextraktionen wie in 2.2.3.1 beschrieben durchgeführt und nach dem Zentrifugieren jeweils 2 ml der Überstände über eine Gelfiltrationssäule (HiTrap-Desalting Column) entsalzt und dabei in Puffer 1 überführt. Der Proteingehalt der entsalzten Proben wurde mit Bio-Rad Färbereagenz bestimmt und jeder Probe 50 μ l Xanthin-Agarose-Suspension zugesetzt. Die Ansätze wurden für 20 min unter Rotieren bei 4°C inkubiert, um UOX zu binden. Nach dem Zentrifugieren (1 min bei 700*g*) wurde der Überstand verworfen und die gebundene UOX für 3 min bei 30°C im Schüttler in 300 μ l Puffer 2 eluiert. Jeweils 200 μ l des Eluats wurde in die Vertiefungen einer UV-durchlässigen Mikroplatte pipettiert. HS absorbiert Licht der Wellenlänge 292 nm. Aus einer HS-Standardreihe wurde berechnet, welcher Absorption welche HS-Konzentration entspricht. Einer Konzentrationsabnahme von 1 μ M entspricht ein HS-Verbrauch von 0,2 nmol in dem 200 μ l-Ansatz. In den ersten 10 min der Reaktion war für alle Extrakte eine annähernd lineare Abnahme der HS-Konzentration zu beobachten, sodass diese Abnahme der Stoffmenge Δn für die Berechnung der Enzymaktivität E = $\Delta n/10$ min zugrunde gelegt und in Relation zum Gesamtproteingehalt der entsalzten Extrakte gesetzt wurde (Einheit: mU mg⁻¹).

2.2.4 Immunblot und GUS-Färbung zur UOX-Expressionsanalyse

2.2.4.1 anti-UOX Immunblot

Pflanzengewebe (Blätter, Wurzeln, Samenschoten, Samenanlagen, Samen und Keimlinge) verschiedener Entwicklungsstadien des Wildtyps wurden abgewogen, in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C bis zum gemeinsamen Probenaufschluss aufbewahrt. Die Proteinextraktion erfolgte mit wenig Sand und mittels rotierendem Pistill (Fa. Heidolph) in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen. Da die Probengewebe recht unterschiedliche Proteingehalte haben, wurden für den Aufschluss zwischen 10 und 50 Volumenteile Extraktionspuffer eingesetzt (z.B. für 10 mg Samen 500 μ l Puffer, für 100 mg Blätter 1000 μ l Puffer). Nach dem Zentrifugieren (15 min, 4°C bei 20000g) wurden die Überstände abgenommen und ihr Proteingehalt mit Bio-Rad-Färbereagenz bestimmt. Dann wurde für 1 h mit eiskaltem Aceton (Volumen 1:1) von jeder Probe ein Volumen gefällt, das 25 μ g enthielt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Pellets in 25 μ l eines 2,5-fach-konzentrierten SDS-Ladepuffers gelöst und 10 μ g Protein pro Bahn auf 10%-ige PA-Gele geladen. Elektrotransfer der Proteine und Entwicklung der Membran wurden durchgeführt wie zuvor beschrieben.

CUC Exchaliance	100 m M Notrium Dhoonhotmuffon (nH 7)	
GUS-Farbelosung	100 mM Natrium-Phosphatpuller (pH 7)	
	0,2% (v/v) Triton X-100	
	$1 \text{ mM K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	
	$1 \text{ mM } \text{K}_4 \text{Fe}(\text{CN})_6$	
	2 mM X-Gluc	

Mit diesem Verfahren lässt sich das zeitliche und räumliche Aktivitätsmuster eines Promotors untersuchen. Die cDNA für das Enzym β -Glucuronidase (GUS) wird dazu unmittelbar hinter die Sequenz dieses Promotors kloniert und nach Transformation in der Pflanze wird GUS immer dann gebildet, wenn der interessierende Promotor aktiviert ist. GUS setzt das farblose Substrat X-Gluc zu einem blauen Farbstoff um, der in der Zelle präzipitiert und nach gründlicher Entfernung der Pflanzenpigmente aus den untersuchten Geweben sichtbar gemacht werden kann. Für die GUS-Färbung der Embryonalstadien wurden Schoten entsprechenden Alters mit einem Skalpell längs angeschnitten, sodass ausreichend viele Samenanlagen geöffnet wurden, ohne den Embryo zu beschädigen. Aus Samen wurden die Embryonen

herauspräpariert. Alle Präparate, Keimlinge oder Pflanzenteile verschiedener Entwicklungsstadien der *pUOX-GUS*-Linie wurden in GUS-Färbelösung gebracht und 2 bis 3 mal ein Vakuum angelegt, um das Eindringen der Färbelösung in das Gewebe zu ermöglichen. Die Präparate wurden über Nacht bei 37°C in der Färbelösung belassen. Abschließend wurde mit 70% Ethanol entfärbt, bis das blaue Präzipitat kontrastreich zu erkennen war.

2.2.5 Bestimmung der Harnsäure- und Xanthin-Gehalte in Pflanzenmaterial

Das untersuchte Samenmaterial stammte von gleichgezogenen Mutterpflanzen der verschiedenen Genotypen. Samen von *uox* wurden außerdem auf ½ MS-Festmedium mit 2% Saccharose ausgestreut, um den HS-Gehalt während der Keimung zu bestimmen. Nach der Etablierung wurde *uox* auf Mischerde umgesetzt, um das Material der anderen untersuchten Pflanzengewebe (Blätter, Wurzel, Samenanlagen) zu erhalten.

2.2.5.1 Extraktion

Pflanzenteile verschiedener Entwicklungsstadien von Wildtyp und *uox* wurden abgewogen, in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C bis zum gemeinsamen Probenaufschluss aufbewahrt. Für die Bestimmung von HS und Xanthin in Samen wurden Proben von Wildtyp, *uox, xdh, xdh uox* und *p35S:UOX* verwendet. Der Aufschluss aller Proben erfolgte mit wenig Sand und 5–25 Volumenteilen (z.B. 10 mg Samen in 250 µl, 100 mg Blätter in 500 µl) eines Puffers (100 mM TRIS, pH 7,5) mit einem rotierenden Pistill in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen. Die Proben wurden anschließend gemeinsam erhitzt (10 min bei 95°C), zentrifugiert (15 min bei 20000*g* RT) und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Pellets wurden erneut mit dem gleichen Volumen Puffer extrahiert, erhitzt, zentrifugiert und die Überstände zusammengeführt. Abschließend wurden diese Überstände ultrazentrifugiert (3 min bei 40000*g*), um Gewebetrümmer zu pelletieren und die Überstände abschließend in neue Reaktionsgefäße überführt.

2.2.5.2 Nachweisreaktion mittels Amplex® Ultra Red

Der Nachweis von HS im Reaktionsansatz beruht auf den Reaktionen:

1) $HS + O_2 \rightarrow Hydroxyisourat + H_2O_2$	(Urat-Oxidase-Reaktion)
2) Amplex [®] Ultra Red + $H_2O_2 \rightarrow \text{Resorufin} + O_2$	(Meerretich-Peroxidase-Reaktion).
Entsprechend für den Nachweis von Xanthin:	
1) Xanthin + H ₂ O + O ₂ \rightarrow HS + H ₂ O ₂	(Xanthin-Oxidase-Reaktion)

2) Amplex® Ultra Red + $H_2O_2 \rightarrow$ Resorufin + O_2 (Meerretich-Peroxidase-Reaktion).

Es handelt sich hierbei um einen gekoppelten, indirekten Nachweis von H_2O_2 , welches stöchiometrisch das farblose Substrat Amplex® Ultra Red zu dem rosaroten Farbstoff Resorufin umsetzt. Dieser absorbiert maximal bei 560 nm und kann photometrisch bestimmt werden. Seine Konzentration ist nach dem Lambert-Beer-Gesetz linear mit der Absorption verknüpft.

Folgendes war zu beachten:

- H₂O₂ entsteht *in vivo* bei der Oxidation von Substraten mit O₂ und wird in Blättern nach Verletzung und Stress produziert. Die hergestellten Pflanzenextrakte konnten also bereits H₂O₂ enthalten, das nicht aus den oben aufgeführten Reaktionen stammt. Daher musste jede Einzelmessung eines Extraktes sowohl mit als auch ohne Urat-Oxidase bzw. Xanthin-Oxidase durchgeführt und die letzteren Werte von den ersteren subtrahiert werden.
- 2) Der hier für Pflanzenextrakte adaptierte H₂O₂-Nachweis mittels Amplex® Ultra Red wurde für die Messung von menschlichem Serum entwickelt. Pflanzenextrakte enthalten jedoch Pigmente, die in unterschiedlichem Ausmaß bei 560 nm absorbieren. Daher musste für jedes vermessene Pflanzengewebe mit hohem Pigmentgehalt (Samen, Blätter) die Standardreihe für HS oder Xanthin in einem Hintergrund von Wildtyp-Extrakten des gleichen Gewebes angelegt werden. Dies war möglich, weil Gewebe des Wildtyps zu keiner Zeit nennenswerte Mengen von HS oder Xanthin enthalten. Extrakte von stark pigmentierten Proben, die überdies einen hohen Metabolitengehalt haben (vor allem Samen), wurden verdünnt und dieser Verdünnungsfaktor in der Rechnung berücksichtigt.

Aus Stammlösungen von Amplex[®] Ultra Red, Meerrettich-Peroxidase und Urat-Oxidase bzw. Xanthin-Oxidase wurde jeweils eine Arbeitslösung mit und eine Kontrolllösung ohne Urat-Oxidase bzw. Xanthin-Oxidase hergestellt. Ein Standardansatz (100 μ l, bestehend aus 50 μ l Pflanzenextrakt und 50 μ l Arbeitslösung) enthielt 50 μ M Amplex[®] Ultra Red, 20 mU Meerretich-Peroxidase und 20 mU Urat-Oxidase bzw. 2 mU Xanthin-Oxidase.

2.2.5.3 Berechnung der Metaboliten-Konzentrationen

Alle Proben mit Arbeitslösung oder Kontrolllösung wurden in Duplikaten gemessen und Mittelwerte (M_A und M_K) gebildet. Aus Standardreihen für HS oder Xanthin wurde durch lineare Regression jeweils eine Eichgerade und deren Steigung S errechnet. Damit ergab sich

die Konzentration des Metaboliten in jedem gemessenen Ansatz nach $C_A = (M_A-M_K)/S$ (Extrakte und Standards wurden gleichermaßen 1:1 verdünnt). Mit dem Extraktionsvolumen V_E errechnete sich die Stoffmenge N_E im Extrakt zu $N_E = C_A \times V_E$. Diese stammt aus P mg Pflanzenmaterial, und damit war die Metaboliten-Konzentration der Pflanzenprobe $C_P = N_E/P$ (Einheit: μ mol g⁻¹).

Um die Metaboliten-Konzentrationen in den Gewebeproben in Relation zu ihren Trockengewichten setzen zu können, wurde ihr Wassergehalt ermittelt. Dazu wurden entsprechende Gewebeproben gewogen, dann für 2 Tage im Wärmeschrank bei 60°C inkubiert und anschließend wieder gewogen.

2.2.6 GC-MS Metabolitenanalyse der Samen von Wildtyp, uox und xdh uox

Von Samen wurden Methanol/Chloroform-Extrakte angefertigt und an diesen eine Metabolitenanalyse durch Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC-MS) durchgeführt. Für jede Einzelprobe wurden 20 mg Samen mit einer Keramikkugel in ein 2 ml-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in einer Retschmühle homogenisiert (1 min bei 30 s⁻¹). Extraktion und Derivatisierung wurden durchgeführt wie in Lisec *et al.* (2006) beschrieben. Die Analyse der Proben erfolgte mit dem DSQTM-II-System von Thermo Fisher Scientific. Dabei wurden nach der GC die Proben durch Elektronenstoß ionisiert und über ihre Retentionszeit auf der Säule und ihre Flugzeit im elektrischen Feld identifiziert. Die Analyse der Proben und die Auswertung der Chromatogramme wurde von Dr. Britta Ehlert (FU Berlin) nach der in Lisec *et al.* (2006) und Luedemann *et al.* (2008) beschriebenen Methode durchgeführt.

2.2.7 Lipidanalyse der Samen von Wildtyp, *uox* und *xdh uox*

Von jeder Einzelprobe wurden 10 mg Samen mit einer Keramikkugel in einem 2 ml-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach in einer Retschmühle homogenisiert (1 min bei 30 s⁻¹). Die Extraktion der Lipide und die Vermessung der Proben wurde von Dr. Patrick Giavalisco am MPI Potsdam-Golm durchgeführt, wie in Giavalisco *et al.* (2011) und Hummel *et al.* (2011) beschrieben.

Die Samen für die gaschromatographische und die Lipidanalyse stammten von Wildtyp-, *uox-* und *xdh uox-*Pflanzen, die in Klimakammern im LT gleich angezogen wurden.

2.2.8 Differenzielle Interferenzkontrast-Mikroskopie

Hoyer´s Lösung		15 g Gum Arabicum in 25 ml ddH ₂ O lösen,
	dann	100 g Chloralhydrat und 10 g Glycerin zugeben

Blüten von Wildtyp und *uox* wurden zur Zeit der Öffnung (Anthesis) mit Bindfaden markiert. Zu den Zeitpunkten 3, 5, 7 und 11 Tage nach Blütenöffnung (dpa) wurden die markierten Schoten geerntet und unter einer Stereolupe mit einer feinen Pinzette der Länge nach aufpräpariert. Replum und Septum mit den angehefteten Samenanlagen wurden entnommen und in Hoyer's Lösung auf einem Objektträger platziert, mit einem Deckglas bedeckt und nach 2 Tagen Trocknung mit Nagellack versiegelt. Die Bilder wurden an einem Zeiss Axiophot, ausgestattet mit Nomarski-Optik, aufgenommen.

2.2.9 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM wurde in der AG Hausmann (FU Berlin) durchgeführt, wo ein etabliertes Protokoll zur Verfügung stand.

2.2.9.1 Probenvorbereitung

Tag 1: Samen von gleichgezogenen Mutterpflanzen von Wildtyp, *uox* und *xdh uox* wurden für 1 h auf feuchtes Whatman-Papier zum Quellen gelegt, um das Entfernen der Samenschale zu ermöglichen. Mit einem Skalpell wurden dann die Kotyledonen separiert.

2.2.9.2 Fixierung

Die Fixierung erfolgte in Schnappdeckelgläsern unter leichtem Schwenken zunächst in Lösung I (2,5% Glutaraldehyd in 100 mM Cacodylatpuffer) über Nacht bei RT. An Tag 2 wurden die Proben 3 mal in Cacodylatpuffer gewaschen, anschließend wurde die Fixierung für weitere 4 h bei RT in Lösung II (1% OsO₄ in 100 mM Cacodylatpuffer) fortgesetzt, danach verblieben die Proben bei 4°C über Nacht in derselben Lösung.

2.2.9.3 Entwässerung

Tag 3: Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in Cacodylatpuffer wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert: Je 30 min in 30%-, 50%-, 70%-, 90%-, 2 mal in 100% Ethanol, abschließend 2 mal in 100% getrocknetem Ethanol.

2.2.9.4 Einbettung

Die Proben wurden auf einem Schüttler in 3 Schritten in Spurr's Kunstharz eingebettet:

- 1) 3 h in einem Mix 1:1 von 100% Ethanol : Spurr's
- 2) 3 h in einem Mix 1:2 von 100% Ethanol : Spurr's
- 3) Über Nacht in reinem Spurr's. An Tag 4 erfolgte 2 mal der Wechsel des Spurr-Kunstharzes und an Tag 5 das Einfüllen des Harzes mit den Kotyledonen in Beem®-Kapseln und die Überführung in einen Trockenschrank für 2 Tage bei 70°C zum Aushärten des Harzes.

2.2.9.5 Herstellung von Ultradünnschnitten

Die Harzblöckchen mit den eingebetteten Proben wurden mit einer Rasierklinge zurechtgetrimmt und anschließend mit dem Glasmesser Semidünnschnitte begonnen, um den interessierenden Probenbereich zu lokalisieren und den Schnittbereich für das Diamantmesser zu glätten. Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser angefertigt und auf Formvar®-beschichtete Kupferträgernetze (*grids*) überführt.

2.2.9.6 Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte

Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat behandelt, um den Kontrast für die Elektronenmikroskopie zu verbessern. Dazu wurden die Trägernetze mit der Schnittseite nacheinander auf Uranylacetat- (30 min) und nach einem Waschschritt in ddH₂O auf Bleicitrat-Tropfen (10 min) gelegt. Nach erneutem Waschen in ddH₂O und Trocknen erfolgte die Auswertung am TEM.

2.2.10 SDS-PAGE der Speicherproteine in Wildtyp, uox- und xdh uox-Samen

2.2.10.1 Probenvorbereitung

SDS-Aufschlusspuffer	50 mM TRIS HCl (pH 6,8) 2% (w/v) SDS 100 mM DTT
Kolloidale Coomassie-Färbelösung	0,08% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 0,8% (v/v) Phosphorsäure 8% (w/v) Ammoniumsulfat 20% (v/v) Methanol

Jeweils 10 mg Samen von verschiedenen, gleichgezogenen Pflanzen wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße eingewogen, eine Keramikkugel zugegeben und die verschlossenen Proben in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Proben wurden für 1 min bei 30 s⁻¹ in einer Retschmühle homogenisiert, danach die zermahlenen Samenproben in 200 μ l 95°C heißem SDS-Aufschlusspuffer resuspendiert (10 min bei 800 s⁻¹ und 95°C im Thermoblock), dann zentrifugiert (10000g, 1 min bei RT). Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Extraktion der Pellets 2 mal bei RT wiederholt. Die zusammengeführten Überstände wurden ultrazentrifugiert (3 min bei 40000g), um Gewebetrümmer abzusondern.

2.2.10.2 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Es wurden 400 μ l des Überstandes mit 100 μ l eines 5-fach konzentrierten SDS-PAGE Ladepuffer gemischt und je Probe 2 μ l pro Bahn auf 15%-ige PA-Gele geladen (hergestellt aus Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid 29:1). Nach dem Lauf wurden die Gele für 1 h in einer Lösung fixiert, die 40% Ethanol und 10% Essigsäure enthielt und danach über Nacht in Kolloidale Coomassie-Färbelösung gelegt und anschließend durch Waschen in H₂O entfärbt.

2.2.11 Katalase-Nachweis in Embryonen aus Samen mit DAB-Färbung

2.2.11.1 Katalase-Nachweis

Eine zytochemische Lokalisierung von Katalase an Semidünnschnitten von Samenproben mittels Diaminobenzidin (DAB)-Färbung wurde im Labor von Prof. Wanner (LMU München) durchgeführt, die Methode ist in Wanner *et al.* (1982) beschrieben. DAB wird durch Katalase oxidiert und bildet einen unlöslichen, braunen Niederschlag, der fotografisch im Lichtmikroskop dokumentiert werden kann. Weil DAB auch durch andere Peroxidasen oxidiert wird, müssen die Versuchsbedingungen durch die Einstellung des pH-Wertes und den Zusatz von Inhibitoren so gewählt werden, dass ein spezifischer Katalase- und damit Peroxisomen-Nachweis zustande kommt.

2.2.11.2 Quantitative Auswertung der Katalase-Lokalisierung

Fotografien der Semidünnschnitte wurden mit der Software ImageJ ausgewertet. In mindestens je 5 Schnitten durch Kotyledonen von verschiedenen Präparaten von Wildtyp, *uox* und *xdh uox* wurde jeweils ein zusammenhängendes, repräsentatives Areal markiert und in diesem die DAB-Signale ausgezählt.

2.2.12 Lipidfärbung mit Nilrot

Die Färbetechnik ist in Greenspan *et al.* (1985) beschrieben. Die untersuchten Keimlinge hatten ein Alter von 12 dai (*days after imbibition*). Bei *uox* wurde die Samenschale wegpräpariert. Die Keimlinge wurden mit einer Nilrot-Lösung ($0,1 \ \mu g \ ml^{-1}$) in 2 ml-Reaktionsgefäße

im Dunkeln bei RT für 5 min inkubiert, danach wurden die Präparate 3 mal für 5 min mit 100 mM TRIS, pH 7,5, gewaschen, um den Hintergrund zu reduzieren. Die fotografische Dokumentation erfolgte an einem Epifluoreszenz-Mikroskop Zeiss Axioplan mit Filter-Set 38HE (Anregungsfilter BP 470/40, Strahlenteiler FT 495, Emissionsfilter BP 525/50).

2.2.13 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM)

2.2.13.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung der Funktionalität von Peroxisomen standen verschiedene transgene Linien von Wildtyp und *uox* zur Verfügung, die unter dem 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaikvirus konstitutiv ein *GRX1-roGFP2*-SKL Konstrukt exprimieren. Col-0-Wildtyp-Samen einer stabil mit dem Konstrukt transformierten Linie wurden von Prof. A. Meyer (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Durch Kreuzung mit *uox* wurden mehrere Linien erzeugt, mit dem Ziel, eine eventuell durch HS verursachte Störung des Redoxpotentials der Peroxisomenmatrix in *uox* detektieren zu können. Aufgrund des dann gefundenen drastischen Peroxisomendefekts in *uox* wurde jedoch das Redoxpotential im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Zur Auswertung am CLSM wurden Wildtyp- und *uox*-Linien mit vergleichbarer GFP2-Expression ausgewählt.

2.2.13.2 Probenvorbereitung

Die Samen wurden zunächst auf feuchtes Whatman-Papier gestreut, um nach 1 h Quellungszeit das Entfernen der Samenschale zu ermöglichen. Aus Samenanlagen und Samen (Alter 15-47 dpa) von Wildtyp und *uox* wurden dann unmittelbar vor dem Mikroskopieren die Embryonen herauspräpariert und auf Objektträgern in 100 mM TRIS, pH 7,5 untersucht.

2.2.13.3 Einstellungen zum Registrieren (Scanning) der Embryopräparate am CLSM

- Anregungswellenlänge (*Excitation*): 488 nm, registriertes Emissionsspektrum (*Emission bandwidth*): 500 bis 600 nm.
- Die Blendenöffnung (*Pinhole*) wurde stets bei der Standard-Einstellung belassen, die 1 Airy entspricht.
- Helligkeit (*Gain*) und Kontrast (*Offset*) wurden für jedes Präparat so gewählt, dass für das registrierte Signal der volle Graustufenbereich ausgenutzt werden konnte.

• Die Aufzeichnung des Bildmaterials (außer Details) erfolgte jeweils als Bildstapel (*Z-Stacks*) mit 8 Einzelbildern von jedem Embryopräparat, wobei der Bereich so gewählt wurde, dass die ganze Dicke des Kotyledons oder Hypokotyls erfasst werden konnte.

2.2.13.4 Aufbereitung und quantitative Auswertung des Bildmaterials

Aus der LAS-AF-Software wurden die 8 Einzelbilder des GFP-Kanals von jedem Kotyledonen- und Hypokotylpräparat im TIF-Format nach ImageJ exportiert, dort wieder zu einem Bildstapel verbunden (*Image* \rightarrow *Stacks* \rightarrow *Images to Stack*) und danach durch digitale Überlagerung in einem Z-Project vereint (*Image* \rightarrow *Stacks* \rightarrow *Z-Project* \rightarrow *Projection type: Max Intensity*). Daraus resultierte das Bildmaterial, wie es in Abb. 3.16.c-e und Abb. 3.17 zu sehen ist.

Zur quantitativen Auswertung wurde in jedem Z-Project ein großer und repräsentativer Bereich als Area markiert und durch die Bearbeitung mittels $Image \rightarrow Adjust \rightarrow Auto$ Threshold $\rightarrow Minimum$ das Hintergrundsignal reduziert, um die Zahl der Signalpunkte (GFP in Peroxisomen) aller Z-Projects untereinander vergleichbar zu machen. Bei der Funktion Analyze $\rightarrow Analyze$ Particles wurden folgende Einstellungen gewählt: Size 0,5-Infinity, Circularity 0-1, Show Outlines. Dies lieferte die Zahl der Signalpunkte. Die Funktion Analyze $\rightarrow Measure$ lieferte die Fläche des markierten Areals, woraus die Anzahl der Signalpunkte pro Fläche berechnet wurde (Abb. 3.16.f).

2.2.14 Test auf funktionale β-Oxidation in *uox*-Keimlingen mittels 2,4-DB.

Das künstliche Substrat 2,4-DB wird in der peroxisomalen β -Oxidation in das Herbizid 2,4-D umgewandelt. Der 2,4-DB-Test wurde hier verwendet, um die Funktionalität der β -Oxidation in Keimlingen zu untersuchen.

2.2.14.1 Verwendete Anzuchtmedien

- ¹/₂ MS-Festmedium mit 2% Saccharose
- ½ MS-Festmedium mit 2% Saccharose und 0,2 μM 2,4-D
- ¹/₂ MS-Festmedium mit 2% Saccharose und 4 μM 2,4-DB

2.2.14.2 Durchführung

Oberflächendesinfizierte Samen von Wildtyp, *uox* und *pxa1-1* wurden nach dem Auslegen auf Festmedium für 2 Tage bei 4°C stratifiziert und nach weiteren 3 Tagen unter sterilen Bedingungen mit einer Akkupunkturnadel angestochen (*pricking*), da die Keimungsrate von

pxa1-1 ohne diesen Eingriff niedrig ist. Die *uox*-Keimungsrate wird dadurch nicht gesteigert. Die weitere Anzucht erfolgte unter Langtagbedingungen in einem Binder-Klimaschrank auf Festmedium mit Saccharose und den entsprechenden Zusätzen. Die Dokumentation erfolgte 19 Tage nach dem Auslegen.

2.2.15 Test auf funktionale β -Oxidation in adulten *uox*-Pflanzen mittels Dunkelstress.

Mittels Dunkelstress wurde die Funktionsfähigkeit der β -Oxidation in adulten *uox*-Pflanzen getestet. Grundlage dieser Methode ist der Befund, dass in Blättern während längerer Dunkelheit *PXA1* und Gene für Enzyme der β -Oxidation vermehrt transkribiert werden (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; van der Graaff *et al.*, 2006). Dies deutet darauf hin, dass adulte Pflanzen nach dem Aufbrauchen ihrer transitorischen Stärke FS zur Energiegewinnung heranziehen können. Kunz *et al.* (2009) fanden, dass *pxa1* und *kat2* in Dunkelheit nach 48 h absterben und haben zur Erklärung folgendes Modell vorgeschlagen: FS werden in Dunkelheit aus den Membranen der Chloroplasten mobilisiert. In Wildtyp-Blattzellen können diese in den Peroxisomen oxidiert und die entstehenden Acetyl-CoA-Einheiten über die Synthese von Citrat den Mitochondrien zugeführt werden, wo ATP erzeugt wird. In *pxa1-1* und *kat2-1* akkumulieren jedoch die FS im Zytosol (*pxa1-1*), bzw. in den Peroxisomen (*kat2-1*) aufgrund des jeweiligen Enzymdefekts bis zu einer toxischen Konzentration (Kunz *et al.*, 2009).

Durchführung: Etwa 4-Wochen-alte, parallel im LT gezogene Pflanzen von *uox, pxa1-1* und Wildtyp wurden mit einer Untersatzschale so abgedeckt, dass noch der Gasaustausch möglich war und dann in einen dunklen Schrank abgestellt. An den darauf folgenden Tagen wurden jeweils 2 bis 3 Pflanzen jedes Genotyps zurück in den LT überführt und 24 h später der Zustand der Pflanzen fotographisch dokumentiert.

2.2.16 Statistische Verfahren

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit Graph Pad Prism 4. Für die Analyse der Unterschiede der Metabolitgehalte (Primärmetaboliten, Lipide) und der Speicherproteine wurde für alle Datensätze eine Normalverteilung angenommen und eine einfaktorielle Varianzanalyse (*One-Way-ANOVA*) mit Dunnett's Posttest durchgeführt. Für die Analyse der Unterschiede in der Anzahl der GFP- und der DAB-Punkte wurde in *uox* keine Normalverteilung angenommen und jeweils ein Kruskal-Wallis-Rangsummentest mit Dunn's Posttest durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der T-DNA in *uox*, *xdh* und *xdh uox*

Zur Verifizierung der verwendeten Pflanzenlinien wurden diese mit PCR genotypisiert. Die Größe der erwarteten PCR-Produkte war 1066 bp (mit den Primern 1233 und 1886 zum Nachweis des Wildtyp-Allels von *UOX*), 1039 bp (Primer 1968 und 1969, Wildtyp-Allel von *XDH*), 755 bp (Primer N61 und 1886, Nachweis der SALK-T-DNA in *UOX*) und 780 bp (Primer 448 und 1969, Nachweis der GABI-Kat-T-DNA in *XDH*).

Produkte dieser Größe wurden in den entsprechenden Linien (und nur dort) im Gel gefunden (Abb. 3.1). Die Homozygotie und Identität der verwendeten Linien *uox, xdh, xdh uox,* die auch als Ausgangsmaterial für die Herstellung der transgenen Linien *pURI-GUS, p35S:UOX* und *p35S:GRX1-roGFP2-SKL* dienten, wurde damit bestätigt: *uox* trägt kein Wildtyp-Allel für *UOX, xdh* kein Wildtyp-Allel für *XDH, xdh uox* keines von beiden.



3.2 UOX- und XDH-Nachweis und -Enzymaktivität in Blattextrakten

Auch auf dem Proteinniveau wurde an Blattextrakten die Identität der transgenen Linien bestätigt. Immunblots, die mit Antiseren gegen UOX und die FAD-bindende Domäne von XDH inkubiert wurden, zeigen, dass UOX und XDH in den jeweiligen Mutanten nicht nachweisbar sind. Die Messung der UOX-Aktivität und der In-Gel-XDH-Aktivitätstest zeigen, dass in den Mutanten auch die jeweilige Enzymaktivität fehlt (Abb. 3.2). In der Komplementationslinie *p35S:UOX* ist im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich höhere UOX-Aktivität vorhanden, was allerdings keinen auffälligen Phänotyp in dieser Linie erzeugt.

Im Genom von *Arabidopsis* liegt in unmittelbarer Nachbarschaft von *XDH1* (Locus At4g34890) ein als *XDH2* (At4g34900) bezeichnetes Gen. *XDH2* wird schwach, aber konstitutiv in Blättern, Wurzeln und Schoten exprimiert, die Aminosäuresequenz der beiden Proteine ist zu 93% identisch (Hesberg *et al.*, 2004). Die fehlende XDH-Aktivität in *xdh* und

xdh uox zeigt, dass XDH2 unter den Versuchsbedingungen kein Hypoxanthin umgesetzt hat und lässt vermuten, dass es sich bei *XDH2* um ein Pseudogen handelt. Dies bestätigt frühere Ergebnisse aus der Untersuchung einer anderen *xdh1*-Linie, SALK 148364 (Yesbergenova *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wird in der hier vorliegenden Arbeit auf die Unterscheidung von XDH1 und XDH2 verzichtet und nur die Bezeichnung XDH verwendet.



3.3 Der Keimungs- und Etablierungs-Phänotyp der uox-Mutante.

Die Samen von *uox* haben eine verminderte Keimungsrate. Erfolgt die Keimung, ist sie zeitlich verzögert und im Folgenden unterbleibt die Mobilisierung der Speicherlipide und das Ergrünen der Kotyledonen. Es wird keine Primärwurzel ausgebildet, stattdessen ergrünt das Hypokotyl (Abb. 3.3.b). Auf Erde oder MS-Festmedium ohne Zuckerzusatz bleibt die Entwicklung von *uox* in diesem Stadium stehen, wobei die Keimlinge aber nicht sogleich absterben, sondern selbst nach einigen Wochen noch durch Zugabe von Zucker zum Medium gerettet werden können. Mit Zuckerzusatz setzt *uox* seine verzögerte Entwicklung fort, wobei die Keimblätter von der Basis her nachgrünen können und etwa zeitgleich die ersten Folgeblätter erkennbar sind (Abb. 3.4, 11 dai). Nun kann das Umsetzen auf Erde erfolgen. Etwa 3 Wochen nach dem Auslegen hat *uox* den Entwicklungsrückstand zum Wildtyp wettgemacht und ist danach phänotypisch nicht mehr von ihm zu unterscheiden. Adulte *uox*-Pflanzen sind normal fertil, weder der Blütenstand, noch Anzahl und Aussehen der Samenanlagen unterscheiden sich auffällig vom Wildtyp.



Abbildung 3.3: Wachstum von Wildtyp und *uox* mit und ohne Zuckerzusatz.

(a) Wildtyp, (b) uox. Zeitpunkt 15 Tage nach Aussaat (15 dai). Oben: jeweils links Hälfte mit 2% Saccharose, rechte Hälfte ohne Zusatz. Unten: Detailaufnahme einzelner Exemplare, die oben durch die Box markiert sind. Einzelne Exemplare von uox sind auf Festmedium mit Zuckerzusatz ähnlich gut wie der Wildtyp entwickelt. Der Phänotyp bleibt jedoch stets anhand der unvollständig entwickelten Kotyledonen erkennbar (Ausschnitt unten). Mit Zuckerzusatz entwickelt sich auch der Wildtyp deutlich schneller. Maßstab = 1 mm.



Abbildung 3.4: Entwicklungsdynamik von *uox* im Vergleich zum Wildtyp.

Die Entwicklung der Keimlinge ist über einen Zeitraum von 17 Tagen nach der Aussaat (dai) dargestellt. Die *uox*-Mutante zeigt auf Festmedium mit Zuckerzusatz eine auffällige Dynamik der Keimlingsentwicklung. Während sie bis zu einem Zeitpunkt von etwa 10 dai stark hinter dem Wildtyp zurück bleibt, holt sie in der Folge diesen Rückstand auf und ist etwa 1 Woche nach dem Umsetzen auf Erde äußerlich nicht mehr vom Wildtyp zu unterscheiden.

3.3.1 Vergleichende Phänotypenanalyse von *uox*, *xdh*, *xdh uox* und *p35S:UOX*

In Abbildung 3.5 sind *uox*-Keimlinge zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Auslegen auf MS-Festmedium im Vergleich mit dem Wildtyp, *xdh*, *xdh uox* und *p35S:UOX* gezeigt. Aus der Analyse der Phänotypen dieser Linien lassen sich folgende Aussagen treffen:

1) Die stabile Transformation von *uox* mit einem Konstrukt, welches die cDNA für *UOX* unter dem 35S-Promotor exprimiert, führt zur Komplementation des *uox*-Phänotyps. Daraus folgt, dass der Ausfall von *UOX* allein hinreichend ist, um den Phänotyp zu verursachen.

2) Die *xdh*-Mutante ist vollkommen unauffällig. Auch andere homozygote Mutanten für eines der Enzyme des Purinringabbaus zeigen keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp, woraus folgt, dass der *uox*-Phänotyp nicht durch den Ausfall des Purinringkatabolismus *per se* verursacht wird.

3) Die *xdh uox*-Doppelmutante ist ebenfalls unauffällig, woraus folgt, dass der *uox*-Phänotyp auch nicht durch den Verlust einer strukturellen Funktion von UOX für die Peroxisomen verursacht wird. Eine solche wurde für UOX in Leguminosen angenommen, weil nach Expression einer antisense *UOX*-cDNA in den Wurzelknöllchen von *Vigna aconitifolia* verkleinerte Peroxisomen beobachtet wurden (Lee *et al.*, 1993).

Hieraus ergab sich die Hypothese, dass für die Entstehung des *uox*-Phänotyps allein die Akkumulation des Substrates der UOX, nämlich HS verantwortlich ist.



Abbildung 3.5: Keimung und Etablierung von *uox* im Vergleich uox keimt verzögert und ist für die Etablierung auf Zuckerzusatz im Medium angewiesen. Zum Zeitpunkt 15 dai hat *uox* mit Zucker schon annähernd das Aussehen des Wildtyp erreicht. Wachstum im LT. Zuckerzusatz nur wo angezeigt (+Sacch.). $Ma\beta stab = 1 mm.$

3.3.2 Gestörter Abbau der Speicherlipide in der uox-Mutante

Arabidopsis-Mutanten, deren Keimlinge Defekte in der Verwertung der Speicherlipide haben, wie *pxa1* (Hayashi *et al.*, 1998; Zolman *et al.*, 2001), *acx1 acx2* (Pinfield-Wells *et al.*, 2005) und *kat2* (Germain *et al.*, 2001) ähneln *uox* insofern, dass ihre Keimungsrate gering ist und sie auf Zuckerzusatz im Medium für die Etablierung angewiesen sind. Abbildung 3.6 dokumentiert das Ausbleiben des Lipidabbaus in der *uox*-Mutante durch die Färbung mit dem lipophilen Farbstoff Nilrot. Deutlich erkennbar sind jeweils die vollen Lipidspeicher in den *uox*-Kotyledonen, während der Wildtyp gleichen Alters diese Lipide komplett abgebaut und bereits ergrünte Kotyledonen und ein erstes echtes Blattpaar ausgebildet hat.



Abbildung 3.6: Lipidfärbung von Keimlingen. Von links: *uox* ohne Saccharose, *uox* mit 2% Saccharose, Wildtyp ohne Saccharose. Die FL-Registrierung wurde wegen des besseren Kontrastes von grün zu rot invertiert. Bei *uox* wurde die Samenschale entfernt. Anzucht auf MS-Festmedium. HF, Hellfeld; FL, registrierte Epifluoreszenz bei $\lambda = 525$ nm. Alter der Keimlinge 12 Tage. Maßstab = 500 µm.

3.3.3 Variabilität des *uox*-Phänotyps

Der *uox*-Phänotyp kann zwischen verschiedenen Samen-Chargen leicht variieren, ist jedoch immer klar erkennbar: Die Mehrzahl der ausgelegten Samen keimt nicht, es findet keine Entwicklung der Keimblätter und keine Wurzelbildung statt. In Abbildung 3.7 sind *uox*-Keimlinge im Alter von 10 Tagen aus verschiedenen Samen-Chargen gezeigt, wobei Phänotypen wie in (a) und (b) die Regel sind. Selten entwickelt sich eines der beiden Kotyledonen (c) oder es treten teilweise ergrünte Keimblätter auf, an denen stets Bereiche unentwickelt bleiben (d-i).



Abbildung 3.7: Variabilität des *uox***-Phänotyps.** Samen wurden auf MS-Festmedium ohne Zucker ausgelegt. (a-i) *uox*, rechts Wildtyp und *xdh uox*. Alter 10 dai.

3.3.4 Die frühembryonale Entwicklung von *uox*

Als eine mögliche Ursache für den Keimungsphänotyp von *uox* wurde eine gestörte Embryonalentwicklung vermutet. Daher wurde mittels Differenzieller Interferenzkontrast-Mikroskopie die frühe Embryogenese von *uox* untersucht. Es ergaben sich jedoch keine äußerlich erkennbaren Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp; die Entwicklungsstadien *globus* (3 dpa), *heart* (5 dpa), *torpedo* (7 dpa) und *bent cotyledon* (11 dpa) wurden zeitgleich wie im Wildtyp erreicht (Abb. 3.8).







Abbildung 3.9: UOX-Promotor-Aktivität und Expression von UOX.

(a-e) *UOX*-Promotor-Aktivität während der Embryonalentwicklung. (a) *globus* 3 dpa; (b) *heart* 5 dpa; (c) *torpedo* 7 dpa; (d) *bent cotyledon* 11 dpa; (e) Embryo aus Samen präpariert. (f-h) Keimlinge, (f) 3 dai; (g) 5 dai, (h) 7 dai; (i) Wurzelspitze und (j) Spross-Apikalmeristem von Keimling 9 dai; (k) Blatt aus Rosette, 4 Wochen alt; (l) Blütenstand. Maßstab = 100 μ m. (m) Immunblot, der mit anti-UOX Serum inkubiert wurde. Extrakte aus vergleichbaren Stadien wie (a-k): Samen, Keimlinge, Blätter und Samenanlagen. Pro Bahn wurden 10 μ g Protein geladen.

3.4 Das Expressionsmuster von UOX in Arabidopsis

Gleichzeitig mit der Messung des HS-Gehaltes in *uox* wurde untersucht, zu welchen Zeitpunkten der Entwicklung *Arabidopsis* einen aktiven Purinringkatabolismus aufweist. Zu diesem Zweck wurde eine *UOX*-Promotor-*GUS*-Analyse durchgeführt und mit Immunblots die *UOX*-Expression in verschiedenen Lebensphasen und Geweben von *Arabidopsis* untersucht.

3.4.1 *UOX-*Promotor-*GUS-*Analyse

Zu Beginn dieser Arbeit standen mehrere *pUOX-GUS*-Linien zur Verfügung, die sich im zeitlichen und räumlichen Aktivitätsmuster des *UOX*-Promotors weitgehend glichen.

Abbildung 3.9 zeigt Präparate von *pUOX-GUS-Linien*, die durch das Anschneiden von Samenanlagen mit einem Skalpell hergestellt und anschließend in GUS-Färbelösung inkubiert wurden. In *globus* und *heart-Stadien* (a,b) wurde nie *UOX-Expression* gefunden; diese war erstmals im *torpedo-Stadium* (c) im Hypokotyl nachweisbar, danach im *bent cotyledon-Stadium* (d) und im reifen Embryo des Samen (e) auch in den Kotyledonen. In 3-Tage-alten Keimlingen ist die Aktivität auf die Kotyledonen und die Wurzelspitze begrenzt (f), in älteren Keimlingen dagegen ausgeprägt in Spross- und Wurzelmeristemen und im Gefäßsystem (g-j). In Blättern einer 4-Wochen-alten Rosette (k) sowie in Blüten in den Staubblättern und der Abszissionszone der Schoten (l) wird *UOX* ebenfalls stark exprimiert.

3.4.2 UOX-Expression im Immunblot

Für alle Stadien und Gewebe, in denen die GUS-Färbung *UOX*-Promotoraktivität anzeigt, kann UOX auch mittels Immunblot nachgewiesen werden. Wie Abb. 3.9.m zeigt, ist UOX in Blättern, der Wurzel und besonders in sich entwickelnden und reifen Samen vorhanden.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem *UOX*-Expressionsmuster, welches der *Arabidopsis*-eFP-Browser über die gesamte Pflanzenentwicklung (*Developmental Map*) angibt (Nakabayashi *et al.*, 2005; Schmid *et al.*, 2005; Winter *et al.*, 2007).

3.5 Die Akkumulation von Harnsäure in *uox*

Der Purinringkatabolismus beginnt mit Xanthin und verläuft von dort linear zu den Endprodukten Glyoxylat, NH₃ und CO₂ (Abb.1.1). Es war daher zu erwarten, dass Nullmutanten für eines der beteiligten Enzyme das jeweilige Substrat akkumulieren. Dies wurde für die Allantoinase (*aln*)-, die Allantoat-Amidohydrolase (*aah*)- und die Ureidoglykolat-Amidohydrolase (*uah*)-Mutanten bereits früher gezeigt (Werner, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden *xdh* und *uox* untersucht.

3.5.1 Harnsäure- und Xanthin-Akkumulation in Samen

Nachdem *UOX*-Promotor-*GUS*-Analyse und Immunblot gezeigt hatten, dass der Purinringkatabolismus während der Samenentwicklung aktiv ist, wurde erwartet, dass in *uox* HS in den Samen akkumuliert, während dies im Wildtyp und der Komplementationslinie *p35S:UOX* aufgrund des ungestörten Abbauweges bis zum Glyoxylat nicht erwartet wurde. In *xdh*- bzw. *xdh uox* wurde analog eine Akkumulation von Xanthin erwartet. Der für die Messung von HS und Xanthin verwendete Amplex® Ultra Red-Nachweis zeigte:

- Weder in Samen noch in anderen untersuchten Geweben von Wildtyp, *p35S:UOX-Linie*, *xdh* oder *xdh uox* wurde zu irgendeinem Zeitpunkt HS gefunden. Das Fehlen von HS in allen Geweben der *xdh uox-*Doppelmutante ist ein weiterer Beleg dafür, dass XDH2 in *Arabidopsis in vivo* nicht an der Umsetzung von Xanthin zu HS beteiligt ist.
- In der *uox*-Mutante akkumuliert HS während der Samenentwicklung, sodass ihr Gehalt in reifen Samen rund 20 µmol pro Gramm Feuchtgewicht beträgt (Abb. 3.10.a, links).
- 3) In den Samen von xdh und xdh uox akkumuliert Xanthin in vergleichbarer Konzentration (Abb. 3.10.a, rechts). Die Akkumulation von Xanthin in Samen hat allerdings keine erkennbaren schädlichen Auswirkungen, während HS, ein anderes Oxopurin, den beobachteten Phänotyp von uox verursacht.

3.5.2 Harnsäuregehalt im zeitlichen Verlauf in *uox*-Geweben

HS wurde in allen untersuchten Geweben von *uox* gefunden (Abb. 3.10.b). In 4-Wochenalten *uox*-Pflanzen war der HS-Gehalt in Wurzelgewebe höher als in Blättern und in älteren Blättern höher als in jüngeren (links). In Schoten und den darin enthaltenen Samenanlagen stieg der HS-Gehalt von 7 dpa bis 19 dpa stark an (mitte). Zum Zeitpunkt 19 dpa wurden die Samenanlagen von den Schotenwänden separiert. Die getrennte Vermessung zeigte, dass der größere Anteil der HS in den Samenanlagen (mit den reifenden Embryonen) enthalten war.



Abbildung 3.10: Harnsäure- und Xanthin-Gehalte in Samen und Geweben.

(a) HS- und Xanthingehalte in Samen von Wildtyp, *uox*, *xdh*, *xdh uox* und der Komplementationslinie *p35S:UOX*.

(b) HS-Gehalte in verschiedenen Geweben von uox.

Obere Reihe: Bezogen auf das Trockengewicht [TG] (links) in jungen [j], mittelalten [m], alten [a] Blättern und Wurzeln [w] von 4-Wochen-alten Pflanzen (n = 4). (Mitte) In Schoten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Blütenöffnung [dpa]. Zum Zeitpunkt 19 dpa wurden die Samenanlagen [s] aus den Schoten präpariert und getrennt von den Schotenwänden [p] gemessen (n = 6). (Rechts) In Samen [0] und Keimlingen zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Auslegen [dai] auf MS-Festmedium mit 2% Saccharose (n = 3). Untere Reihe: Bezogen auf das Feuchtgewicht [FG] der Proben.

n bezeichnet jeweils die Anzahl der vermessenen biologischen Replikate.

In den Keimungsstadien (rechts) war die HS-Konzentration bezogen auf das Feuchtgewicht in Samen am höchsten, denn diese haben den geringsten Wassergehalt (ca. 5%). Durch die Wasseraufnahme des Samens nahm dann der HS-Gehalt scheinbar ab, bezogen auf die Trockengewichte der Proben blieb er jedoch annähernd konstant. Dies deutet auf eine geringe Aktivität des Purinringkatabolismus in *uox* unmittelbar nach der Keimung hin, was sich mit der zunächst sehr schwachen Entwicklung der Kotyledonen bis etwa 9 dai erklären lässt. Wurzeln, Blätter und junge Schoten haben hohe Wassergehalte, daher waren die gemessenen HS-Gehalte bezogen auf das Feuchtgewicht viel niedriger als bezogen auf das Trockengewicht.

Die hier gefundene HS-Akkumulation in *uox*-Samen steht im Einklang mit den Daten des eFP-Browsers für das Expressionsmuster von *XDH1*. Dort wird angegeben, dass die Expression im Stadium des *bent cotyledon (seed stage* 8, Alter 11 dpa) einsetzt und bis zu den trockenen Samen unvermindert aufrechterhalten wird.

3.6 Das Metabolitenprofil von *uox-* und *xdh uox-*Samen

Um den *uox*-Keimungsphänotyp molekular besser zu charakterisieren, wurden Extrakte aus Samen hergestellt und mittels Gas- und Flüssigkeits-Chromatographie analysiert. Die Hypothese war, dass in *uox*-Samen, neben dem von HS, auch die Gehalte anderer Metaboliten oder Speicherstoffe verändert sind.

3.6.1 Analytik der Primärmetaboliten

Mittels GC-MS konnten rund 40 Metaboliten in den Samenproben von *uox*, Wildtyp und *xdh uox* identifiziert werden (detailliert aufgeführt in Anhang 6.2). Die Signalintensität für jeden der Metaboliten wurde errechnet, indem die Fläche seines Signalpeaks in Bezug auf das jeweilige Probengewicht und den mitgeführten Ribitolstandard normalisiert wurde. Sie wird hier als Maß für den Gehalt der Metaboliten angenommen. Die Unterschiede in den Probengehalten zwischen den drei Genotypen wurden für jeden Metaboliten mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Dunnett's Posttest auf statistische Signifikanz geprüft, wobei der Wildtyp als Kontrollgruppe definiert wurde. Die Tabelle in Abbildung 3.11. listet alle Metaboliten auf, für die die Varianzanalyse einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen ergab sowie die p-Werte des Posttests. Daneben sind alle Messwerte für die einzelnen Metaboliten in Diagrammen zusammengestellt.

Am deutlichsten unterschieden sich die drei untersuchten Gruppen in ihrem Gehalt an Uridin. Erwartungsgemäß wurde HS in den *uox*-Proben signifikant erhöht gefunden. In Wildtyp- und *xdh uox*-Samen waren die HS-Gehalte äußerst niedrig aber nachweisbar. Die *uox*-Samen hatten außerdem einen erhöhten Gehalt an Sorbitol/Galaktitol. Diese beiden Polyole konnten in der Analyse nicht voneinander unterschieden werden. Sorbitol/Galaktitol akkumuliert während der Austrocknungsphase des Samens stark (Fait *et al.*, 2006). In den *uox*-Samen waren außerdem Gluconat, trans-Sinapinsäure und Glucose signifikant erhöht, die *xdh uox*-Samen hatten dagegen signifikant erhöhte Gehalte an Uridin sowie signifikant erniedrigte an Malat, Fumarat und Saccharat.



Abbildung 3.11: Metabolitenanalyse von Samenextrakten.

Übersicht aller Metaboliten, deren Gehalte in der GC-MS-Analyse signifikant unterschiedlich zwischen *uox*, Wildtyp und *xdh uox* gefunden wurden. In den Diagrammen steht jeder Datenpunkt für eine Samenprobe. n(uox) = 5, n(WT) = 4, n(xdh uox) = 5. Der Balken bezeichnet das arithmetische Mittel. * p < 0.05, ** p < 0.01. Die Tabelle zeigt das Ergebnis der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) für alle Metaboliten, deren Gehalte sich in den drei Gruppen signifikant voneinander unterschieden.

3.6.2 Lipidanalytik

Durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie (UPLC-MS) wurden *uox-, xdh uox-* und Wildtyp-Samenproben hinsichtlich ihrer Lipidgehalte untersucht. Die statistische Auswertung der Signalintensitäten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Dunnett's Posttest, der Wildtyp wurde dabei als Kontrollgruppe definiert. Wie bei der Auswertung der GC-MS-Analyse wurden die erhaltenen Signalintensitäten als Maß für die Gehalte der einzelnen Lipide in jeder Probe angenommen.

Die Analyse ergab für die *uox*-Samen einen hochsignifikanten Überschuss an freien FS (Abb. 3.12.a). Die Gesamtgehalte an TAG waren in den drei Gruppen nicht signifikant verschieden, bei genauerer Aufschlüsselung zeigten sich jedoch charakteristische Veränderungen in *uox*-Samen (Anhang 6.3). Glycerophospholipide (GPhL) und Galaktolipide (GalL)

waren signifikant in *xdh uox*-Samen erhöht. Sowohl *uox* als auch *xdh uox* hatten signifikant erhöhte Gehalte an Phaeophytin.

In Abbildung 3.12.b sind die Lipidklassen mit ihren Unterklassen dargestellt. In *uox* waren ungesättigte FS und Monogalaktosyl Diacylglycerol (MGDG) hochsignifikant erhöht. Weiter fanden sich in *uox* durchgehend niedrigere Gehalte an GPhL, signifikant jedoch nur für Phosphatidylglycerol (PG).

Eine detaillierte Darstellung aller identifizierten Lipide befindet sich in Anhang 6.3.





a) Lipidklassen, b) mit Unterklassen. Gezeigt sind arithmetische Mittel, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen. FS, Fettsäuren; TAG, Triacylglyceride; GPhL, Glycerophospholipide; GalL, Galaktolipide; Phaeo, Phaeophytin; ges., gesättigt; unges., ungesättigt; PC, Phosphatidylcholin; PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerol; PI, Phosphatidylinositol; MGDG, Monogalaktosyl Diacylglycerol; DGDG, Digalaktosyl Diacylglycerol. n(uox) = 5, n(WT) = 5, n(xdh uox) = 4. Einfaktorielle Varianzanalyse und Dunnett's Posttest. ** p < 0.01; * p < 0.05.

3.7 Kotyledonen und Speicherproteine in Samen von *uox* und *xdh uox*

Nachdem die Akkumulation der Metaboliten HS und Xanthin in den Samen der jeweiligen Mutanten gezeigt worden war, wurde untersucht, ob diese auf subzellulärer Ebene sichtbar wird oder eine Störung der Struktur der Kotyledonenzellen verursacht. Zu diesem Zweck wurden die Keimblätter von *uox*-, Wildtyp- und *xdh uox*-Embryonen aus Samen im TEM untersucht.

3.7.1 Subzelluläre Struktur von *uox-* und *xdh uox-*Kotyledonen

Abbildung 3.13 zeigt Ultradünnschnitte durch Kotyledonen, die mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert wurden. In den Speicherzellen sind dunklere (elektronendichtere) Bereiche erkennbar. Dabei handelt es sich um Proteinspeichervakuolen (PSV) von etwa 5 μ m Durchmesser, in denen wiederum zahlreiche helle, runde Kavitäten vorkommen. Diese werden als Phytin-Globoide bezeichnet und stellen Mineralspeicher für den Embryo dar. Sie enthalten ein Salz aus myo-Inositol-Hexaphosphat und Kationen wie Magnesium, Kalium und Calcium (Otegui *et al.*, 2002), das bei der Aufbereitung für die TEM aber meist herausgelöst wird. Zwischen den PSV und zellperipher liegen dicht gedrängt zahlreiche Lipidkörper (*lipid bodies*, L), mit einem Durchmesser von 0,5-2 μ m. Sie enthalten die Speicherlipide, die nach der Keimung im Boden und vor dem Ergrünen die wichtigste Energie- und Kohlenstoffquelle für den Keimling sind.

Während *xdh uox* unauffällig ist und dem Wildtyp gleicht, sind in den Speicherzellen von *uox* viele der PSV zum Teil stark vergrößert und unregelmäßig geformt. In ihnen sind körnige Strukturen unbekannter Zusammensetzung erkennbar (Abb. 3.13.a,d). In manchen Präparaten sind diese Einlagerungen in gut abgegrenzten Bereichen der PSV lokalisiert (Pfeile in Abb. 3.13.g).



Abbildung 3.13: Subzelluläre Struktur der Kotyledonen von Embryonen aus Samen. Gezeigt sind Ultradünnschnitte von Kotyledonen. *uox* (a,d,g), Wildtyp (b,e) und *xdh uox* (c,f). P, Proteinspeichervakuole; L, Lipidkörper (*lipid body*). Maßstab (a-c,g) = 5 μ m, (d-f) = 2 μ m.

3.7.2 SDS-PAGE der Speicherproteine aus Samen

Die auffällige Ultrastruktur der PSV von *uox*, wie sie die TEM zeigte, war der Beweggrund für die Untersuchung der Speicherproteine in Samen von *uox*, Wildtyp und *xdh uox*. Dazu wurden Proteinextrakte von unterschiedlichen Samenproben in einem hochvernetzten PA-Gel aufgetrennt (Abb. 3.14). Die Quantifizierung der Gelbanden mit ImageJ und die statistische Prüfung mittels einfaktorieller Varianzanalyse zeigte, dass die *uox*-Samen einen signifikant geringeren Gehalt an 12S-Cruciferinen aufwiesen als der Wildtyp:

12S-α: p(WT↔*uox*) < 0,01; p(WT↔*xdh uox*) < 0,05

12S-β: p(WT↔uox) < 0,05; p(WT↔*xdh* uox) > 0,05.





3.8 Funktionalität von Peroxisomen und β-Oxidation in *uox*

Für die Keimung und den Abbau der Speicherlipide und ihre Konversion zu Zuckern nach der Keimung sind β -Oxidation und Glyoxylatzyklus in den Peroxisomen notwendig. Es wurde daher untersucht, inwiefern in *uox* während Samenentwicklung und Keimungsphase die Zahl und Funktionalität der Peroxisomen-Population beeinträchtigt ist.

3.8.1 Zytochemischer Katalase-Nachweis in Kotyledonen

Peroxisomen sind wichtige Orte der Entstehung und Entsorgung von H_2O_2 in der Zelle. Arabidopsis codiert für drei Isoformen der Katalase, die ausschließlich in Peroxisomen lokalisiert sind und Wasserstoffperoxid nach 2 $H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$ abbauen. Katalase ist daher das Leitenzym der Peroxisomen und ihr Nachweis durch DAB-Färbung (Vigil, 1970; Wanner *et al.*, 1982) identifiziert die Organellen eindeutig in der Zelle. Die Abbildung 3.15. zeigt Schnitte durch Kotyledonen von Wildtyp, *uox* und *xdh uox*. DAB-Signale sind als schwarze Punkte erkennbar (Pfeile) und nahezu ausschließlich in Wildtyp und *xdh uox* vorhanden, nicht aber in *uox*. Das Fehlen der Signale in *uox* spricht für einen Defekt des Katalaseimports in die Peroxisomen oder das völlige Fehlen der Organellen in den Keimblättern.

Zur Quantifizierung der DAB-Signale wurden von den mikroskopischen Präparaten pro Genotyp mindestens 5 Schnitte von verschiedenen Embryonen ausgewertet. Dabei wurde die Anzahl der DAB-Signale pro Schnittfläche ausgezählt. In Abbildung 3.15.d steht jeder Datenpunkt für ein Präparat. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem Kruskal-Wallis-Rangsummentest und Dunn's Posttest geprüft. Im Posttest war der Unterschied in der Anzahl der DAB-Signale zwischen *uox* und Wildtyp signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 1% (p < 0,01). Wildtyp und *xdh uox* unterschieden sich nicht signifikant.



Abbildung 3.15: Katalase-Nachweis mittels DAB-Färbung.

(a-c) Semidünnschnitte durch Kotyledonen von Embryonen aus Samen von *uox*, Wildtyp und *xdh uox*, Pfeile markieren DAB-Signale.

(d) Auszählung der DAB-Signale in Semidünnschnitten von Kotyledonen. Jeder Datenpunkt steht für ein in ImageJ ausgezähltes Präparat: n(WT) = 8, n(uox) = 5, n(xdh uox) = 6. Markiert ist der Median. Kruskal-Wallis- Test und Dunn's Posttest, ** p < 0,01. Maßstab = 10 µm.

3.8.2 Funktionalität des peroxisomalen GFP-Imports in Kotyledonen und Hypokotylen von *uox*

Das Fehlen von Katalase-Signalen in Kotyledonen von *uox*-Embryonen aus Samen wies auf einen Peroxisomendefekt hin. Es wurde bereits gezeigt, dass sich zu diesem Zeitpunkt HS im Samen angesammelt hat. Von Interesse war daher, ob sich die Dynamik der Akkumulation von HS auch in einem fortschreitenden Funktionsverlust der Peroxisomen während der Samenentwicklung abbildet. Gleichzeitig wurde untersucht, inwiefern der Peroxisomendefekt auch das Hypokotyl der *uox*-Embryonen betrifft. Dazu wurden Embryonen von Wildtyp- und *uox*-Linien, in denen die Peroxisomen mit roGFP2 markiert waren, am CLSM untersucht. Das untersuchte Material stammte von Mutterpflanzen, die parallel im LT angezogen wurden, das Alter der Embryonen zum Zeitpunkt der Präparation aus Samenanlagen und Samen reichte von 15 dpa bis 6 Tage nach dem Auslegen auf MS-Festmedium. Zur Untersuchung am CLSM wurden nur transformierte *uox*-Linien mit vergleichbarer GFP-Expression in Samen ausgewählt (Abb. 3.16.a), und es wurde der Fortbestand des *uox*-Keimungsphänotyps in diesen Linien dokumentiert (Abb. 3.16.b).



Oben und auf den folgenden Seiten:

Abbildung 3.16: GFP-Lokalisation in Embryonen von uox und Wildtyp.

(a) roGFP2-SKL-Expression in drei verschiedenen *uox*-Linien und zwei verschiedenen Wildtyp-Linien.
(b) Bestätigung des *uox*-Phänotyps in den transformierten *uox*-Linien (Alter 7 dai).

(c-e) CLSM. Die Embryonen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Blütenöffnung (dpa) bzw. nach Keimung in Dunkelheit (6 dai) aus Schoten und Samen herauspräpariert. Gezeigt sind als Bildstapel überlagerte Aufnahmen von Kotyledonen [c] und Hypokotylen [h]. In den Detailaufnahmen (47 dpa und 6 dai, jeweils untere Reihe) sind Hellfeld- und GFP-Signal übereinander gelegt. Maßstab = 25 μ m.

(f) Quantifizierung der punktförmigen GFP-Signale in Kotyledonen und Hypokotylen. Die horizontale Markierung ist der Median. Jeder Datenpunkt entspricht einem Präparat, das als Bildstapel in ImageJ ausgewertet wurde.

Kruskal-Wallis-Rangsummentest und Dunn's Posttest. *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05.







Wildtyp-Linie 1

d

uox-Linie 1



Wildtyp-Linie 1

е

uox-Linie 1





Die Abbildung 3.16.c-e zeigt die Lokalisierung von roGFP2-SKL in Kotyledonen und Hypokotylen während der Embryo- und Samenreifung. Wildtyp-Linie 1 (links) und *uox*-Linie 1 (rechts) sind einander gegenüber gestellt: Die Bilder zeigen jeweils das Kotyledon [c] und Hypokotyl [h] eines bestimmten Präparates, jedoch jeweils andere Präparate einer Linie zu den angegebenen Zeitpunkten. Abb. 3.16.c-e ist also eine Zusammenschau typischer Präparate der beiden Linien zu den genannten Zeitpunkten. Für 47 dpa (Samen) und 6 dai sind zusätzlich Detailaufnahmen (Abb. 3.16.d und e, jeweils untere Hälfte) gezeigt, die aus der Überlagerung von GFP- und Hellfeld-Signal bestehen.

Vor 21 dpa zeigen beide Linien in Kotyledonen wie Hypokotylen ein reguläres, punktförmiges Muster von GFP-Signalen, welches einen intakten Import von roGFP2-SKL in die Peroxisomen annehmen lässt (15 dpa). In Wildtyp-Embryonen ist dieses reguläre Muster in jedem untersuchten Stadium (von 15 dpa bis 6 dai) zu beobachten. In ihnen ist offensichtlich durchgehend eine funktionale Peroxisomen-Population vorhanden, die GFP importieren und abgebautes Protein mit neugebildetem zu ersetzen vermag.

Im Gegensatz dazu zeichnen sich *uox*-Embryonen dadurch aus, dass schon ab 21 dpa und dann deutlicher ab 36 dpa in den Kotyledonen zentral ein Verlust von punktförmigen GFP-Signalen auftritt (Abb. 3.16.c).

Die Mehrzahl der untersuchten *uox*-Embryonen aus Samen (47 dpa) zeigen in den Kotyledonen keine oder nur noch wenige randständige peroxisomale GFP-Signale, während sich der Defekt in den Hypokotylen derselben Präparate unterschiedlich weit nach apikal erstreckt. Dieses wurde in jeder der drei untersuchten *uox*-Linien gefunden (Abb. 3.16.d und Abb. 3.17). In den reifen *uox*-Embryonen aus Samen tritt ein "peroxisomaler Mosaizismus" auf, wobei unmittelbar benachbarte Zellen entweder ein regulär punktförmiges GFP-Signal zeigen oder das Fluoreszenzsignal überwiegend diffus zytosolisch ist (Detail, untere Reihe in Abb.3.16.d). Zum Zeitpunkt 6 dai ist der Wildtyp gekeimt (Abb. 3.16.e, links). Peroxisomen liegen dort in den Kotyledonen und Hypokotylen dicht und wie in Trauben um vereinzelte restliche Lipidkörper, während in der Mehrzahl der *uox*-Embryonen funktionale Peroxisomen nur in den Hypokotylen vorhanden sind und das GFP-Signal in Kotyledonen in den Vakuolen lokalisiert erscheint (Abb. 3.16.e, rechts).

Jeder Datenpunkt der Abbildung 3.16.f steht für ein Embryonen-Präparat und markiert die Anzahl der punktförmigen GFP-Signale pro Fläche, ausgezählt an einem Kotyledonen- bzw. Hypokotylen-Bildstapel, der am CLSM registriert wurde. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Rangsummentest und Dunn's Posttest. Die Zahl der punktförmigen GFP-Signale (funktionale Peroxisomen) in den *uox*-Kotyledonen ist im Vergleich zum Wildtyp hochsignifikant erniedrigt (p < 0,01). In den Hypokotylen ist der Signalverlust nur für die *uox*-Linien 1 und 9 signifikant. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass in *uox*-Hypokotylen aller Linien distal häufig punktförmige GFP-Signale vorkommen. Da für die Auszählung der Signale aber die ganze Länge der Hypokotyle berücksichtigt wurde, sind die Werte niedriger als wenn nur die Hypokotylspitzen ausgezählt worden wären.

Abbildung 3.17 zeigt in jeder Reihe ein Keimblatt (links) und das Hypokotyl (rechts) eines bestimmten Embryopräparates der angegebenen Linien, um den Peroxisomendefekt in *uox*-Embryonen aus Samen mit weiteren Beispielen zu belegen. Die *uox*-Linien 3 und 9 zeigen einen vergleichbaren Defekt wie *uox*-Linie 1.

Folgende Seiten:

Abbildung 3.17: GFP-Lokalisation in *uox*- und Wildtyp-Embryonen aus Samen.

Die dargestellten Linien sind in jedem Bild oben angegeben. Nebeneinander sind jeweils ein Kotyledon und das Hypokotyl des gleichen Präparates gezeigt. Die Linien *uox* 1, *uox* 3 und *uox* 9 zeigen im Vergleich zum Wildtyp einen Peroxisomendefekt. Dieser ist in Kotyledonen viel stärker ausgeprägt als in Hypokotylen. Dort sind distal häufig funktionale Peroxisomen vorhanden, die GFP2-SKL importieren können.


61

n 1	
Erge	bnisse.
	0111000







3.8.3 Funktionalität der β-Oxidation in *uox*

3.8.3.1 β-Oxidation in Keimlingen

Ein charakteristisches Merkmal der *Arabidopsis*-Mutanten, die in der Funktionalität der β -Oxidation von FS beeinträchtigt sind, ist die Resistenz ihrer Keimlinge gegen das Proherbizid 2,4-DB. 2,4-DB wird in der β -Oxidation in das wirksame Herbizid 2,4-D umgewandelt, welches in jungen Keimlingen Kümmerwuchs verursacht. Da *uox* einen lokal und zeitlich begrenzten Peroxisomendefekt aufweist, wurde untersucht, inwieweit dies mit einer Sensitivität für 2,4-DB verbunden ist. Als Kontrolle wurde auch *pxa1-1* untersucht. PXA1 (Comatose) leistet den Transport von 2,4-DB, aber auch von FS und FS-CoA, in die Matrix der Peroxisomen und sein Ausfall hat die Resistenz gegen 2,4-DB zur Folge. Gleichzeitig ist durch den fehlenden FS-Transport in die Peroxisomen der *pxa1-1*-Keimling, ebenso wie *uox*, für die Etablierung auf Zucker im Medium angewiesen.

Alle ausgelegten Linien waren sensitiv für 2,4-D und bildeten an der verkümmerten Primärwurzel zahlreiche Wurzelhärchen aus (Abb. 3.18.a und d). 2,4-DB beeinträchtigte das Wachstum des Wildtyps in ähnlicher Weise wie 2,4-D, *pxa1-1* hingegen wurde erwartungsgemäß nicht an der Wurzelbildung gehindert. Auch in *uox* unterblieb die Wurzelbildung unter der Einwirkung von 2,4-DB (Abb. 3.18.b und d), während sie im Medium ohne Zusätze (unter Berücksichtigung des *uox*-Phänotyps) relativ normal verlief (Abb. 3.18.c und d).



Abbildung 3.18: Untersuchung der Peroxisomen-Funktionalität mittels 2,4-DB-Test. *uox*, Wildtyp und *pxa1-1* wurden auf MS-Festmedium mit 2% Saccharose gezogen, die zusätzlich (a) 2,4-D (0,2 μ M), (b) 2,4-DB (4 μ M), (c) keine Zusätze enthielten. Alle Samen wurden 5 Tage nach dem Auslegen mit einer sterilen Nadel angestochen. Die Bilder zeigen 19-Tage-alte Pflanzen. (d) zeigt in Vergrößerung Pflanzen, die auf Medium mit den angegebenen Zusätzen angezogen wurden.

3.8.3.2 β -Oxidation in adulten Pflanzen

Die Funktionalität der β -Oxidation in adulten *uox*-Pflanzen wurde durch die Anwendung von Dunkelstress untersucht, auch hier wurde die *pxa1-1*-Mutante als Kontrolle mitgeführt. Wie in Kunz *et al.* (2009) beschrieben, hat ein 48-stündiger Aufenthalt in Dunkelheit das Absterben der *pxa1-1*-Pflanzen zur Folge. Dies wurde bestätigt gefunden (Pfeil). Wildtyp- und *uox*-Pflanzen überlebten dagegen mehr als 5 Tage in völliger Dunkelheit (Abb. 3.19). Dies weist darauf hin, dass der Peroxisomendefekt in *uox* streng auf die Keimungsphase beschränkt ist und die β -Oxidation in den Blättern von adulten *uox*-Pflanzen normal funktioniert.

Ergebnisse



Abbildung 3.19: Wirkung von Dunkelstress auf adulte Pflanzen von *uox*, *pxa1-1* und Wildtyp.

Angegeben ist die Dauer des Aufenthaltes in Dunkelheit in Stunden. Die Dokumentation erfolgte jeweils 24 h nach dem Rücktransfer in den LT. Anordnung der Pflanzen jeweils im Uhrzeigersinn: Wildtyp, *pxa1-1*, *uox*.

4 Diskussion

4.1 uox und andere Mutanten mit Keimungs- und Etablierungs-Phänotyp

Im Vergleich mit Mutanten, bei denen Enzyme der FS-Aktivierung, der β -Oxidation oder Transportprozesse an der Peroxisomenmembran betroffen sind, zeigt *uox* charakteristische Ähnlichkeiten und Unterschiede, die in Tab. 4.1 zusammengestellt sind und nachfolgend Spalte für Spalte besprochen werden.

- Footitt *et al.* (2006) zeigten, dass für die Keimung eine intakte β-Oxidation essenziell ist. Für die Keimung von *pxal-1* gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Während die Erstautoren eine Keimungsrate vergleichbar dem des Wildtyps beschreiben (Zolman *et al.*, 2001), fanden andere Autoren bei nachgereiften Samen sowohl für *kat2-1* als auch für *pxal-1* und zwei verschiedene *cts*-Allele Keimungsraten unter 20% (Footitt *et al.*, 2006). Auch *uox* und *pex5-10* haben eine verminderte Keimungsrate. Die *pex5-10*-Mutante und *pxal-1* keimen besser, wenn die Samenschale angestochen (*pricking*) oder angeritzt (*nicking*) wird. Für *pxal-1* ist das verständlich, seit es Hinweise gibt, dass PXA1 an der Kaskade beteiligt ist, die zum Verdau der Pektine der Samenschale führt (Kanai *et al.*, 2010). Warum *pex5-10* vom Anritzen profitiert, ist unklar.
- Alle Keimlinge der aufgeführten Mutanten sind auf eine Zuckerquelle wie Saccharose für die Etablierung angewiesen. Aufgrund des Peroxisomendefekts von *uox* in Kotyledonen ist hier die Lipidverwertung nicht möglich, während in *pex5-10* der Import von Enzymen der β-Oxidation und des Glyoxylatzyklus in die Peroxisomen beeinträchtigt ist (Khan und Zolman, 2010). In *pxa1-1, lacs6 lacs7* und *kat2-1* fehlen dagegen jeweils einzelne Enzymfunktionen, die für Import, Aktivierung und Oxidation der Speicherlipide unverzichtbar sind.
- Mit Zuckerzusatz werden die Einzelenzym-Mutanten ähnlich schnell autotroph wie der Wildtyp, während *pex5-10* und *uox* aufgrund ihres Peroxisomendefekts auch dann eine verzögerte Etablierung zeigen.
- Während *uox* als adulte Pflanze unauffällig wächst, sind *pxa1-1* und *pex5-10* in ihrem vegetativen Wachstum verzögert (Zolman *et al.*, 2001; Khan und Zolman, 2010). *kat2-1* hingegen zeigt eingeschränkte Fertilität (Footitt *et al.*, 2007).
- Die Rolle der β-Oxidation in adulten Pflanzen ist wenig charakterisiert, jedoch scheint sie f
 ür den Umsatz von FS aus Membranen, speziell bei Dunkelheit, nötig zu sein, wie

Transkriptomanalysen (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; van der Graaff *et al.*, 2006). und Dunkelstress-Experimente (Kunz *et al.*, 2009) zeigten. Dies hat fatale Konsequenzen für Enzym-Mutanten des peroxisomalen FS-Imports (*pxal-1*) oder der β -Oxidation (*kat2-1*), welche den Aufenthalt in völliger Dunkelheit nur für einen Tag überleben. Aufgrund der Resistenz von adulten *uox*-Pflanzen gegen Dunkelstress kann für *uox* eine funktionale β -Oxidation in den Mesophyllzellen der Blätter angenommen werden (3.8.3.2).

- Junge Keimlinge der Mutanten f
 ür die "Kern"-Enzyme der β-Oxidation (*acx1 acx2, mfp2* und *kat2*) zeigen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen stark vergrößerte Peroxisomen, was wahrscheinlich durch die Akkumulation von Substraten, wie langkettigen FS verursacht wird (Germain *et al.*, 2001; Pinfield-Wells *et al.*, 2005; Rylott *et al.*, 2006).
- Sowohl Indolbuttersäure (IBA) als auch das synthetische Proherbizid 2,4-DB werden durch einen Umlauf der β-Oxidation in IAA, bzw. 2,4-D umgesetzt. Überschreitet deren Konzentration im Medium einen Schwellenwert, so behindern beide stark das Keimlingswachstum. Die Substanzen wurden bei der genetischen Sichtung (*screening*) eingesetzt, um Mutanten zu identifizieren, die in der β-Oxidation gestört sind. Während Keimlinge von *pxa1-1, kat2-1* und *pex5-10* resistent gegen hohe Konzentrationen von 2,4-DB sind, trifft dies für *uox* und *lacs6 lacs7* nicht zu. Fulda et al. (2004) ziehen daraus den naheliegenden Schluss, dass die beiden CoA-Ligasen LACS6 und LACS7 nicht an der Aktivierung von 2,4-DB für die β-Oxidation beteiligt sind. Die Sensitivität von *uox* erklärt sich möglicherweise damit, dass in Hypokotylen und der Keimwurzel häufig funktionale Peroxisomen vorkommen (Abb. 3.16 und 3.17). Individuen, die keimen können, sollten dann auch 2,4-DB zu 2,4-D umsetzen können.
- Schließlich ähnelt *uox* der Frachtimport-Peroxinmutante *pex5-10* in der Mislokalisation von GFP-PTS1. Während in *uox* der Defekt auf die Phase der späten Samenentwicklung und der Keimung (21 dpa-6 dai) beschränkt ist, zeigt *pex5-10* diesen Defekt auch als adulte Pflanze, z.B. in Wurzelhaaren (Khan und Zolman, 2010).

D'1	•
Disk	ussion
- 1011	

Mutante	Proteinfunktion in Peroxisomen	Keimungsrate wie Wildtyp ?	Etablierung ohne Zucker wie Wildtyp ?	Etablierung mit Zucker wie Wildtyp ?	Adulter Phänotyp	Sensitiv für Dunkelstress ?	Peroxisomen der Keimlinge vergrößert ?	Keimlinge sensitiv für 2,4-DB / IBA ?	peroxisomaler Import von Matrixenzymen
uox	Harnsäure- Abbau	vermindert	nein	zeitlich verzögert	normal	nein	nein	bestätigt nur für 2,4-DB	gestört nur in Embryonen
pxa1-1	FS-Import	unterschied- liche Angaben (<i>nicking</i> hilft)	nein	ja	Wachstum verzögert (Zolman 2001)	stirbt nach 48 h	nein	nein	normal
lacs6-1 lacs7-1	FS-Akti- vierung	ja (Fulda 2004)	nein	ja	normal	unbekannt	nein	ja, für beide	normal
kat2-1	β-Oxidation	unterschied- liche Angaben	nein	ja	Fertilität eingeschränkt (Footitt 2007)	stirbt nach 48 h	ja (Germain 2001)	nein	normal
pex5-10	Matrixprotein- Import	vermindert (<i>nicking</i> hilft)	nein	zeitlich verzögert	Wachstum verzögert (Khan 2010)	unbekannt	nein	nein	generell gestört
Wildtyp				schneller		nein		ja	

Tab. 4.1. *uox* im Vergleich mit anderen Mutanten mit Peroxisomendefekten. Gemeinsam ist allen Mutanten die Abhängigkeit von Zucker für die Etablierung der Keimlinge. Darüber hinaus zeigen die Mutanten jeweils spezifische Defekte.

4.2 Harnsäure- versus Xanthin-Akkumulation

Mit einem gekoppelten enzymatischen Nachweis wurde die Akkumulation von HS in *uox* und von Xanthin in *xdh* und *xdh uox* nachgewiesen. Die höchsten Gehalte fanden sich in der Samenentwicklung und in reifen Samen (Abb. 3.10). Die höchsten gemessenen Konzentrationen von HS in den Extrakten betrugen zwischen 300 und 500 μ M, was nahe seiner Löslichkeitsgrenze in Wasser liegt.

Obgleich Xanthin in den Samen der *xdh-* und der *xdh uox-*Mutante ebenso stark akkumulierte wie HS in der *uox-*Mutante, wurde dort kein auffälliger Phänotyp beobachtet, was zeigt, dass eine Anhäufung von Oxopurinen nicht *per se* für die Pflanzenzelle toxisch ist. Hinsichtlich der unterschiedlichen Wirkung von HS und Xanthin findet sich eine gewisse Parallele in der Situation beim Menschen. *XDH-*Gendefekte führen dort zu einem erhöhten Gehalt an Xanthin im Serum und Xanthinexkretion im Urin. Betroffene Menschen können aber lebenslang symptomfrei bleiben (http://www.omim.org), solange sie keine Xanthinsteine entwickeln, während erhöhte HS-Serumspiegel sehr viel häufiger zu Beschwerden wie Gicht und Steinbildung führen. Die spezifische Wirkung von HS verglichen mit Xanthin ist also offenbar in der geringfügig anderen molekularen Struktur begründet.

Die Untersuchung der *uox*-Samen mittels TEM hatte zum Ziel, ein morphologisches Korrelat der HS-Akkumulation auf zellulärer Ebene zu identifizieren. Eine auffällige Abweichung in *uox* stellen die unbekannten Strukturen in den Proteinspeichervakuolen (PSV) dar (Abb. 3.13). Hierbei handelt es sich aber sehr wahrscheinlich nicht um HS, denn es wäre kaum verständlich, warum Xanthin, das noch weniger wasserlöslich ist als HS, in *xdh uox* nicht ebenfalls als Präzipitat sichtbar werden sollte.

4.3 Harnsäurewirkung in Pflanze und Mensch

4.3.1 Harnsäure in Arabidopsis

HS kommt in *Arabidopsis* normalerweise nur in äußerst geringen Mengen vor (Abb. 3.11), da es von UOX in den Peroxisomen weiter umgesetzt wird. In Keimung und Seneszenz, wenn der Purinringkatabolismus stark aktiviert ist, erfolgt ihr Abbau über Allantoin zu Glyoxylat, NH₃ und CO₂. Über eine pathophysiologische Wirkung in Pflanzen war vor dieser Arbeit nichts bekannt und es wurde auch außerhalb der Pflanzenwissenschaften bislang nichts über eine Verbindung zwischen einer HS-Akkumulation und Peroxisomendefekten berichtet. Die vorliegende Arbeit belegt erstmals eine toxische Wirkung von HS auf zellulärer Ebene *in vivo*, die sich in einem peroxisomalen Defekt und einer auffälligen Struktur von Proteinspeichervakuolen in den reifen Embryonen einer Samenpflanze manifestiert.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde auch versucht, den Einfluss der Umweltbedingungen, unter denen eine *uox*-Pflanze angezogen wird, auf den HS-Gehalt und die Keimungsrate der von ihr produzierten Samen zu bestimmen. Die erhaltenen Daten waren statistisch nicht auswertbar, deuteten aber doch an, dass die Qualität und Dauer der Belichtung die Keimungsrate der nachfolgenden Generation beeinflusst und homozygote *uox*-Samen-Chargen, die besser keimten auch niedrigere HS-Gehalte hatten.

4.3.2 Harnsäure im Menschen

In der medizinischen Forschung besteht ein hohes Interesse daran, mehr über die molekulare Wirkung der HS in Erfahrung zu bringen, weil die Zahl der Patienten mit überhöhtem HS-Serumspiegel und Gicht in den westlichen Ländern in den letzten 40 Jahren zugenommen hat (Luk und Simkin, 2005).

HS-Serumgehalte jenseits der Löslichkeitsgrenze in Körperflüssigkeiten führen beim Menschen zur Bildung von Natriumurat-Kristallen, die sich in Gelenken und den Nieren ablagern. Diese werden vom Immunsystem als molekulare Marker für Zellschädigung erkannt und führen zu entzündlichen und degenerativen Prozessen in Gelenken und der Niere (Rock *et al.*, 2013). Erhöhte Serum-HS ist darüber hinaus mit weiteren Erkrankungen wie Bluthochdruck, Herz-/Gefäß- und Nierenerkrankungen assoziiert (Jin *et al.*, 2012).

Bei der angeborenen Lesch-Nyhan-Krankheit (LND) leiden die Patienten an neurologischen Erkrankungen und Verhaltensstörungen. Es wird durch einen Defekt des Purinrecyclings verursacht, der schon bei Neugeborenen zu erhöhten HS-Serumgehalten führt (Jinnah, 2009). Gegenwärtig herrscht die Auffassung vor, dass HS bei Patienten mit LND lediglich Gicht und Nierensteine verursacht, jedoch nicht am Zustandekommen der schwerwiegenden neurologischen Symptome beteiligt ist, da eine Kontrolle der überhöhten HS-Spiegel in Neugeborenen diese Symptome nicht bessert (Torres *et al.*, 2012). Für diese wird ein Defekt von dopaminergen Zellen der Basalganglien verantwortlich gemacht, der auf noch unbekannte Weise während der Embryonalentwicklung durch den gestörten Purinstoffwechsel verursacht wird (Cristini *et al.*, 2010; Gottle *et al.*, 2013). Menschliche neurale Stammzellen, die aus dem Gehirn von Föten mit LND isoliert wurden und vermehrt HS produzierten, zeigten in Zellkultur kein auffälliges Wachstum verglichen mit gesunden Zellen (Cristini *et al.*, 2010).

4.4 Molekulare Wirkungen von Harnsäure

4.4.1 Prooxidans oder Antioxidans ?

Biochemische Untersuchungen und *in vitro*-Experimente an tierischen Zellkulturen zeigten, dass HS je nach physiko-chemischer Umgebung als Prooxidans oder Antioxidans wirken kann (Sautin und Johnson, 2008). In Peroxisomen entsteht beispielsweise aus NO-Radikalen und Superoxid das starke Oxidationsmittel Peroxynitrit (Schrader und Fahimi, 2006). HS kann mit Peroxynitrit reagieren und dieses neutralisieren, dabei entstehen aber Uratradikale (Muraoka und Miura, 2003; Gersch *et al.*, 2009). Diese können in menschlichem Plasma von Ascorbinsäure abgefangen werden, intrazellulär wirken HS-Radikale jedoch prooxidativ und schädigen vor allem Lipide (Santos *et al.*, 1999). Für die Entstehung von Herz-/Gefäßkrankheiten wird HS ein ursächliche Rolle zugeschrieben, weil sie in Gefäßendothelzellen (Sanchez-Lozada *et al.*, 2012) und in glatter Gefäßmuskulatur (Corry *et al.*, 2008) oxidativen Stress verursacht, der zu Zellschädigung und Apoptose führt. Tierische wie pflanzliche Peroxisomen erfahren durch ihren Stoffwechsel permanent oxidativen Stress, weil in ihnen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen und umgesetzt werden (del Rio *et al.*, 2003; Nyathi und Baker, 2006). Sie altern dadurch und werden bei Säugetieren schließlich abgebaut und ersetzt (Nordgren *et al.*, 2013).

Ob HS in pflanzlichen Peroxisomen zusätzlichen oxidativen Stress auslösen und dadurch die Organellen schädigen kann, ist unbekannt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass im Gegensatz zur HS nichts über eine Bildung von Xanthinradikalen bekannt ist, was die völlig unterschiedlichen Auswirkungen einer Akkumulation der beiden Oxopurine erklären könnte.

4.4.2 Harnsäure als schwache Säure

HS ist mit einem pK_S-Wert von 5,8 für die erste Dissoziationsstufe eine schwache Säure. Daher liegt der Gedanke nahe, dass die Akkumulation von HS in Peroxisomen zu einer Ansäuerung der Matrix führt. Zahlreiche Forschergruppen haben in der Vergangenheit Messungen der intraperoxisomalen Protonen-Konzentration mittels pH-sensitiver Fluorochrome durchgeführt. Diese lieferten je nach untersuchtem Organismus und Zelltyp unterschiedliche und widersprüchliche Ergebnisse (Antonenkov und Hiltunen, 2012). Zellen und Organellen nutzen Protonengradienten an Membranen in aller Regel für Transportprozesse. In Peroxisomen sind aber keine Membranproteine bekannt, die Moleküle oder Ionen im Cooder Antiport mit Protonen transportieren. Proteomische Analysen von Säuger- und Hefepräparationen identifizierten weniger als ein Dutzend verschiedene Membranproteine in Peroxisomen, darunter die schon bekannten Biogenese-Peroxine, der Membrantransporter PXA1 und Pxmp2, das eine Porenfunktion für niedermolekulare Stoffe bis 300 Dalton hat (Rokka *et al.*, 2009; Antonenkov und Hiltunen, 2012). Aus Untersuchungen in *Arabidopsis* sind außerdem Transporter bekannt, die ATP, bzw. NAD⁺ im Austausch für AMP importieren (Arai *et al.*, 2008; Linka *et al.*, 2008; Bernhardt *et al.*, 2012). Zum Vergleich: Die innere Membran der Mitochondrien enthält rund 50 verschiedene, spezifische Transporter und Ionenkanäle. Diese Befunde lassen zusammengenommen auf eher simple Transportmechanismen an der Peroxisomenmembran schließen und wahrscheinlich stellt sich die Ionenkonzentration in den Peroxisomen (und damit die der Protonen und der pH-Wert) passiv als Donnan-Gleichgewicht ein (Antonenkov und Hiltunen, 2012). Damit wäre auch kein Einfluss einer durch HS bewirkten pH-Verschiebung auf Transportprozesse möglich. Es bleibt aber die Möglichkeit bestehen, dass eine Ansäuerung der Peroxisomen generell die Funktionsfähigkeit dieser Organellen beeinträchtigt.

4.5 Primärmetaboliten-Gehalte in *uox*-Samen

Mittels Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie, konnte ein hoher Gehalt an HS in *uox*-Samen gemessen werden, während in *xdh uox*- und Wildtyp-Samen nur äußerst geringe Mengen nachweisbar waren (Abb. 3.11). Am deutlichsten unterschieden sich die drei Gruppen in ihrem Gehalt an Uridin. Dieses Nukleosid war in *uox*-Samen stärker angereichert als in *xdh uox*, in beiden jedoch verglichen mit dem Wildtyp hochsignifikant erhöht. Uridin wird von der Nukleosid-Hydrolase 1 (NSH1) umgesetzt (Jung *et al.*, 2009). Wegen der strukturellen Ähnlichkeit von HS und Uridin ist es denkbar, dass NSH1 von HS kompetitiv gehemmt wird, was in geringerem Maße auch für Xanthin zutreffen könnte. Für die Entstehung des *uox*-Phänotyps kann Uridin als Ursache aber ausgeschlossen werden, da bekannt ist, dass erhöhte Uridin-Konzentrationen in ungestressten Pflanzen keinen auffälligen Phänotyp verursachen und die entsprechende *nsh1*-Mutante weder in ihrer Keimfähigkeit noch in der Etablierung ihrer Keimlinge beeinträchtigt ist (Jung *et al.*, 2011; Riegler *et al.*, 2011).

Auffällig erhöht waren ausschließlich in *uox*-Samen die Gehalte an Sorbitol/Galaktitol. Sorbitol wurde in Halophyten (Ahmad *et al.*, 1979; Gil *et al.*, 2011) sowie in Rosengewächsen unter Salzstress (Li *et al.*, 2013) als Osmoprotektans gefunden, in *Arabidopsis* akkumuliert dieses Polyol während der Samenreifung rund 20-fach (Fait *et al.*, 2006). Die Signalintensität für Sorbitol war in *uox*-Samen im Vergleich zu Wildtyp und *xdh uox* nochmals um den Faktor 10 erhöht. Dies deutet darauf hin, dass in *uox* in der Austrocknungsphase des Samens ein verstärkter osmotischer Stress auftritt, der möglicherweise durch die HS-Akkumulation verursacht wird.

In *uox* wurden Glucose und Gluconat signifikant erhöht gefunden. Beide sind in ihrer am C6-Atom phosphorylierten Form Substrate des oxidativen Pentosephosphatwegs. Der Stoffwechselweg und seine beiden NADP⁺-abhängigen Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase sind zwar in Chloroplasten lokalisiert, interessanterweise wurden sie aber in *Pisum sativum* auch in Peroxisomen nachgewiesen (Corpas *et al.*, 1998). Dort ist ihre Anwesenheit offenbar notwendig, um NADPH zu regenerieren, welches im Ascorbat-Glutathion-Zyklus benötigt wird (Jimenez *et al.*, 1997). Falls dies auch in *Arabidopsis* zutrifft, wären die erhöhten Glucose und Gluconat-Gehalte in *uox*-Samen ein unabhängiger Beleg für den konfokalmikroskopisch beobachteten Peroxisomendefekt.

4.6 Lipide und Speicherproteine in *uox*-Samen

Die Lipidanalytik der Samenproben (Abb. 3.12) ergab signifikante Abweichungen in uox-Samen. Am auffälligsten war der Überschuss an freien FS. Baud et al. (2002) fanden, dass Arabidopsis-Embryonen während der Samenreifung einen Teil ihrer Speicherlipide abbauen. Dies steht in Übereinklang mit dem Fund in Brassica napus, dass Schlüsselenzyme von β-Oxidation (KAT2), Glyoxylatzyklus (MLS, ICL) und Gluconeogenese (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, PEP-CK) schon während der Speicheröl-Akkumulation exprimiert werden und auch schon aktiv sind (Chia et al., 2005). Die Bedeutung dieses Vorgangs für Spezies mit Ölsamen ist nicht völlig klar. Es wurde vorgeschlagen, dass der TAG-Abbau im Embryo dazu dient, nach dem Verlust der trophischen Verbindungen zwischen Samen und Mutterpflanze den Metabolismus aufrechtzuerhalten und die Kohlenstoff-Skelette zu liefern, die für die Synthese von Speicherproteinen und LEA (late embryogenesis abundant)-Proteinen benötigt werden (Baud et al., 2002; Chia et al., 2005). LEA-Proteine schützen andere Proteine bei Trockenstress gegen Aggregation und kommen reichlich in Samen vor (Goyal et al., 2005; Hundertmark und Hincha, 2008). Somit könnte der Überschuss an freien FS in uox-Samen einerseits das Defizit an Speicherproteinen (3.7.2) erklären, andererseits ist er möglicherweise auch für einen reduzierten Gehalt an LEA-Proteinen und damit für eine verminderte Toleranz gegen Austrocknungsstress verantwortlich.

Die Akkumulation freier FS in *uox*-Samen stellt einen weiteren, unabhängigen Hinweis auf einen Peroxisomendefekt dar: Demnach könnten in den späten *uox*-Embryonen aus den TAG in den Ölkörpern zwar noch FS mobilisiert (die Lipidanalytik zeigte vergleichbare TAG-

Gehalte wie im Wildtyp), aber nicht mehr wie in Wildtyp- oder *xdh uox*-Embryonen peroxisomal in der β -Oxidation abgebaut werden.

Die Auftrennung von Proteinextrakten mit SDS-PAGE (Abb. 3.14) zeigte einen signifikant erniedrigten Gehalt an 12S- α - und 12S- β -Cruciferinen in *uox*-Samen. Das Muster der Proteinbanden ergab jedoch keinen Hinweis auf eine ungewöhnliche Zusammensetzung der Speicherproteine (wie z.B. unprozessierte 12S- oder 2S-Fraktionen). Der relative Mangel an Speicherproteinen trägt aber aus folgenden Gründen wahrscheinlich nicht ursächlich zum *uox*-Phänotyp bei:

Die Arabidopsis vsr1-1 Mutante, in der durch eine T-DNA-Insertion der wichtigste Rezeptor für die Sortierung von Speicherproteinen in die PSV ausgeschaltet ist, mislokalisiert diese in den Keimblättern in den extrazellulären Raum und ein Teil der 12S-Fraktion liegt im Immunblot unprozessiert vor. Dennoch keimt vsr1-1 normal und wächst unauffällig (Shimada *et al.*, 2003a). Die PSV sind in vsr1-1 zwar verkleinert, weisen aber andererseits keine abnormale Form oder Einschlüsse wie in den *uox*-Embryonen auf.

Ebenso unauffällig ist der Phänotyp einer Quadrupelmutante in *Arabidopsis*, in der alle vier Enzyme ausgeschaltet sind, die für die Prozessierung der Speicherproteine auf dem Weg in die PSV zuständig sind. Die SDS-PAGE zeigte dort zwar eine veränderte Zusammensetzung der Speicherproteine, jedoch werden diese korrekt in die PSV importiert und die Zellen der Kotyledonen sehen im Lichtmikroskop betrachtet normal aus (Shimada *et al.*, 2003b; Gruis *et al.*, 2004).

4.7 Der Peroxisomendefekt in Samenentwicklung und Keimung von uox

Die Ergebnisse der HS-Messung und der Konfokalmikroskopie (CLSM) machen einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Akkumulation von HS in *uox* während der Samenentwicklung und einer zunehmenden Beeinträchtigung des GFP-Imports in die Peroxisomen der Keimblätter und Hypokotylen des Embryos plausibel, obwohl derzeit kein molekularer Wirkmechanismus dafür angegeben werden kann. Ausgehend von dem beobachteten *uox*-Phänotyp wurde zunächst die Hypothese aufgestellt, dass die Akkumulation von HS das Redoxpotential der Peroxisomenmatrix verändert und dadurch die Funktion der Organellen beeinträchtigt. Als Untersuchungsmaterial für die Konfokalmikroskopie wurden daher transgene Linien von Wildtyp und *uox* ausgewählt, die unter dem 35S-Promotor aus Cauliflower-Mosaikvirus konstitutiv ein *GRX1-roGFP2*-SKL-Konstrukt exprimieren. Glutaredoxin (GRX1) ist eine Oxidoreduktase, die Elektronen zwischen dem Glutathion-Pool

eines zellulären Kompartiments (z.B. Zytosol, Mitochondrien oder Peroxisomen) und roGFP2 überträgt und damit zwischen beiden ein Redoxgleichgewicht einstellt. Mit dem Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem roGFP2 ändert sich die Intensität seiner emittierten Fluoreszenz im Bereich von 505-530 nm nach Anregung bei 400 und 480 nm. Das Verhältnis dieser beiden Intensitäten (400/480 nm) kann in Echtzeit am CLSM gemessen werden und stellt somit ein Maß für das Redoxpotential des untersuchten Kompartiments dar (Schwarzlander *et al.*, 2008). Diese technisch aufwändigen Versuche wurden aber hier an Embryonen nicht durchgeführt, weil schon erste Untersuchungen am CLSM einen drastischen Peroxisomendefekt in den Kotyledonen von reifen *uox*-Embryonen aus Samen anzeigten. Gleichwohl ergaben Vorversuche an Blattmaterial von adulten *uox*-Pflanzen mit dieser Methode keinen Hinweis auf eine deutliche Abweichung des Redoxpotentials im Vergleich zum Wildtyp, was für intakte Peroxisomen in Blattmesophyll spricht und im Einklang mit dem Ergebnis des Dunkelstress-Experimentes steht.

Neben der phänotypischen Ähnlichkeit mit Mutanten der β-Oxidation war das Fehlen der Katalaseaktivität ein sichtbarer Beleg für die Störung der Peroxisomenfunktion in *uox*-Kotyledonen (Abb. 3.15). Die darauf folgende Untersuchung der *uox*-Linien, in denen roGFP2-SKL in die Peroxisomen transportiert wird, zeigte einen mit dem Alter der Embryonen zunehmenden Verlust der GFP-Signale in Peroxisomen. Embryonen aus Samen und spätere Stadien zeigten eine überwiegend zytosolische Mislokalisation von GFP. Die Ausprägung des Peroxisomenverlustes war dabei in einzelnen Embryonen unterschiedlich stark. Funktionelle Peroxisomen-Populationen wurden in Kotyledonen stets am Rande, in Hypokotylen distal und apikal gelegen gefunden, sodass ein Verlauf anzunehmen ist, bei dem der Peroxisomendefekt zunächst zentral in den Kotyledonen beginnt (21-36 dpa) und sich von dort in die Peripherie ausbreitet (Abb. 3.16.c und d).

In den *uox*-Embryonen aus Samen wurde ein "peroxisomaler Mosaizismus" gefunden, wie er auch in Fibroblastenkulturen von Patienten mit milden Erkrankungen des ZSS beobachtet werden kann. Dort finden sich nach Immunfluoreszenzfärbung für peroxisomale Proteine (wie Katalase) Zellen mit regulären, punktförmigen GFP-Signalen neben solchen mit zytosolischer Fluoreszenz, obwohl alle genetisch identisch sind. Dies spricht für eine graduelle und bedingte Störung des peroxisomalen Proteinimports in diesen Bindegewebszellen zumindest unter den *in vitro*-Kulturbedingungen. In den Kotyledonen und Hypokotylen von *uox* gibt es analog Bereiche, in denen Zellen mit funktionalen Peroxisomen unmittelbar an solche mit GFP-Fehllokalisierung grenzen (Abb. 3.16.d, Detail Samen). In Fibroblasten wird

der Peroxisomendefekt durch nur wenige Grad der Temperaturerhöhung $(37^{\circ}C \rightarrow 40^{\circ}C)$ in der Zellkultur verschlimmert und umgekehrt durch Temperaturerniedrigung $(37^{\circ}C \rightarrow 30^{\circ}C)$ gemildert (Imamura *et al.*, 1998; Gootjes *et al.*, 2004). Es handelt sich dabei wahrscheinlich um Temperatur-sensitive Mutationen, die entweder die Funktionsfähigkeit von Rezeptoren oder Frachtimport-Peroxinen oder die Affinität zu ihren Substraten herabsetzen.

In *uox* kommt der Effekt möglicherweise zustande, wenn während der Samenreifung lokal im Embryo ein Schwellenwert der HS-Konzentration überschritten wird. Über die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen kann nur spekuliert werden. Denkbar sind die Hemmung peroxisomaler Transport- und Stoffwechselprozesse durch HS oder eine durch ihre Akkumulation bewirkte Verschiebung von Redoxpotential oder pH-Wert, wodurch die Funktionalität und Integrität der Peroxisomen irreversibel zerstört wird.

Unklar ist derzeit, ob die beobachtete GFP-Mislokalisation in *uox*-Embryonen auf eine Störung des Proteinimports in die Peroxisomen (ähnlich wie in *pex5-10*) oder auf das völlige Fehlen der Organellen, z.B. nach Pexophagie zurückgeht. Obwohl Autophagie von Peroxisomen in Pflanzen bisher nicht direkt gezeigt wurde, mehren sich Hinweise auf ihre Existenz (Farmer *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Shibata *et al.*, 2013). In Hefen und Säugerzellen ist Pexophagie gut dokumentiert und als Ursachen werden i) der Verlust der Kapazität für den Proteinimport in die Organellen und ii) die Zerstörung der intraperoxisomalen Redoxbalance durch ROS-Überschuss diskutiert (Fransen, 2012). Beides ist auch in *Arabidopsis* als eine Folge der beobachteten HS-Akkumulation und als Auslöser von Pexophagie denkbar.

4.8 Sensitivität für 2,4-DB als Folge des Mosaizismus

Eine Beobachtung, die zunächst überraschte, war die Empfindlichkeit von *uox* für das Proherbizid 2,4-DB. Viele *Arabidopsis*-Mutanten mit Einzelenzym- oder generalisierten peroxisomalen Defekten zeigen Resistenz gegen 2,4-DB und das natürlich vorkommende Auxin Indolbuttersäure (IBA). Es gibt allerdings Ausnahmen: *lacs6 lacs7* z.B. ist sensitiv für beide Verbindungen (Fulda *et al.*, 2004), die Doppelmutante *acx1 acx2* hingegen, welche eine niedrige Keimungsrate (< 20%) aufweist, vermag nur IBA zu oxidieren, nicht aber 2,4-DB. Der Grund hierfür ist, dass ACX1 und ACX2 spezifisch mittel- bis langkettige FS umsetzen, 2,4-DB aber von anderen CoA-Oxidasen umgesetzt wird, die spezifisch für mittelbis kurzkettige FS sind (Adham *et al.*, 2005; Pinfield-Wells *et al.*, 2005).

Eine mögliche Erklärung für die Sensitivität von *uox*-Keimlingen ist der konfokal-mikroskopische Fund, dass in den Hypokotylen von *uox*-Embryonen distal häufig funktionale Peroxisomen-Populationen vorliegen. Deren Kapazität könnte ausreichen, um diesen Embryonen die Keimung zu gestatten und anschließend genügend 2,4-DB in 2,4-D umwandeln, um den Kümmerwuchs des *uox*-Keimlings zu verursachen. Dies würde bedeuten, dass *uox*-Embryonen mit einer ausreichenden Anzahl funktionaler Peroxisomen in den Hypokotylen prinzipiell keimungsfähig sind, sich jedoch nach erfolgter Keimung wegen des in den Kotyledonen viel ausgeprägteren Peroxisomendefekts ohne Zucker nicht etablieren könnten.

4.9 Ausblick

Abschließend folgen einige Überlegungen, welche Versuche in *Arabidopsis* die Zusammenhänge zwischen HS und dem *uox*-Phänotyp weiter aufklären könnten.

Eine negative Korrelation zwischen dem HS-Gehalt von Samen und ihrer Keimfähigkeit wird aufgrund von Vorversuchen vermutet, kann aber nicht statistisch gesichert belegt werden. Um dies schlüssig zu zeigen, könnte man versuchen, durch stabile Transformation Linien zu erzeugen, in denen mittels RNA-Interferenz die Expression von *UOX* unterschiedlich stark reduziert ist. Linien mit geringerer *UOX*-Expression sollten mehr HS in ihren Samen enthalten und schlechter keimen.

Für den peroxisomalen Defekt in *uox*-Embryonen sind zwei Ursachen denkbar, die mittelbar oder unmittelbar durch die HS-Akkumulation zustande kommen: i) Die Beeinträchtigung des PTS1-abhängigen Imports von Matrixproteinen und ii) das völlige Fehlen der Organellen, weil sie nach ihrer Schädigung durch Pexophagie abgebaut wurden.

Im ersten Falle sollte eine zeitgleich mit der HS-Akkumulation einsetzende, also unter der Kontrolle des *XDH*- oder *UOX*-Promotors stehende, verstärkte Expression von Frachtimport-Peroxinen oder -Rezeptoren den Importdefekt und den *uox*-Phänotyp abschwächen. Um zu untersuchen, ob HS die Peroxisomen durch oxidativen Stress schädigt, könnte man ein vergleichbares Konstrukt einführen, das zur vermehrten Expression von Katalase oder anderer antioxidativ wirkender Enzyme in Peroxisomen führt.

Falls Pexophagie wesentlich für den *uox*-Phänotyp verantwortlich ist, sollte die gezielte Ausschaltung oder Herunterregulierung von Autophagiegenen den Phänotyp mildern. Eine andere Möglichkeit, dies zu untersuchen, wäre der direkte Nachweis an Dünnschnitten älterer *uox*-Embryonen (nach 21 dpa) mit der Immunogold-Methode. Hierbei sollten spezifische Antikörper gegen Katalase und ein Protein wie ATG8 gerichtet sein, welches in der Membran der Autophagosomen lokalisiert ist (Eskelinen *et al.*, 2011; Li und Vierstra, 2012). Im TEM

sollten dann Stadien erkennbar sein, in denen Peroxisomen von Autophagosomen umschlossen sind.

Bislang ist offen, wie in *Arabidopsis* der Übergang von Peroxisomen zu Glyoxysomen (in der Samenentwicklung) und wieder von Glyoxysomen zu Peroxisomen (bei der Etablierung des Keimlings) verläuft. Es ist ungeklärt, in welchem Umfang der Abbau durch Pexophagie und Neubildung der Organellen aus dem ER dabei eine Rolle spielen oder ob alternativ diese funktionellen Umwandlungen allein durch die Modifikation der Enzymausstattung der Organellen erreicht wird. In dieser Hinsicht wäre es wünschenswert, schlüssige Immuno-Colokalisationsexperimente in *Arabidopsis* durchzuführen.

Dieser Ausblick schließt mit der Aufforderung, die hier vorgelegten Ergebnisse in anderen Pflanzenarten zu reproduzieren, um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt art- oder gattungsspezifisch ist. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass nach Verlust der UOX-Aktivität und einer Akkumulation von HS auch bei anderen Samenpflanzen, in denen es zu einer vergleichbar starken Austrocknung während der Samenreifung vorkommt, ein Peroxisomendefekt und daraus resultierend ein Keimungs- und Etablierungsdefekt auftritt.

5 Literatur

- Adham, A.R., Zolman, B.K., Millius, A. und Bartel, B. (2005). Mutations in Arabidopsis acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in beta-oxidation. Plant J **41**, 859-874.
- Ahmad, I., Larher, F. und Stewart, G.R. (1979). Sorbitol, a compatible osmotic solute in Plantago maritima. New Phytol 82, 671-678.
- Alonso-Blanco, C., Bentsink, L., Hanhart, C.J., Vries, H.B.-d. und Koornneef, M. (2003). Analysis of Natural Allelic Variation at Seed Dormancy Loci of Arabidopsis thaliana. Genetics 164, 711-729.
- Álvarez-Lario, B. und Macarrón-Vicente, J. (2010). Uric acid and evolution. Rheumatology 49, 2010-2015.
- Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E. und Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. Proc Natl Acad Sci U S A 78, 6858-6862.
- Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A.R. und Fait, A. (2010). Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. Trends in Plant Science 15, 211-218.
- Antonenkov, V.D. und Hiltunen, J.K. (2012). Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane. Biochimica et biophysica acta 1822, 1374-1386.
- Arai, Y., Hayashi, M. und Nishimura, M. (2008). Proteomic identification and characterization of a novel peroxisomal adenine nucleotide transporter supplying ATP for fatty acid beta-oxidation in soybean and Arabidopsis. Plant Cell 20, 3227-3240.
- **Baud, S. und Lepiniec, L.** (2010). Physiological and developmental regulation of seed oil production. Progress in lipid research **49**, 235-249.
- Baud, S., Boutin, J., Miquel, M., Lepiniec, L. und Rochat, C. (2002). An integrated overview of seed development in Arabidopsis thaliana ecotype WS. Plant Physiol Bioch 40, 151-160.
- **Baud, S., Dubreucq, B., Miquel, M., Rochat, C. und Lepiniec, L.** (2008). Storage Reserve Accumulation in Arabidopsis: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling. The Arabidopsis Book, e0113.
- Bernhardt, K., Wilkinson, S., Weber, A.P. und Linka, N. (2012). A peroxisomal carrier delivers NAD(+) and contributes to optimal fatty acid degradation during storage oil mobilization. Plant J 69, 1-13.
- Bewley, J.D. (1997). Seed Germination and Dormancy. The Plant Cell Online 9, 1055-1066.
- Breidenbach, R.W., Kahn, A. und Beevers, H. (1968). Characterization of Glyoxysomes From Castor Bean Endosperm. Plant Physiol 43, 705-713.
- Brychkova, G., Alikulov, Z., Fluhr, R. und Sagi, M. (2008). A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the Atxdh1 Arabidopsis mutant. Plant J 54, 496-509.

- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.F., Wu, S.H., Swidzinski, J., Ishizaki, K. und Leaver, C.J. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. Plant J 42, 567-585.
- Cao, F.Q., Werner, A.K., Dahncke, K., Romeis, T., Liu, L.H. und Witte, C.P. (2010). Identification and Characterization of Proteins Involved in Rice Urea and Arginine Catabolism. Plant Physiol **154**, 98-108.
- Chia, T.Y.P., Pike, M.J. und Rawsthorne, S. (2005). Storage oil breakdown during embryo development of Brassica napus (L.). J Exp Bot 56, 1285-1296.
- **Cooper, T.G. und Beevers, H.** (1969). β Oxidation in Glyoxysomes from Castor Bean Endosperm. Journal of Biological Chemistry **244**, 3514-3520.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Sandalio, L.M., Distefano, S., Palma, J.M., Lupianez, J.A. und Del Rio, L.A. (1998). A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. The Biochemical journal 330 (Pt 2), 777-784.
- Corry, D.B., Eslami, P., Yamamoto, K., Nyby, M.D., Makino, H. und Tuck, M.L. (2008). Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin-angiotensin system. Journal of hypertension **26**, 269-275.
- Cristini, S., Navone, S., Canzi, L., Acerbi, F., Ciusani, E., Hladnik, U., de Gemmis, P., Alessandri, G., Colombo, A., Parati, E. und Invernici, G. (2010). Human neural stem cells: a model system for the study of Lesch-Nyhan disease neurological aspects. Human molecular genetics **19**, 1939-1950.
- **Dahncke, K. und Witte, C.P.** (2013). Plant purine nucleoside catabolism employs a guanosine deaminase required for the generation of xanthosine in Arabidopsis. Plant Cell **25**, 4101-4109.
- Dave, A., Hernandez, M.L., He, Z.S., Andriotis, V.M.E., Vaistij, F.E., Larson, T.R. und Graham, I.A. (2011). 12-Oxo-Phytodienoic Acid Accumulation during Seed Development Represses Seed Germination in Arabidopsis. Plant Cell 23, 583-599.
- **de Duve, C. und Baudhuin, P.** (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). Physiological Reviews **46**, 323-357.
- del Rio, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M. und Barroso, J.B. (2003). Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. IUBMB life **55**, 71-81.
- Dietrich, D., Schmuths, H., De Marcos Lousa, C., Baldwin, J.M., Baldwin, S.A., Baker, A., Theodoulou, F.L. und Holdsworth, M.J. (2009). Mutations in the Arabidopsis peroxisomal ABC transporter COMATOSE allow differentiation between multiple functions in planta: insights from an allelic series. Molecular biology of the cell **20**, 530-543.
- **Eastmond, P.J. und Rawsthorne, S.** (2000). Coordinate Changes in Carbon Partitioning and Plastidial Metabolism during the Development of Oilseed Rape Embryos. Plant Physiol **122**, 767-774.
- Eastmond, P.J. und Graham, I.A. (2001). Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. Trends Plant Sci 6, 72-78.

- Eastmond, P.J., Germain, V., Lange, P.R., Bryce, J.H., Smith, S.M. und Graham, I.A. (2000). Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. Proceedings of the National Academy of Sciences **97**, 5669-5674.
- Edwards, K., Johnstone, C. und Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res **19**, 1349.
- Elser, J.J., Fagan, W.F., Subramanian, S. und Kumar, S. (2006). Signatures of Ecological Resource Availability in the Animal and Plant Proteomes. Molecular biology and evolution 23, 1946-1951.
- Erdmann, R. und Blobel, G. (1995). Giant peroxisomes in oleic acid-induced Saccharomyces cerevisiae lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. The Journal of cell biology **128**, 509-523.
- Eskelinen, E.-L., Reggiori, F., Baba, M., Kovács, A.L. und Seglen, P.O. (2011). Seeing is believing: The impact of electron microscopy on autophagy research. Autophagy 7, 935-956.
- Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Fernie, A.R. und Galili, G. (2006). Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. Plant Physiol 142, 839-854.
- Fan, J., Quan, S., Orth, T., Awai, C., Chory, J. und Hu, J. (2005). The Arabidopsis PEX12 gene is required for peroxisome biogenesis and is essential for development. Plant Physiol 139, 231-239.
- Farmer, L.M., Rinaldi, M.A., Young, P.G., Danan, C.H., Burkhart, S.E. und Bartel, B. (2013). Disrupting Autophagy Restores Peroxisome Function to an Arabidopsis lon2 Mutant and Reveals a Role for the LON2 Protease in Peroxisomal Matrix Protein Degradation. Plant Cell 25, 4085-4100.
- Footitt, S., Cornah, J.E., Pracharoenwattana, I., Bryce, J.H. und Smith, S.M. (2007). The Arabidopsis 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 (kat2-1) mutant exhibits increased flowering but reduced reproductive success. J Exp Bot 58, 2959-2968.
- Footitt, S., Marquez, J., Schmuths, H., Baker, A., Theodoulou, F.L. und Holdsworth, M. (2006). Analysis of the role of COMATOSE and peroxisomal beta-oxidation in the determination of germination potential in Arabidopsis. J Exp Bot **57**, 2805-2814.
- Fransen, M. (2012). Peroxisome Dynamics: Molecular Players, Mechanisms, and (Dys)functions. ISRN Cell Biology 2012, 1-24.
- Fuji, K., Shimada, T., Takahashi, H., Tamura, K., Koumoto, Y., Utsumi, S., Nishizawa, K., Maruyama, N. und Hara-Nishimura, I. (2007). Arabidopsis vacuolar sorting mutants (green fluorescent seed) can be identified efficiently by secretion of vacuole-targeted green fluorescent protein in their seeds. Plant Cell 19, 597-609.
- Fulda, M., Schnurr, J., Abbadi, A., Heinz, E. und Browse, J. (2004). Peroxisomal Acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in Arabidopsis thaliana. Plant Cell 16, 394-405.
- Gabison, L., Chiadmi, M., El Hajji, M., Castro, B., Colloc'h, N. und Prange, T. (2010). Nearatomic resolution structures of urate oxidase complexed with its substrate and analogues: the protonation state of the ligand. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography **66**, 714-724.

- Germain, V., Rylott, E.L., Larson, T.R., Sherson, S.M., Bechtold, N., Carde, J.P., Bryce, J.H., Graham, I.A. und Smith, S.M. (2001). Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid beta-oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of Arabidopsis seedlings. Plant J 28, 1-12.
- Gersch, C., Palii, S.P., Imaram, W., Kim, K.M., Karumanchi, S.A., Angerhofer, A., Johnson, R.J. und Henderson, G.N. (2009). Reactions of peroxynitrite with uric acid: formation of reactive intermediates, alkylated products and triuret, and in vivo production of triuret under conditions of oxidative stress. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids 28, 118-149.
- Giavalisco, P., Li, Y., Matthes, A., Eckhardt, A., Hubberten, H.M., Hesse, H., Segu, S., Hummel, J., Kohl, K. und Willmitzer, L. (2011). Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using (13) C, (15) N and (34) S isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry. Plant J 68, 364-376.
- Gil, R., Lull, C., Boscaiu, M., Bautista, I., Lidon, A. und Vicente, O. (2011). Soluble Carbohydrates as Osmolytes in Several Halophytes from a Mediterranean Salt Marsh. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca **39**, 9-17.
- **Goepfert, S. und Poirier, Y.** (2007). Beta-oxidation in fatty acid degradation and beyond. Curr Opin Plant Biol **10**, 245-251.
- Gootjes, J., Schmohl, F., Mooijer, P.A.W., Dekker, C., Mandel, H., Topcu, M., Huemer, M., von Schutz, M., Marquardt, T., Smeitink, J.A., Waterham, H.R. und Wanders, R.J.A. (2004).
 Identification of the molecular defect in patients with peroxisomal mosaicism using a novel method involving culturing of cells at 40 degrees C: Implications for other inborn errors of metabolism. Hum Mutat 24, 130-139.
- Goto, S., Mano, S., Nakamori, C. und Nishimura, M. (2011). Arabidopsis ABERRANT PEROXISOME MORPHOLOGY9 is a peroxin that recruits the PEX1-PEX6 complex to peroxisomes. Plant Cell 23, 1573-1587.
- Gottle, M., Burhenne, H., Sutcliffe, D. und Jinnah, H.A. (2013). Purine metabolism during neuronal differentiation: the relevance of purine synthesis and recycling. Journal of neurochemistry **127**, 805-818.
- **Gould, S.J., Keller, G.A. und Subramani, S.** (1988). Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. The Journal of cell biology **107**, 897-905.
- Goyal, K., Walton, L.J. und Tunnacliffe, A. (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. Biochem. J. 388, 151-157.
- Graham, I.A. (2008). Seed storage oil mobilization. Annu Rev Plant Biol 59, 115-142.
- Greenspan, P., Mayer, E.P. und Fowler, S.D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. The Journal of cell biology **100**, 965-973.
- Gruis, D., Schulze, J. und Jung, R. (2004). Storage Protein Accumulation in the Absence of the Vacuolar Processing Enzyme Family of Cysteine Proteases. The Plant Cell Online 16, 270-290.
- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M. und Nishimura, M. (1998). 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of Arabidopsis have defects in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation. Plant Cell 10, 183-195.

- Hayashi, M., Nito, K., Toriyama-Kato, K., Kondo, M., Yamaya, T. und Nishimura, M. (2000). AtPex14p maintains peroxisomal functions by determining protein targeting to three kinds of plant peroxisomes. Embo J 19, 5701-5710.
- Hayashi, M., Nito, K., Takei-Hoshi, R., Yagi, M., Kondo, M., Suenaga, A., Yamaya, T. und Nishimura, M. (2002). Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrates for fatty acid beta-oxidation. Plant & cell physiology 43, 1-11.
- Hesberg, C., Hansch, R., Mendel, R.R. und Bittner, F. (2004). Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from Arabidopsis thaliana: differential gene expression and enzyme activities. J Biol Chem 279, 13547-13554.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. und Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends Plant Sci 6, 431-438.
- Holdsworth, M.J., Bentsink, L. und Soppe, W.J. (2008). Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. New Phytol 179, 33-54.
- Hu, J., Aguirre, M., Peto, C., Alonso, J., Ecker, J. und Chory, J. (2002). A role for peroxisomes in photomorphogenesis and development of Arabidopsis. Science 297, 405-409.
- Hu, J.P., Baker, A., Bartel, B., Linka, N., Mullen, R.T., Reumann, S. und Zolman, B.K. (2012). Plant Peroxisomes: Biogenesis and Function. Plant Cell 24, 2279-2303.
- Huang, A.H. und Beevers, H. (1971). Isolation of microbodies from plant tissues. Plant Physiol 48, 637-641.
- Hummel, J., Segu, S., Li, Y., Irgang, S., Jueppner, J. und Giavalisco, P. (2011). Ultra performance liquid chromatography and high resolution mass spectrometry for the analysis of plant lipids. Frontiers in plant science 2, 54.
- Hundertmark, M. und Hincha, D.K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana. BMC genomics 9, 118.
- Ichida, K., Amaya, Y., Okamoto, K. und Nishino, T. (2012). Mutations associated with functional disorder of xanthine oxidoreductase and hereditary xanthinuria in humans. International journal of molecular sciences 13, 15475-15495.
- Imamura, A., Tsukamoto, T., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Imanaka, T., Fujiki, Y., Orii, T., Kondo, N. und Osumi, T. (1998). Temperature-sensitive phenotypes of peroxisomeassembly processes represent the milder forms of human peroxisome-biogenesis disorders. Am J Hum Genet 62, 1539-1543.
- Jimenez, A., Hernandez, J.A., Del Rio, L.A. und Sevilla, F. (1997). Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. Plant Physiol 114, 275-284.
- Jin, M., Yang, F., Yang, I., Yin, Y., Luo, J.J., Wang, H. und Yang, X.F. (2012). Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases. Frontiers in Bioscience-Landmark 17, 656-669.
- Jinnah, H.A. (2009). Lesch-Nyhan disease: from mechanism to model and back again. Disease Models & Mechanisms 2, 116-121.
- Jung, B., Hoffmann, C. und Mohlmann, T. (2011). Arabidopsis nucleoside hydrolases involved in intracellular and extracellular degradation of purines. Plant Journal 65, 703-711.

- Jung, B., Florchinger, M., Kunz, H.H., Traub, M., Wartenberg, R., Jeblick, W., Neuhaus, H.E. und Mohlmann, T. (2009). Uridine-Ribohydrolase Is a Key Regulator in the Uridine Degradation Pathway of Arabidopsis. Plant Cell **21**, 876-891.
- Jürgens, G. und Mayer, U. (1994). Arabidopsis. In: Bard, J. EMBRYOS. Color Atlas of Development. Wolfe Publishing, London, 7-21.
- Kanai, M., Nishimura, M. und Hayashi, M. (2010). A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of ABI5. Plant J 62, 936-947.
- Kelly, A.A., Quettier, A.L., Shaw, E. und Eastmond, P.J. (2011). Seed storage oil mobilization is important but not essential for germination or seedling establishment in Arabidopsis. Plant Physiol 157, 866-875.
- Khan, B.R. und Zolman, B.K. (2010). pex5 Mutants That Differentially Disrupt PTS1 and PTS2 Peroxisomal Matrix Protein Import in Arabidopsis. Plant Physiol **154**, 1602-1615.
- Kim, J., Lee, H., Lee, H.N., Kim, S.H., Shin, K.D. und Chung, T. (2013). Autophagy-Related Proteins Are Required for Degradation of Peroxisomes in Arabidopsis Hypocotyls during Seedling Growth. Plant Cell 25, 4956-4966.
- Koornneef, M., Bentsink, L. und Hilhorst, H. (2002). Seed dormancy and germination. Curr Opin Plant Biol 5, 33-36.
- Kunz, H.H., Scharnewski, M., Feussner, K., Feussner, I., Flugge, U.I., Fulda, A. und Gierth, M. (2009). The ABC Transporter PXA1 and Peroxisomal beta-Oxidation Are Vital for Metabolism in Mature Leaves of Arabidopsis during Extended Darkness. Plant Cell 21, 2733-2749.
- Kunze, M. und Hartig, A. (2013). Permeability of the peroxisomal membrane: lessons from the glyoxylate cycle. Frontiers in physiology 4, 204.
- Kunze, M., Pracharoenwattana, I., Smith, S.M. und Hartig, A. (2006). A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. Biochimica et biophysica acta 1763, 1441-1452.
- Lamberto, I., Percudani, R., Gatti, R., Folli, C. und Petrucco, S. (2010). Conserved Alternative Splicing of Arabidopsis Transthyretin-Like Determines Protein Localization and S-Allantoin Synthesis in Peroxisomes. Plant Cell 22, 1564-1574.
- Lee, N.G., Stein, B., Suzuki, H. und Verma, D.P.S. (1993). Expression of Antisense Nodulin-35 Rna in Vigna-Aconitifolia Transgenic Root-Nodules Retards Peroxisome Development and Affects Nitrogen Availability to the Plant. Plant Journal **3**, 599-606.
- Li, F. und Vierstra, R.D. (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. Trends Plant Sci 17, 526-537.
- Li, Q., Liu, J., Tan, D., Allan, A., Jiang, Y., Xu, X., Han, Z. und Kong, J. (2013). A Genome-Wide Expression Profile of Salt-Responsive Genes in the Apple Rootstock Malus zumi. International journal of molecular sciences 14, 21053-21070.
- Lingard, M.J., Monroe-Augustus, M. und Bartel, B. (2009). Peroxisome-associated matrix protein degradation in Arabidopsis. P Natl Acad Sci USA 106, 4561-4566.

- Linka, N., Theodoulou, F.L., Haslam, R.P., Linka, M., Napier, J.A., Neuhaus, H.E. und Weber, A.P. (2008). Peroxisomal ATP import is essential for seedling development in Arabidopsis thaliana. Plant Cell **20**, 3241-3257.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L. und Fernie, A.R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. Nature protocols 1, 387-396.
- Luedemann, A., Strassburg, K., Erban, A. und Kopka, J. (2008). TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography--mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. Bioinformatics 24, 732-737.
- Luk, A.J. und Simkin, P.A. (2005). Epidemiology of hyperuricemia and gout. The American journal of managed care 11, S435-442; quiz S465-438.
- Mano, S., Nakamori, C., Nito, K., Kondo, M. und Nishimura, M. (2006). The Arabidopsis pex12 and pex13 mutants are defective in both PTS1- and PTS2-dependent protein transport to peroxisomes. Plant J 47, 604-618.
- Mansfield, S.G. und Briarty, L.G. (1992). Cotyledon cell development in Arabidopsis thaliana during reserve deposition. Canadian Journal of Botany 70, 151-164.
- Matschi, S., Werner, S., Schulze, W.X., Legen, J., Hilger, H.H. und Romeis, T. (2013). Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of Arabidopsis thaliana in plant stem elongation and vascular development. Plant Journal 73, 883-896.
- Meyer, A.J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J.P. und Hell, R. (2007). Redox-sensitive GFP in Arabidopsis thaliana is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. Plant J **52**, 973-986.
- Muraoka, S. und Miura, T. (2003). Inhibition by uric acid of free radicals that damage biological molecules. Pharmacology & toxicology 93, 284-289.
- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshiba, T., Kamiya, Y. und Nambara, E. (2005). Genome-wide profiling of stored mRNA in Arabidopsis thaliana seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. Plant J **41**, 697-709.
- Nambara, E. und Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annu Rev Plant Biol 56, 165-185.
- Nishimura, M., Takeuchi, Y., Bellis, L. und Hara-Nishimura, I. (1993). Leaf peroxisomes are directly transformed to glyoxysomes during senescence of pumpkin cotyledons. Protoplasma 175, 131-137.
- Nishimura, M., Yamaguchi, J., Mori, H., Akazawa, T. und Yokota, S. (1986). Immunocytochemical Analysis Shows that Glyoxysomes Are Directly Transformed to Leaf Peroxisomes during Greening of Pumpkin Cotyledons. Plant Physiol **81**, 313-316.
- Nishimura, M., Hayashi, M., Kato, A., Yamaguchi, K. und Mano, S. (1996). Functional transformation of microbodies in higher plant cells. Cell structure and function 21, 387-393.
- Nito, K., Kamigaki, A., Kondo, M., Hayashi, M. und Nishimura, M. (2007). Functional classification of Arabidopsis peroxisome biogenesis factors proposed from analyses of knockdown mutants. Plant & cell physiology **48**, 763-774.

- Nonogaki, H., Bassel, G.W. und Bewley, J.D. (2010). Germination—Still a mystery. Plant Science 179, 574-581.
- Nordgren, M., Wang, B., Apanasets, O. und Fransen, M. (2013). Peroxisome degradation in mammals: mechanisms of action, recent advances, and perspectives. Frontiers in physiology 4, 145.
- Nyathi, Y. und Baker, A. (2006). Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. Biochimica et biophysica acta 1763, 1478-1495.
- Oda, M., Satta, Y., Takenaka, O. und Takahata, N. (2002). Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. Molecular biology and evolution 19, 640-653.
- **Otegui, M.S., Capp, R. und Staehelin, L.A.** (2002). Developing seeds of Arabidopsis store different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum. Plant Cell **14**, 1311-1327.
- Pinfield-Wells, H., Rylott, E.L., Gilday, A.D., Graham, S., Job, K., Larson, T.R. und Graham, I.A. (2005). Sucrose rescues seedling establishment but not germination of Arabidopsis mutants disrupted in peroxisomal fatty acid catabolism. Plant J 43, 861-872.
- Platta, H.W. und Erdmann, R. (2007). The peroxisomal protein import machinery. FEBS letters 581, 2811-2819.
- **Pracharoenwattana, I. und Smith, S.M.** (2008). When is a peroxisome not a peroxisome? Trends in plant science **13**, 522-525.
- Pracharoenwattana, I., Cornah, J.E. und Smith, S.M. (2007). Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in beta-oxidation but not in the glyoxylate cycle. Plant J 50, 381-390.
- Pritchard, S.L., Charlton, W.L., Baker, A. und Graham, I.A. (2002). Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis. Plant J **31**, 639-647.
- Ramon, N.M. und Bartel, B. (2010). Interdependence of the peroxisome-targeting receptors in Arabidopsis thaliana: PEX7 facilitates PEX5 accumulation and import of PTS1 cargo into peroxisomes. Molecular biology of the cell **21**, 1263-1271.
- Reumann, S., Ma, C., Lemke, S. und Babujee, L. (2004). AraPerox. A Database of Putative Arabidopsis Proteins from Plant Peroxisomes. Plant Physiol **136**, 2587-2608.
- **Rhodin, J.** (1954). "Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal tubule cells of the mouse kidney". Doctorate Thesis, Karolinksa Institutet Stockholm. Doctorate Thesis, Karolinska Institutet Stockholm.
- **Riegler, H., Geserick, C. und Zrenner, R.** (2011). Arabidopsis thaliana nucleosidase mutants provide new insights into nucleoside degradation. New Phytol **191**, 349-359.
- Rock, K.L., Kataoka, H. und Lai, J.J. (2013). Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. Nat Rev Rheumatol 9, 13-23.
- Rokka, A., Antonenkov, V.D., Soininen, R., Immonen, H.L., Pirila, P.L., Bergmann, U., Sormunen, R.T., Weckstrom, M., Benz, R. und Hiltunen, J.K. (2009). Pxmp2 is a channelforming protein in Mammalian peroxisomal membrane. PloS one **4**, e5090.

- Rosenwasser, S., Rot, I., Sollner, E., Meyer, A.J., Smith, Y., Leviatan, N., Fluhr, R. und Friedman, H. (2011). Organelles Contribute Differentially to Reactive Oxygen Species-Related Events during Extended Darkness. Plant Physiol **156**, 185-201.
- **Rouiller, C.** (1956). Microbodies and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology **2**, 355-360.
- Rylott, E.L., Eastmond, P.J., Gilday, A.D., Slocombe, S.P., Larson, T.R., Baker, A. und Graham, I.A. (2006). The Arabidopsis thaliana multifunctional protein gene (MFP2) of peroxisomal beta-oxidation is essential for seedling establishment. Plant J **45**, 930-941.
- Sanchez-Lozada, L.G., Lanaspa, M.A., Cristobal-Garcia, M., Garcia-Arroyo, F., Soto, V., Cruz-Robles, D., Nakagawa, T., Yu, M.A., Kang, D.H. und Johnson, R.J. (2012). Uric acid-induced endothelial dysfunction is associated with mitochondrial alterations and decreased intracellular ATP concentrations. Nephron. Experimental nephrology 121, e71-78.
- Santos, C.X., Anjos, E.I. und Augusto, O. (1999). Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. Archives of biochemistry and biophysics **372**, 285-294.
- Sautin, Y.Y. und Johnson, R.J. (2008). Uric Acid: The Oxidant-Antioxidant Paradox. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 27, 608-619.
- Sautter, C. (1986). Microbody transition in greening watermelon cotyledons Double immunocytochemical labeling of isocitrate lyase and hydroxypyruvate reductase. Planta 167, 491-503.
- Scharnberg, J. (2010). "Charakterisierung einer Arabidopsis thaliana uricase-Mutante". Diplomarbeit, Freie Universität Berlin.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D. und Lohmann, J.U. (2005). A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. Nat Genet 37, 501-506.
- Scholthof, H.B. (1999). Rapid delivery of foreign genes into plants by direct rub-inoculation with intact plasmid DNA of a tomato busby stunt virus gene vector. J Virol **73**, 7823-7829.
- Schrader, M. und Fahimi, H.D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. Biochimica et biophysica acta 1763, 1755-1766.
- Schubert, K.R. (1986). Products of Biological Nitrogen-Fixation in Higher-Plants Synthesis, Transport, and Metabolism. Annu Rev Plant Phys **37**, 539-574.
- Schumann, U., Wanner, G., Veenhuis, M., Schmid, M. und Gietl, C. (2003). AthPEX10, a nuclear gene essential for peroxisome and storage organelle formation during Arabidopsis embryogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 9626-9631.
- Schwarzlander, M., Fricker, M.D., Muller, C., Marty, L., Brach, T., Novak, J., Sweetlove, L.J., Hell, R. und Meyer, A.J. (2008). Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. Journal of microscopy 231, 299-316.
- Scott, G.S. und Hooper, D.C. (2001). The role of uric acid in protection against peroxynitritemediated pathology. Medical hypotheses 56, 95-100.

- Seo, M., Nambara, E., Choi, G. und Yamaguchi, S. (2009). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. Plant molecular biology **69**, 463-472.
- Shi, Y., Evans, J.E. und Rock, K.L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. Nature 425, 516-521.
- Shibata, M., Oikawa, K., Yoshimoto, K., Kondo, M., Mano, S., Yamada, K., Hayashi, M., Sakamoto, W., Ohsumi, Y. und Nishimura, M. (2013). Highly Oxidized Peroxisomes Are Selectively Degraded via Autophagy in Arabidopsis. Plant Cell 25, 4967-4983.
- Shimada, T., Fuji, K., Tamura, K., Kondo, M., Nishimura, M. und Hara-Nishimura, I. (2003a). Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in Arabidopsis thaliana. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, 16095-16100.
- Shimada, T., Yamada, K., Kataoka, M., Nakaune, S., Koumoto, Y., Kuroyanagi, M., Tabata, S., Kato, T., Shinozaki, K., Seki, M., Kobayashi, M., Kondo, M., Nishimura, M. und Hara-Nishimura, I. (2003b). Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in Arabidopsis thaliana. J Biol Chem 278, 32292-32299.
- Siloto, R.M., Findlay, K., Lopez-Villalobos, A., Yeung, E.C., Nykiforuk, C.L. und Moloney, M.M. (2006). The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in Arabidopsis. Plant Cell 18, 1961-1974.
- Sliwinska, E., Bassel, G.W. und Bewley, J.D. (2009). Germination of Arabidopsis thaliana seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. J Exp Bot 60, 3587-3594.
- Sparkes, I.A., Brandizzi, F., Slocombe, S.P., El-Shami, M., Hawes, C. und Baker, A. (2003). An Arabidopsis pex10 null mutant is embryo lethal, implicating peroxisomes in an essential role during plant embryogenesis. Plant Physiol **133**, 1809-1819.
- **Spurr, A.R.** (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Journal of ultrastructure research **26**, 31-43.
- Steinberg, S.J., Dodt, G., Raymond, G.V., Braverman, N.E., Moser, A.B. und Moser, H.W. (2006). Peroxisome biogenesis disorders. Bba-Mol Cell Res **1763**, 1733-1748.
- Swinkels, B.W., Gould, S.J., Bodnar, A.G., Rachubinski, R.A. und Subramani, S. (1991). A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. Embo J 10, 3255-3262.
- **Theodoulou, F.L. und Eastmond, P.J.** (2012). Seed storage oil catabolism: a story of give and take. Curr Opin Plant Biol **15**, 322-328.
- Titus, D.E. und Becker, W.M. (1985). Investigation of the glyoxysome-peroxisome transition in germinating cucumber cotyledons using double-label immunoelectron microscopy. The Journal of cell biology **101**, 1288-1299.
- Todd, C.D. und Polacco, J.C. (2006). AtAAH encodes a protein with allantoate amidohydrolase activity from Arabidopsis thaliana. Planta 223, 1108-1113.
- Tolbert, N.E., Oeser, A., Kisaki, T., Hageman, R.H. und Yamazaki, R.K. (1968). Peroxisomes from Spinach Leaves Containing Enzymes Related to Glycolate Metabolism. Journal of Biological Chemistry 243, 5179-5184.

- Torres, R., Puig, J. und Jinnah, H.A. (2012). Update on the Phenotypic Spectrum of Lesch-Nyhan Disease and its Attenuated Variants. Curr Rheumatol Rep 14, 189-194.
- **Trelease, R.N., Becker, W.M., Gruber, P.J. und Newcomb, E.H.** (1971). Microbodies (Glyoxysomes and Peroxisomes) in Cucumber Cotyledons: Correlative Biochemical and Ultrastructural Study in Light- and Dark-grown Seedlings. Plant Physiol **48**, 461-475.
- van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U.I. und Kunze, R. (2006). Transcription analysis of arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. Plant Physiol 141, 776-792.
- Vigil, E.L. (1970). Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. The Journal of cell biology **46**, 435-454.
- Wain, R.L. und Wightman, F. (1954). The growth regulating activity of certain omega-substituted alkyl carboxylic acids in relation to their beta-oxidation within the plant. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain) 142, 525-536.
- Wanner, G., Vigil, E.L. und Theimer, R.R. (1982). Ontogeny of Microbodies (Glyoxysomes) in Cotyledons of Dark-Grown Watermelon (Citrullus-Vulgaris Schrad) Seedlings - Ultrastructural Evidence. Planta 156, 314-325.
- Watanabe, S., Kang, D.-H., Feng, L., Nakagawa, T., Kanellis, J., Lan, H., Mazzali, M. und Johnson, R.J. (2002). Uric Acid, Hominoid Evolution, and the Pathogenesis of Salt-Sensitivity. Hypertension 40, 355-360.
- Waterham, H.R. und Ebberink, M.S. (2012). Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. Biochimica et biophysica acta 1822, 1430-1441.
- Weitbrecht, K., Muller, K. und Leubner-Metzger, G. (2011). First off the mark: early seed germination. J Exp Bot 62, 3289-3309.
- Werner, A.K. (2012). "Biochemische und physiologische Charakterisierung des pflanzlichen Purinabbaus". Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Werner, A.K. und Witte, C.P. (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. Trends in Plant Science 16, 381-387.
- Werner, A.K., Romeis, T. und Witte, C.P. (2010). Ureide catabolism in Arabidopsis thaliana and Escherichia coli. Nature Chemical Biology 6, 19-21.
- Werner, A.K., Sparkes, I.A., Romeis, T. und Witte, C.P. (2008). Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from Arabidopsis and soybean. Plant Physiol **146**, 418-430.
- Werner, A.K., Medina-Escobar, N., Zulawski, M., Sparkes, I.A., Cao, F.Q. und Witte, C.P. (2013). The Ureide-Degrading Reactions of Purine Ring Catabolism Employ Three Amidohydrolases and One Aminohydrolase in Arabidopsis, Soybean, and Rice. Plant Physiol **163**, 672-681.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. und Provart, N.J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. PloS one 2, e718.

- Wu, X., Wakamiya, M., Vaishnav, S., Geske, R., Montgomery, C., Jr., Jones, P., Bradley, A. und Caskey, C.T. (1994). Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 742-746.
- Wu, X.W., Muzny, D.M., Lee, C.C. und Caskey, C.T. (1992). Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. Journal of molecular evolution **34**, 78-84.
- Yesbergenova, Z., Yang, G., Oron, E., Soffer, D., Fluhr, R. und Sagi, M. (2005). The plant Mohydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. Plant J 42, 862-876.
- **Zolman, B.K., Silva, I.D. und Bartel, B.** (2001). The Arabidopsis pxa1 mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. Plant Physiol **127**, 1266-1278.
- Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U. und Boldt, R. (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. Annu Rev Plant Biol 57, 805-836.
- Zrenner, R., Riegler, H., Marquard, C.R., Lange, P.R., Geserick, C., Bartosz, C.E., Chen, C.T. und Slocum, R.D. (2009). A functional analysis of the pyrimidine catabolic pathway in Arabidopsis. New Phytol 183, 117-132.

6 Anhang

6.1 Alle mittels GC-MS identifizierten Metaboliten

In der Abbildung 6.1 sind alle mittels GC-MS identifizierten Metaboliten nach Stoffklassen oder Stoffwechselwegen geordnet dargestellt. Dabei steht ein bestimmtes Symbol (●, ■, □, ▲ und ◆) immer für dieselbe Probe in allen Diagrammen. Diese Darstellung wurde gewählt, um das Profil jeder einzelnen Probe sichtbar zu machen. Die normalisierte Signalstärke für jeden Metaboliten wurde als Maß für seinen Gehalt in der Probe angenommen.



Diese und nächste Seite **Abbildung 6.1: Übersicht der mittels GC-MS identifizierten Primärmetaboliten.** *uox* (rot), n=5; Wildtyp (schwarz), n=4; *xdh uox* (blau), n=5. Jedes Symbol steht für eine Samenprobe.



Anhang

6.2 Alle Spezies der Lipidanalyse im Detail

Für die detaillierte Ansicht der Lipidklassen in Abb. 6.2 wurde der Farbcode aus der GC-MS-Analyse beibehalten. Die Symbole (\blacksquare , \blacktriangle , \blacktriangledown) bezeichnen jeweils das arithmetische Mittel, die Fehlerbalken die Standardabweichung. Die gemessene Signalstärke wurde für jede Lipidspezies als Maß für ihren Gehalt in der Probe angenommen.

Die *uox*-Samenproben sind in ihrem Lipidgehalt charakteristisch gegenüber dem Wildtyp und *xdh uox* verändert. Einem Überschuss vor allem an ungesättigten FS steht ein Defizit an Glycerophospholipiden und kurzkettigen TAG gegenüber.

Fettsäuren

Die Signalstärke für FS nimmt in der Reihenfolge $uox \rightarrow Wildtyp \rightarrow xdh uox$ -Samen ab. In uox ist die Reihenfolge der häufigsten Spezies (18:2 > 18:3 > 20:1 > 18:1) jedoch regelrecht. uox enthält deutlich mehr längerkettige ungesättigte FS (18-26) als der Wildtyp und xdh uox, die sich darin nicht voneinander unterscheiden. Mit zunehmender Kettenlänge nehmen die Unterschiede zwischen Wildtyp und xdh uox bei den ungesättigten FS ab, bei den gesättigten gilt das für alle Genotypen: Während für 16:0 noch deutliche Unterschiede bestehen, ist der Gehalt an 24:0 und 26:0 für alle Genotypen gleich.

Glycerolipide

Bei den Glycerophospholipiden ist die gefundene Signalstärke grundsätzlich umgekehrt wie bei den FS, nämlich *xdh uox-* \rightarrow Wildtyp- \rightarrow *uox*-Samen. Tendenziell nehmen die Unterschiede zwischen den Genotypen mit dem Grad der Sättigung zu.

Von den in Chloroplasten vorkommenden Lipiden waren Monogalaktosyl-Diacylglyceride sowie Phaeophytin (Chlorophyll a-Gerüst) in *uox-* und *xdh uox-*Samen signifikant erhöht.

Triacylglyceride

Die Gehalte an TAG sind in *uox*-Samen nach einem bestimmten Muster verändert: Bei den TAG mit kürzeren FS nimmt die relative Häufigkeit ab, wenn mehr Doppelbindungen vorhanden sind, bei den längerkettigen TAG ist das Muster gegenläufig, d.h. mit zunehmender Sättigung nehmen die Gehalte der *uox*-Samen zu, jeweils verglichen mit Wildtyp- und *xdh uox*-Samen, die sich generell nicht unterscheiden.

Anhang

Diese und nächste Seite

Abbildung 6.2: Übersicht aller Spezies der Lipidanalyse.

uox (rot), n=5; Wildtyp (schwarz), n=5, *xdh uox* (blau), n=4. Farbige Symbole bezeichnen das arithmetische Mittel, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. FA, freie Fettsäuren; PC, Phosphatidylcholin; PE, Phosphatidylethanolamin; PG, Phosphatidylglycerol; PI, Phosphatidylinositol; TAG, Triacylglycerol; MGDG, Monogalaktosyl Diacylglycerol; DGDG, Digalaktosyl Diacylglycerol.




6.3 PCR-Primer

Primer Nr.	Sequenz
403	AGAATTCAAAATGTTACGTCCTGTAGAAAC
438	ACCCGGGTTATTGTTTGCCTCCCTGCTG
448	ATATTGACCATCATACTCATTGC
N61	TGGTTCACGTAGTGGGCCATC
1233	AGTAGAGCTAGTCCTCCAATACCG
1823	TTCCATGGCACAAGAAGCCGATG
1824	TTCCCGGGTCATAGTTTCGAGGTTATACGGC
1825	TTGGCGCGCCGACGAGCTAGAAGAGTTTCACG
1826	TTGAATTCTCTAAGTAACCTTATCAAACCAAATTG
1886	GATACAAGGCGAAATCGATCTTC
1968	GCAAAAGATTTCTTCCTCGGT
1969	GCACTTTGCTTAGCACAAAGGC
2604	TCATATGGGGATTACCTGGTATAGACC
2626	AGATATCGACATTATGAGAAACCCATAAG

 Tabelle 6.1: Sequenzen der verwendeten Primer.

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Claus-Peter Witte für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit durchzuführen, für die gute Betreuung durch ihn während dieser Zeit sowie die zahlreichen Anregungen und Diskussionen über das Projekt. Frau Prof. Dr. Tina Romeis danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und beiden zusammen für die Bereitstellung aller Materialien und der Infrastruktur im Labor.

Weiter möchte ich mich bedanken bei

meinen Kollegen in der AG Witte und der AG Romeis sowie allen anderen Mitarbeitern im Haus für die gute Zusammenarbeit,

Dr. Britta Ehlers (FU Berlin, jetzt MPI Potsdam-Golm) für ihre Hilfe mit den GC-MS-Analysen,

Dr. Patrick Giavalisco (MPI Potsdam-Golm) für die von ihm durchgeführte Lipidanalytik, Dr. Philipp Schulz (AG Romeis) für das kritische Lesen und Kommentieren dieser Arbeit, Jana Scharnberg für ihre Vorarbeiten an der Urat-Oxidase-Mutante,

Herrn Prof. em. Dr. Klaus Hausmann, Frau Dr. Renate Radek und Frau Regina Kollmann (alle FU Berlin) für die gute Zusammenarbeit und die Betreuung bei der TEM und anderen mikroskopischen Arbeiten,

Herrn Prof. Dr. Gerhard Wanner, Frau Silvia Dobler und Frau Jennifer Grünert (alle Biozentrum der LMU München) für die zytochemischen und elektronenmikroskopischen Arbeiten, die sie in ihrer Arbeitsgruppe durchgeführt haben,

den Mitarbeitern in der Angewandten Genetik (FU Berlin) für die Möglichkeit der Nutzung des konfokalen Mikroskops und sonstiger Optik,

Dr. Maik Böhmer (Universität Münster) für sein Protokoll zur Analyse der Samenproteine,Dr. Florian Bittner (TU Braunschweig), Prof. Dr. Andreas Meyer (Universität Bonn), Prof.Dr. Bonnie Bartel (Rice University in Houston/Texas) und Dr. Bethany K. Zolman (University of Missouri in St. Louis) für die Überlassung von transgenen Linien.