Schlüsselenzyme der Phyllochinon (Vitamin K₁)- und Salicylat-Biosynthese in *Arabidopsis thaliana*

vorgelegt von Antje Lohmann Dipl. Ing. Studiengang Biotechnologie

zur Erlangung des akademischen Grades Dr. Ing.

eingereicht an der Fakultät III, Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin Institut für Biotechnologie Fachgebiet Mikrobiologie und Genetik

angefertigt am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam

Genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Roland Lauster Erster Gutachter: Prof. Dr. Peter Dörmann Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ulf Stahl

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 08.08.2008

Berlin 2008 D 83

Man kann viel, wenn man sich nur recht viel zutraut.

Alexander Freiherr von Humboldt (1769-1859)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	. III
Tabellenverzeichnis	<i>IV</i>
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Prenyllipide	1
1.2 Strukturen und Vorkommen von Phyllochinon	2
 1.3 Biosynthese und Funktion von Phyllochinon 1.3.1 Der Biosyntheseweg des Phyllochinon 1.3.2 Die Bedeutung von Phyllochinon für den Menschen 1.3.3 Die Rolle von Phyllochinon in höheren Pflanzen 	 4 4 7 9
1.4 Die Biosynthese von Phyllochinon und Salicylat sind miteinander verknüpft	11
1.5 Zielsetzung	13
2 Materialien und Methoden	. 15
2.1 Geräte	15
2.2 Materialien	16
2.3 Synthetische Oligonukleotide	18
2.4 Vektoren und Konstrukte	19
2.5 Bakterienstämme	21
2.6 Sequenzierungen	21
2.7 Anzucht von Arabidonsis thaliana	21
2.8 Molekularhiologische Methoden	·· 22
2.8.1 Isolierung genomischer DNA aus Blättern	22
2.8.2 Northern Blot Analyse	22
2.8.3 Southern Blot Analyse	23
2.8.4 Western Blot Analyse	24 24
2.8.6 Biolistische Transformation von <i>Arabidopsis</i> -Blättern	25
2.8.7 Real-Time PCR	25
2.9 Biochemische Methoden	26
2.9.1 Bestimmung des Phyllochinongehalts	26
2.9.2 Bestimmung photosynthetischer Pigmente	28
2.9.4 Tocopherolbestimmung	32
2.9.5 Anthocyaninbestimmung	33
2.9.6 Chlorophyllbestimmung	33
2.9.7 Charakterisierung des Photosyntheseapparates	33
2.9.8 [1- ³ H]-Phytol-Fütterung.	36
2.9.9 Isolierung und Lipidanalysen von Chloroplastenfraktionen	36

3 Ergebnisse	. 38
3.1 Die Isochorismatsynthase ist ein kritischer Schritt für die Phyllochinon- und	20
3 1 1 Isoliarung dar phyllochinonfraian Donnalmutanta <i>iaslias</i> ?	. 30
3.1.2 Überexpression der verkürzten ICS-Domäne PHYLLO-ICS führt nicht zur Komplementation <i>ics1</i>	von 42
3.1.3 Salicylatbestimmung in der Doppelmutante <i>ics1ics2</i>	43
3.2 Charakterisierung der Phyllochinon defizienten AtmenG-Mutante	. 48
3.2.1 Isolierung und Komplementation der AtmenG-Mutante	48
3.2.2 [1- ³ H]-Phytol wird in Prenylchinone eingebaut	50
3.2.3 Das Protein AtmenG ist in Chloroplasten lokalisiert	52
3.2.4 Die Verteilung von Phyllochinon und PNQ in subplastidären Fraktionen	53
3.2.5 Nach Hochlichtstress ist der Anthocyaningehalt in <i>AtmenG</i> gegenüber dem Wildtyp verändert 3.2.6 Chlorophyll- und Pigmentgehalte sind nach Hochlichtstress verändert	. 55 . 59
3.2.7 Hochlichtstress beeinflusst die Stabilität und Aktivität von Photosystem I und II in der Mutant <i>AtmenG</i> stärker als im Wildtyp	e 62
4 Diskussion	. 69
4.1 Phyllochinon wird ausschließlich über den Isochorismatsynthase-Weg gebildet, nich	t
A 1 1 Die Doppelmutante <i>icsLics</i> ? ist phyllochinonfrei und nicht photoautotroph	- UJ 69
4.1.1 Die verkijrzte ICS-Domäme PHYLLO-ICS ist funktionell nicht aktiv	
4.1.3 Die Isochorismatsynthase 2 ist ebenfalls an der Salicylathiosynthese beteiligt	71
4.1.4 Warum existieren in <i>Arabidopsis</i> zwei Isochorismatsynthasen?	73
4.2 Die Phyllochinonmethylierung ist notwendig für ein einwandfreies Funktionieren de	s s
A 2.1 Der Phänotyn von AtmenG kann durch Transformation der Atl g23360-cDNA komplementier	. 74
werden	. 74
4.2.2 Die Plastoglobuli sind Speicher für überschüssiges Phyllochinon und PNO	76
4.2.3 In der Mutante AtmenG ist die Anthocyanin-Biosynthese beeinträchtigt	77
4.2.4 Hochlicht induziert den Xanthophyllzyklus in AtmenG stärker	79
4.2.5 Bedeutung der Methylierung von Phyllochinon für die Photosynthese	80
5 Zusammenfassung	. 83
6 Ausblick - Möglichkeiten zur Erhöhung des Phyllochinongehalts in Nutzpflanzen a	m
Beispiel aer Tomate	. 85
7 Literaturverzeichnis	. 90
8 Anhang	100
Danksagung	112

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vertreter "reiner" und "gemischter" Prenyllipide	2
Abb. 2: Chemische Strukturen verschiedener Vitamin-K-Formen	3
Abb. 3: Phyllochinon-Biosyntheseweg in höheren Pflanzen und Cyanobakterien	6
Abb. 4: Schematische Darstellung der Vitamin K_1 abhängigen γ -Carboxylierungsreaktion	8
Abb. 5: Schematische Darstellung des Elektronenflusses durch die Photosysteme	. 10
Abb. 6: Biosynthesewege von Salicylat	. 11
Abb. 7: Schematische Darstellung des Konstruktes pCL60-AtmenG	. 20
Abb. 8: Schematische Darstellung des Konstruktes pBinAR-AtmenG	. 20
Abb. 9: Schematische Darstellung des Konstruktes pBinAR-PHYLLO-ICS	. 20
Abb. 10: Chromatografische Trennung von Vitamin K ₁ und K ₂	. 28
Abb. 11: Chromatografische Trennung photosynthetischer Pigmente	. 30
Abb. 12: Chromatographische Auftrennung von o-Anisinsäure und Salicylat	. 31
Abb. 13: Bestimmung des PSI-Gehalts mittels Differenzabsorptionsspektroskopie	. 35
Abb. 14: Screening nach einer doppelt homozygoten Isochorismat-Mutanten ics1ics2	. 41
Abb. 15: Struktur des Gens PHYLLO (Schematische Darstellung)	. 42
Abb. 16: Überexpression von PHYLLO-ICS in <i>ics1</i> führt nicht zur Komplementation	. 43
Abb. 17: Salicylatquantifizierung in Wildtyp und <i>ics1ics2</i> mittels HPLC	. 45
Abb. 18: Typisches Zerfallsmuster von silyliertem Salicylat	. 46
Abb. 19: Einzelionen-Aufzeichnung und Massenspektren von Salicylatextrakten	. 46
Abb. 20: Salicylatgehalt in den Isochorismatsynthase-Mutanten	. 47
Abb. 21: Northern Blot Analyse von At1g23360 in WT, AtmenG und AtmenG + At1g23360	. 49
Abb. 22: Phyllochinonquantifizierung in WT, <i>AtmenG</i> und <i>AtmenG</i> + At1g23360	. 50
Abb. 23: Inkorporation von [1- ³ H]-Phytol in Prenylchinone	. 51
Abb. 24: GFP-Lokalisation von AtmenG in Blattepidermiszellen von Arabidopsis	. 52
Abb. 25: Verteilung von Phyllochinon und PNQ in Chloroplastenfraktionen von WT und Atmen	G
	. 54
Abb. 26: Verminderte Anthocyaninakkumulation und Chalkonsynthase-Expression in AtmenG nach Hochlichtstress	. 56
Abb. 27: Schematische Darstellung des Anthocyanin-Biosyntheseweges	. 57
Abb. 28: Relative Expression von Genen der Anthocyanin-Biosynthese nach Hochlichtstress	. 58
Abb. 29: Chlorophyllgehalt und Chlorophyll-a/b-Verhältnis vor und nach Hochlichtstress	. 60
Abb. 30: Pigmentgehalte vor und nach Hochlichtstress	. 61
Abb. 31: Tocopherolgehalte in WT, AtmenG und AtmenG + At1g23360	. 62
Abb. 32: Western Blot von Untereinheiten des Photosyntheseapparates	. 63
Abb. 33: Elektronentransportrate des Photosystems I	. 64

Abb. 34: Gehalte verschiedener Komponenten des Photosyntheseapparates vor und nach	65
	05
Abb. 35: 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Thylakoiden	66
Abb. 36: Photosystem II-Quantenausbeute vor und nach Hochlichtstress	68
Abb. 37: Xanthophyll-Zyklus	79
Abb. 38: Tomatenproduktion weltweit von 1976 bis 2006	86
Abb. 39: Phyllochinon-, β-Carotin- und Lycopingehalt in Tomatenfrüchten	87

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

4CL	4-Coumaroyl-CoA-Ligase
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
ATP	Adenosintriphosphat
A. tumefaciens	Agrobacterium tumefaciens
BA2H	Benzoat-2-hydroxylase
BSA	Rinderserum-Albumin (engl.: bovine serum albumin)
cDNA	Komplementär-DNA (engl.: complementary DNA)
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CoA	Coenzym A
C _t	Schwellenwert-Zyklus (engl.: treshold cycle)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFR	Dihydroflavonol-4-Reduktase
DHNA	1,4-Dihydroxy-2-naphthoat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Е	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EP	Elektronenpaar
EST	Expressed Sequence Tag
ETR	Elektronentransportrate
F3H	Flavononhydroxylase
F3'H	Flavonoid-3'-Hydroxylase
FG	Frischgewicht
FLS	Flavonolsynthase
GC	Gaschromatographie
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (engl.: green flourescent protein)
Gla	γ-Carboxyglutamat
Glu	Glutamat
h	Stunde
HL	Hochlicht (Starklicht)
HKG	Haushaltsgen (engl.: Housekeeping Gene)

HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (engl.: high pressure liquid		
	chromatography)		
ICS	Isochorismatsynthase (Synonym: AtmenF)		
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid		
kB	Kilobase		
kDa	Kilodalton		
LDOX	Leukoanthocyanidin-Dioxygenase		
Lhc-a	Lichtsammelkomplex a (<i>engl</i> .: light harvesting complex a)		
mRNA	Boten-RNA (<i>engl.</i> : messenger RNA)		
min	Minute		
MIPS	Munich information center of protein sequences		
ml	Milliliter		
mM	Millimolar		
MS	Massenspektroskopie		
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid		
MW	Mittelwert		
NBT/BCIP	4-Nitroblau-Tetrazolium-HCl/5-Brom-4-chloro-3-indolylphosphat		
n. d.	nicht detektierbar		
NL	Normallicht		
o-Ani	ortho-Anisinsäure		
ORF	Offener Leserahmen (engl.: open reading frame)		
P ₆₈₀	Reaktionszentrum des Photosystem II (Absorptionsmaximum bei 680 nm)		
P ₇₀₀	Reaktionszentrum des Photosystem I (Absorptionsmaximum bei 700 nm)		
P _{eff}	Primereffizienz		
PAL	Phenylalaninammonium-Lyase		
PAP1	Produktion des Anthocyanin-Pigments 1 (engl.: Production of		
	Anthocyanin Pigment 1) – Transkriptionsfaktor		
PC	Plastocyanin		
PL	Pyruvatlyase		
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese		
PAR	Photosynthetisch aktive Strahlung		
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)		
PQ	Plastochinon		
PQH ₂	Plastohydrochinon		
RT-PCR	Echtzeit-PCR (engl.: real time PCR)		
PNQ	2-Phytyl-1,4-naphthochinon		
RNA	Ribonukleinsäure		
RNAi	RNA interference		
RNase	Ribonuklease		

SA	Salicylat
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SD	Standardabweichung (engl.: standard deviation)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: sodium dodecylsulfate)
sec	Sekunde
SHCHC	2-Succinyl-6-hydroxy-1,4-cyclohexadien-1-carboxylat
SIM	Einzelionen-Aufzeichnung (<i>engl.</i> : single ion monitoring)
t	Tonne
TMPD	Tetramethylphenylendiamin
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
TT19	Transparent Testa 19
U	Umdrehung
UV	Ultraviolettes Licht
V+A+Z	Violaxanthin + Antheraxanthin + Zeaxanthin
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Prenyllipide

Der Begriff der Lipide umschreibt eine Gruppe strukturell sehr verschiedener Substanzen, die in organischen Lösungsmitteln gut löslich sind. Lipide nehmen zirka 5,9 % des Trockengewichts einer Pflanzenzelle ein, in welcher sie zahlreiche, wichtige Funktionen ausüben (Buchanan *et al.*, 2000). Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide sowie verschiedene Sterole gehören zu den Strukturlipiden, die neben den Proteinen einen wesentlichen Bestandteil biologischer Membranen darstellen. Wichtigste Vertreter der Speicherlipide sind die Triacylglycerine, welche hauptsächlich in Samen und Früchten vorkommen. Dort sind sie ein wichtiger Kohlenstoff- und Energiespeicher. Wachse, die Ester langkettiger Fettsäuren, spielen eine bedeutende Rolle beim Schutz der Blattoberfläche z. B. vor Austrocknung oder Pathogenen. Substanzen wie Jasmonat oder Abscisinsäure sind als Pflanzenhormone von Bedeutung. Einige essentielle Bestandteile des Photosyntheseapparates wie die Chlorophylle, β -Carotin, Plastochinon oder Phyllochinon sind Prenyllipide und gehören somit ebenfalls in die Gruppe der Lipide.

Prenyllipide können in "reine" und "gemischte" Formen unterschieden werden. "Reine" Prenyllipide sind ausschließlich aus Isopren-Einheiten (2-Methyl-1,3-butadien) aufgebaut, während die "gemischten" Prenyllipide eine nicht vom Isopren abgeleitete Komponente besitzen. Zu den "reinen" Prenyllipiden gehören Sterole wie Cholesterol und Sitosterol, die wichtige Membranbausteine darstellen. Pflanzenhormone wie die Gibberelline oder die Abscisinsäure gehören ebenso in die Gruppe der "reinen" Prenyllipide wie Lutein, Lycopin, Zeaxanthin oder auch β -Carotin als Vertreter der Carotinoide, die als Schutzpigmente in den Lichtsammelkomplexen der Photosysteme von Bedeutung sind. Phytol, ein Diterpenalkohol, dient als Seitenkette von Chlorophyllen, Tocopherolen oder auch Phyllochinon: Substanzen, die zu den "gemischten" Prenyllipiden zählen. Wie auch Phyllochinon (Vitamin K₁) können Moleküle wie Plastochinon oder Ubichinon als Prenylchinon in die Gruppe der "gemischten" Prenyllipide eingeordnet werden (Abb. 1; Heldt, 2002).



Abb. 1: Vertreter "reiner" und "gemischter" Prenyllipide

"Reine" Prenyllipide wie Phytol oder β -Carotin sind ausschließlich aus Isopreneinheiten aufgebaut, während "gemischte" Prenyllipide eine nicht vom Isopren abgeleitete Komponente besitzen. Zu den "gemischten" Prenyllipiden gehören auch die Prenylchinone, zu deren Vertretern u. a. Ubichinon oder die im Photosystem lokalisierten Substanzen Phyllochinon und Plastochinon zählen.

1.2 Strukturen und Vorkommen von Phyllochinon

Die Eigenschaften einer Substanz, die später Vitamin K genannt wurde, wurden erstmals im Jahre 1929 vom Dänen Henrik Dam beschrieben, der den Cholesterinstoffwechsel in Hühnern untersuchte. Ihm fiel dabei auf, dass es bei Hühnern nach zwei bis drei Wochen cholesterinfreier Diät zu Blutungen in Haut, Muskel und Organen kommt (Dam, 1929). Da andere Mängel an Vitaminen oder Fetten ausgeschlossen werden konnten, stellte sich die Frage, welche Substanz dafür verantwortlich ist. Nach weiteren Untersuchungen konnte Henrik Dam belegen, dass es sich um ein fettlösliches Vitamin handelt, das nicht mit den bereits bekannten Vitaminen A, D und E identisch ist (Dam, 1935). Schönheyder konnte bereits zuvor zeigen, dass ein Mangel an dieser Substanz zu einer starken Verminderung der Koagulation des Blutes führt (Schönheyder, 1935). Nach dieser Eigenschaft benannte Dam das bis dahin unbekannte Vitamin mit dem Buchstaben K. Bereits im Jahr 1939 konnte gezeigt werden, dass es sich bei Vitamin K um ein 2-Methyl-3-phytyl-1,4naphthochinon handelt (MacCorquodale *et al.*, 1939). Diese Entdeckung sowie die Tatsache, dass die Blätter (*griech.*: phyllos) grüner Gemüse reich an diesem Vitamin sind (Dam und Schönheyder, 1936) führte dazu, dass Vitamin K₁ auch Phyllochinon genannt wurde. Für die Entdeckung des Vitamin K wurde Dam 1943 zusammen mit Edward Doisy, der die Struktur des Vitamins aufklären konnte, der Nobelpreis für Medizin verliehen.



Abb. 2: Chemische Strukturen verschiedener Vitamin-K-Formen

Die natürlich vorkommenden K-Vitamine Phyllochinon und Menachinon bestehen aus einer 2-Methyl-1,4-naphthochinon-Kopfgruppe, welche in Position 3 verschiedene Seitenketten trägt. Menadion ist eine synthetische Verbindung, die im menschlichen Körper zu Menachinon-4 umgesetzt werden kann.

Natürliches Vitamin K kommt in zwei Formen vor: Phyllochinon (Vitamin K_1) und Menachinon-*n* (Vitamin K_2). Alle K-Vitamine haben einen 2-Methyl-1,4-naphthochinon-Ring als Kopfgruppe gemein, unterscheiden sich aber durch die Seitenkette in Position 3. Phyllochinon trägt dort eine Phytylgruppe, während man bei Menachinon Prenylgruppen unterschiedlicher Länge vorfindet (Abb. 2). Vitamin K_1 wird in Pflanzen und in Blaualgen synthetisiert, wohingegen in nicht photosynthetisch aktive Bakterien verschiedene Formen von Menachinon gebildet werden, unter denen Menachinon-6 bis Menachinon-13 die häufigsten Vertreter sind (Conley und Stein, 1992). Menadion, Vitamin K_3 , ist eine synthetische Substanz, die in Säugerzellen zu Menachinon-4 umgewandelt werden kann und dadurch Vitamin-K-Aktivität erhält (Billeter und Martius, 1960; Taggart und Matschiner, 1969). Menadion wurde daher früher auch als Nahrungsergänzungsmittel in Form von Provitamin K eingesetzt.

1.3 Biosynthese und Funktion von Phyllochinon

1.3.1 Der Biosyntheseweg des Phyllochinon

Die Biosynthese von Vitamin K wurde zuerst in Bakterien, später in Cyanobakterien untersucht. Die Synthese des in Bakterien vorkommenden Menachinons beginnt bei Chorismat, welches durch eine Isochorismatsynthase MenF (Daruwala *et al.*, 1997) in Isochorismat umgesetzt wird. Dieses wird dann durch eine SHCHC-Synthase MenD (Palaniappan *et al.*, 1992) in SHCHC umgewandelt und anschließend durch eine o-Succinylbenzoatsynthase MenC (Sharma *et al.*, 1993) zu o-Succinylbenzoat umgesetzt. Die o-Succinylbenzoyl-CoA-Synthetase MenE (Sharma *et al.*, 1996) und die DHNA-CoA-Synthese MenB (Sharma *et al.*, 1992) katalysieren im Folgenden die Bildung von o-Succinylbenzoyl-CoA bzw. DHNA-CoA. DHNA-CoA wird im Anschluss durch eine Thioesterase MenH (Meganathan, 2001) zu DHNA umgewandelt. Eine Prenyltransferase MenA (Suvarna *et al.*, 1998) katalysiert dann die Übertragung einer Prenylgruppe auf DHNA. In einem letzten Schritt wird das dabei entstandene Zwischenprodukt mit Hilfe der Methyltransferase UbiE (Lee *et al.*, 1997) zu Menachinon, Vitamin K₂ methyliert.

Untersuchungen in *Synechocystis* haben gezeigt, dass die Synthese des dort vorkommenden Phyllochinons (Vitamin K₁) sehr ähnlich verläuft. Jonhnson *et al.* konnte durch Ausschalten von menA und menB (2000) sowie menD und menE (2003) zeigen, dass diese Gene in die cyanobakterielle Phyllochinon-Biosynthese involviert sind. Das durch das Gen menA kodierte Enzym überträgt in Cyanobakterien - anders als in Bakterien - eine Phytylgruppe auf DHNA, wodurch 2-Phytyl-1,4-naphthochinon gebildet wird. Der letzte Schritt ist ebenfalls eine Methylierungsreaktion, die in *Synechocystis* durch menG katalysiert wird (Sakuragi *et al.*, 2002).

Über die genauen Syntheseschritte in photosynthetisch aktiven Organismen und höheren Pflanzen war bisher weitaus weniger bekannt. Gaudilliere *et al.* (1984) konnte zeigen, dass 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat (DHNA) unter Zugabe von Phytylpyrophosphat und S-Adenosylmethinon in Chloroplasten aus *Capsicum annuum* zu Phyllochinon umgewandelt wird. Simantiras und Leistner (1991) bewiesen, dass in *Galium*-Extrakten o-Succinylbenzoat aus Isochorismat und 2-Oxoglutarat gebildet wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Enzyme SHCHC-Synthase und o-Succinylbenzoat-Synthase nicht nur in Bakterien, sondern auch in dem photosynthetisch aktiven Organismus *Euglena*

4

gracilis für die Bildung von o-Succinylbenzoat verantwortlich sind (Seeger und Bentley, 1991).

Anhand von Sequenzhomologien konnte Lange et al. (2003) den in Cyanobakterien bekannten Genen des Phyllochinon-Biosyntheseweges orthologe Gene in Arabidopsis zuordnen. Shimada et al. (2005) konnte erstmals in Arabidopsis zeigen, dass das Gen ABC4 analoge Funktion zu menA aus Synechocystis hat, also eine DHNA-Phytyltransferase kodiert. Durch Ausschalten dieses Gens konnten phyllochinonfreie Pflanzen erzeugt werden. Im Gegensatz zu den Cyanobakterien, in denen Plastochinon zum Teil die Funktion des fehlenden Phyllochinons übernimmt (Johnson et al., 2000), konnte dies in Arabidopsis nicht bestätigt werden. Kim et al. (2008) konnte kürzlich zeigen, dass das Arabidopsis-Gen AAE14 die o-Succinylbenzoyl-CoA-Ligase kodiert, welche die Übertragung von CoenzymA auf o-Succinylbenzoat katalysiert und damit analoge Funktion zum Gen menE aus Synechocystis hat. Während in Cyanobakterien und Bakterien nur ein Gen für die Isochorismatsynthase kodiert, existieren in Arabidopsis zwei Gene: ICS1 und ICS2, wobei ICS1 die Hauptaktivität besitzt (Lohmann, Diplomarbeit 2005). Das Arabidopsis-Gen PHYLLO vereinigt vier Gene des Phyllochinon-Biosyntheseweges, welche den Genen menF (ICS), menC, menD und menH aus Synechocystis entsprechen. Die ICS-Domäne des Gens PHYLLO ist verkürzt und zeigt nur zum N-terminalen Bereich des Isochorismatsynthase-Gene ICS1 und ICS2 Homologien (Gross et al., 2006). Die weiteren Gene des Phyllochinon-Biosyntheseweges in Arabidopsis, d.h. die Gene, die homolog zu menB, menE und menG aus Synechocystis sind, wurden bisher in höheren Pflanzen noch nicht näher charakterisiert.



Abb. 3: Phyllochinon-Biosyntheseweg in höheren Pflanzen und Cyanobakterien

Die Enzyme des Syntheseweges sind blaugrün, die Beschriftung der Substrate und Produkte fett dargestellt. Cyanobakterielle Gene werden als "menX", *Arabidopsis*-Gene mit ihren geläufigen Abkürzungen sowie mit den dazugehörigen MIPS-Codes bezeichnet.

1.3.2 Die Bedeutung von Phyllochinon für den Menschen

Phyllochinon ist ein Vitamin, welches der Mensch nicht selbst synthetisieren kann und damit essentiell ist. Die empfohlene Tagesdosis liegt bei 90 μ g für Frauen und 120 μ g für Männer (Trumbo *et al.*, 2001). Ein Teil des benötigten Vitamin K wird dem menschlichen Körper in Form von Phyllochinon zugeführt (Booth *et al.*, 1996). Die größten Mengen kommen in Blättern von grünem Gemüse vor. So findet man in gekochtem Spinat rund 5,4 μ g Vitamin K₁ pro Gramm Frischgewicht, in gekochtem Brokkoli 1,4 μ g, in grünem Salat etwa 1,3 μ g. Daneben stellen verschiedene pflanzliche Öle eine gute Quelle für die tägliche Vitamin-K-Versorgung dar. Der Phyllochinongehalt von beispielsweise Olivenöl beträgt 0,6 μ g pro Gramm, der von Sojaöl sogar fast 2 μ g (Tab. 1). Der andere Teil der täglichen Phyllochinon-Menge wird vermutlich durch Darmbakterien zur Verfügung gestellt, welche das Vitamin K₂ (Menachinon) bilden.

Nahrungsmittel	Phyllochinongehalt ¹	
	[µg g ⁻¹ FG]	
Spinat, gekocht	5,41	
Brokkoli, gekocht	1,41	
Grüner Salat	1,27	
Eisbergsalat	0,24	
Paprika, grün, roh	0,07	
Banane	0,005	
Kiwi	0,25	
Weizenbrot	0,09	
Weißbrot	0,04	
Butter	0,10	
Olivenöl	0,60	
Sojaöl	1,93	

Tab. 1: Gehalte an Phyllochinon in verschiedenen Nahrungsmitteln

(¹ Mittelwerte der Phyllochinongehalte in μ g g⁻¹ FG, Daten aus Booth *et al.*, 1993; Peterson *et al.*, 2002; Damon *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006)

Im menschlichen Körper wird Phyllochinon in der Leber gespeichert und umgesetzt. Das in der humanen Leber vorhandene Vitamin K besteht bis zu 95 % aus verschiedenen Menachinonen (McCarthy *et al.*, 1986), welche hauptsächlich durch Bakterien im menschlichen Darm synthetisiert und nur zu einem geringen Teil über die Nahrung aufgenommen werden (Booth *et al.*, 1998). Daher wird angenommen, dass dieses bakterielle Menachinon über einen bisher unbekannten Mechanismus dem menschlichen Körper zur Verfügung gestellt wird (Conly und Stein, 1992; Shearer, 1992; Thijssen *et al.*, 1996).

Während Phyllochinon vor allem in der Leber gefunden wird, kann Menachinon-4, ein in Bakterien nur in geringen Mengen synthetisiertes Menachinon, in Geweben außerhalb der Leber wie Hirn, Niere und Bauchspeicheldrüse nachgewiesen werden (Thiyssen *et al.*, 1996, 1994). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass aus über die Nahrung aufgenommenem Phyllochinon in Säugerzellen Menadion (Vitamin K₃) gebildet wird (Thijsen *et al.*, 2006), welches in Menachinon-4 umgewandelt werden kann (Taggart und Matschiner, 1969). Unbekannt ist bisher, ob Menachinon-4 und andere Menachinone eine dem Phyllochinon ähnliche Funktion ausüben (Thijssen *et al.*, 1996).



Abb. 4: Schematische Darstellung der Vitamin K₁ abhängigen γ-Carboxylierungsreaktion

Die Hydrochinon-Form des Vitamin K_1 fungiert in Säugerzellen als Cofaktor für eine Carboxylase, die unter Anwesenheit von CO₂ und O₂ Carboxylgruppen auf Glutamatreste verschiedener Proteine überträgt. Vitamin K_1 wird dabei zum Epoxid, welches anschließend durch zwei enzymatische Schritte wieder in die als Cofaktor aktive Hydrochinon-Form umgewandelt wird. Verschiedene Substanzen wie z. B. Warfarin können diesen Kreislauf blockieren. Phyllochinon dient unter anderem im Menschen als Cofaktor für die posttranslationale Modifikation von zahlreichen Proteinen. Zu den auf diese Art modifizierten Proteinen gehören die Blutgerinnungsfaktoren II, VII, IX und X, das Protein C, das Protein S und das Protein Z, die ebenfalls am Prozess der Blutgerinnung beteiligt sind, sowie verschiedene andere "Gla"-Proteine wie z. B. das an der Knochenbildung beteiligte Osteocalcin (BGP) und das Matrix-Gla-Protein (MGP) (Furie, 1988). Eine Vitamin K abhängige Carboxylase wandelt dabei in der Leber in Anwesenheit von CO_2 und O_2 Glutamatreste (Glu) in γ -Carboxylglutamat (Gla) um. Währenddessen wird die aktive Hydrochinonform des Vitamin K in ein Epoxid umgewandelt, das anschließend durch eine Epoxidreduktase und eine Chinonreduktase wieder in die als Cofaktor aktive Hydrochinonform umgesetzt wird (Suttie, 1980; Abb. 4). Dieser Kreislauf kann durch verschiedene Substanzen unterbrochen werden, die daher auch in der Medizin als Blutgerinnungshemmer eingesetzt werden. Zu solchen Vitamin-K-Antagonisten gehören Cumarin-Derivate wie Warfarin und Phenprocoumon. Ein Mangel an Vitamin K ist in der Regel selten. Störungen bei der Lipidabsorption im Darm, vor allem aber Antibiotikabehandlungen können zu Vitamin-K-Defizienz führen (Suttie, 1995).

1.3.3 Die Rolle von Phyllochinon in höheren Pflanzen

Während Phyllochinon im Menschen eine essentielle Bedeutung als Cofaktor für die posttranslationale Proteinmodifikation hat, übernimmt es in höheren Pflanzen und Cyanobakterien eine bedeutende Funktion als Elektronenakzeptor im Photosystem I (PSI). Im Photosyntheseapparat höherer Pflanzen, aber auch in denen von Cyanobakterien und Grünalgen, sind zwei Photosysteme hintereinander geschaltet und über eine Elektronentransportkette miteinander verbunden. Durch das Photosystem II (PSII) wird Wasser gespalten, dabei entsteht O₂. Die dabei frei werdenden Elektronen werden durch das PSII über Plastohydrochinon (PQH₂) auf den Cytochrom- b_6/f -Komplex (Cyt b_6/f) übertragen, wodurch PQH₂ zu Plastochinon (PQ) oxidiert wird. Vom Cytochrom- b_6/f -Komplex aus, welcher die Redox-Chemie der Photosysteme miteinander verbindet, fließen die Elektronen über Plastocyanin (PC) zum Photosystem I. Über eine Kette von Elektronenüberträgern (A, A₀, A₁ und F_x) werden die Elektronen schließlich auf Ferredoxin (Fdx) übertragen, welches dadurch oxidiert wird und gleichzeitig NADP⁺ zu NADPH reduziert. Der während dieser Prozesse entstehende Protonengradient dient zur Synthese von ATP (Heldt, 2002; Abb. 5).



Abb. 5: Schematische Darstellung des Elektronenflusses durch die Photosysteme

Elektronen werden vom Wasser auf NADP⁺ übertragen, wodurch NADPH entsteht. Die Elektronen fließen dabei vom Photosystem II über den Cytochrom-b₆/f-Komplex (Cyt b₆f) zum Photosystem I, in welchem Phyllochinon den häufig auch als A₁ bezeichneten Elektronenakzeptor darstellt (nach Buchanan *et al.*, 2000).

1985 stellten Mansfield und Evans erstmals die Vermutung auf, dass es sich bei dem Elektronenakzeptor A_1 im PSI um ein Chinon handeln könnte. Diese These wurde 1986 von Schoeder und Lockau unterstützt, die das PSI von *Anabaena variabilis* und Spinat untersuchten und dabei herausfanden, dass pro PSI etwa zwei Moleküle Phyllochinon vorhanden sind und es sich damit bei dem unbekannten Chinon im PSI um Phyllochinon handeln könnte. Biggins und Mathis (1988), deren Forschung die Funktion von Phyllochinon im Elektronentransport des PSI in *Synechocystis* aufklären sollte, konnten dieses Ergebnis bestätigen: Phyllochinon ist der bis dato unbekannte Elektronenakzeptor A_1 im PSI und damit eine wichtige Komponente der Elektronentransportkette.

1.4 Die Biosynthese von Phyllochinon und Salicylat sind miteinander verknüpft

Chorismat, welches aus dem Shikimat-Biosyntheseweg stammt, ist Ausgangspunkt für die Synthese einer Vielzahl von Molekülen. So ist Chorismat zum einen ein Zwischenprodukt der Biosynthesewege der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Trytophan und Tyrosin. Zum anderen kann es auch durch eine Isochorismatsynthase zu Isochorismat umgewandelt werden, um dann für die Phyllochinon-Biosynthese zur Verfügung zu stehen. Aber auch Salicylat, ein wichtiger Mittler in der Abwehr von Pathogenen (Dempsey *et al.*, 1999), kann, katalysiert durch die Pyruvatlyase (PL), aus Isochorismat gebildet werden.



Abb. 6: Biosynthesewege von Salicylat

Salicylat kann ausgehend vom Chorismat über das Zwischenprodukt Isochorismat gebildet werden. Isochorismat entsteht durch die Aktivität der Isochorisamtsynthasen 1 und 2 (ICS1, ICS2) aus Chorismat und ist gleichzeitig Intermediat der Phyllochinon-Biosynthese. Salicylat kann alternativ über die Zwischenprodukte Phenyalanin und Zimtsäure aus Benzoat gebildet werden. Dieser Syntheseweg wird in Anlehnung an das Enzym Phenylalaninammonium-Lyase (PAL) auch PAL-Weg genannt (BA2H - Benzoat-2-hydroxylase, PL – Pyruvatlyase)

Lange Zeit wurde angenommen, dass Salicylat in Pflanzen ausschließlich über Phenylalanin und Benzoat gebildet wird. Ausgangspunkt dabei ist ebenfalls Chorismat, welches zunächst in die aromatische Aminosäure Phenylalanin umgewandelt wird. Aus Phenylalanin wird anschließend durch die Aktivität der Phenylalaninammonium-Lyase (PAL) Zimtsäure gebildet, welche durch eine Decarboxlierung und Verkürzung der Seitenkette in Benzoat umgewandelt wird. Dieses wird schließlich durch die katalytische Aktivität der Benzoat-2-hydroxylase (BA2H) zu Salicylat hxdroxyliert. Dieser Weg wird in Anlehnung an das Enzym PAL auch als PAL-Weg bezeichnet (Yalpani *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995; Abb. 6). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch auch, dass nach Inhibition dieses Weges in Pflanzen noch immer Salicylat gebildet werden kann (Mauch-Mani *et al.*, 1996). Wildermuth *et al.* (2001) konnten schließlich belegen, dass Salicylat auch aus Isochorismat gebildet wird, welches durch die Aktivität der Isochorismatsynthase 1 (ICS1) aus Chorismat entsteht. Ungeklärt blieben bisher zwei Fragen: Welche Rolle spielt das Gen ICS2 für die Salicylatbiosynthese und kann Salicylat in Pflanzen sowohl über den PAL-Biosyntheseweg als auch aus Isochorismat gebildet werden.

1.5 Zielsetzung

Phyllochinon hat für den Menschen große Bedeutung als Cofaktor für die posttranslationale Modifikation von zahlreichen Proteinen, die hierdurch erst ihre Aktivität erhalten. Es ist ein essentielles Vitamin, welches in größeren Mengen vor allem in grünem Gemüse vorkommt und dadurch über die Nahrung aufgenommen wird (*Booth et al.*, 1996). In höheren Pflanzen wie in der Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* ist Phyllochinon integraler Bestandteil des Photosystem I und damit für den Elektronentransport innerhalb des Photosyntheseapparates sehr wichtig (Heldt, 2002). Der Biosyntheseweg von Vitamin K wurde bisher nur in *E. coli* (Menachinon, Vitamin K₂) und *Synechocystis* (Johnson *et al.*, 2000, 2003) aufgeklärt. Für den Phyllochinon-Biosyntheseweg in *Arabidopsis thaliana* konnten bisher Kandidatengene durch Sequenzvergleiche bestimmt werden (Lange und Ghassemian, 2003). Einige dieser Kandidatengene wurden bereits näher charakterisiert (Shimada *et al.*, 2005; Gross *et al.*, 2006), über andere Schritte dieses Weges herrscht noch immer Unklarheit.

Ziel dieser Arbeit soll es zum einen sein, die Bedeutung des ersten Schrittes der Phyllochinon-Biosynthese zu untersuchen. Bekannt ist, dass zwei Isochorismatsynthasen, *ICS1* und *ICS2*, die Umwandlung von Chorismat in Isochorismat katalysieren, und dass Isochorismat auch Vorläufermolekül für die Biosynthese von Salicylat, einem wichtigen Mittler in der Abwehr von Pathogenen, ist (Wildermuth *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll eine Doppelmutante *ics1ics2* erzeugt werden, mit deren Hilfe die Frage geklärt werden soll, ob Salicylat nur über das Zwischenprodukt Isochorismat gebildet werden kann oder ob noch ein weiterer Salicylat-Biosyntheseweg in *Arabidopsis* existiert. Weiterhin soll untersucht werden, ob die verkürzte ICS-Domäne des Gens PHYLLO (Gross *et al.*, 2006) funktionell aktiv ist. Dafür soll diese ICS-Domäne in die Isochorismatmutante *ics1* transferiert und anschließend geprüft werden, ob dies zur Komplementation der Phyllochinon-Defizienz führt.

Zum anderen soll mit dieser Arbeit der letzte Schritt der Phyllochinon-Biosynthese in *Arabidopsis*, die Methylierung von 2-Phytyl-1,4-naphthochinon (PNQ) zu Phyllochinon näher untersucht werden. Dafür soll zuerst die bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit isolierte T-DNA-Insertionsmutante *AtmenG* komplementiert werden, um zu zeigen, dass das Gen At1g23360 die PNQ-Methyltransferase kodiert. Im Anschluss sollen sowohl physiologische als auch biochemische Untersuchungen durchgeführt werden, um die

13

Bedeutung dieser Methylierungsreaktion für die Pflanze näher zu erforschen. Dafür sollen Stressexperimente durchgeführt und u. a. die Gehalte an photosynthetischen Pigmenten, Anthocyaninen und Chlorophyll ermittelt werden. Zudem sollen mit Hilfe spektroskopischer Methoden die Photosysteme I und II eingehender untersucht werden. Experimente mit Hilfe des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) sollen Aufschluss über die genaue Lokalisation des Proteins AtmenG innerhalb der Pflanzenzelle geben. Weiterhin soll Verteilung von Phyllochinon bzw. PNQ zwischen die verschiedenen Chloroplastenfraktionen ermittelt werden.

Im Anschluss soll die Frage diskutiert werden, inwieweit die Ergebnisse über die Biosynthese von Phyllochinon in *Arabidopsis* auf andere höhere Pflanzen übertragen und biotechnologisch genutzt werden können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte

7900HT Fast Real-Time PCR System Applied Bioscience, Foster City, USA Berthold, Wildbad, D Automatic TLC Linear Analyzer Biolistic PSD-1000/He Particle Delivery BioRad, München, D System Centrikon T-124 Kontron, Neufahrn, D **Dual PAM-S** Walz GmbH, Effeltrich, D Elektroporationsgerät Gene Pulser BioRad, Richmond, VA, USA F6500 Fluorometer JASCO GmbH, Groß-Umstadt, D Fastblot-B33/B34 System Biometra, Göttingen, D Gaschromatograph (GC) HP6890 mit Agilent Techn:, Böblingen, D Flammenionisationsdetektor (FID) Agilent Techn:, Böblingen, D und Autoinjektor HPLC HP 1100 mit Fluoreszenzdetektor (FLD) und Dioden Array Detektor (DAD) Agilent Techn:, Böblingen, D Massenspektrometert HP-5973 MSD Agilent Techn:, Böblingen, D Imaging PAM Fluoreszenzmessgerät Heinz Walz, Effeltrich, D J-550 Spektrophotometer JASCO GmbH, Groß-Umstadt, D Leica TCS SP2 Konfokal Fluoreszenz Mikroskop Leica, Wetzlar, D pH-Meter Calimatik 671 Knick GmbH, Berlin, D Schwingmühle MM200 Retsch, Haan, D Simultan Trennkammer für Dünnschichtchromatographie Sigma-Aldrich, München, D Thermocycler T-Gradient Biometra, Göttingen, D Thermomixer 5355 Eppendorf, Hamburg, D Untertischzentrifuge Variofuge 3.0R Heraeus, Hanau, D **UV-Crosslinker** Stratagene, La Jolla, USA Vakuumzentrifuge Concentrator 5301 Eppendorf, Hamburg, D Eppendorf, Hamburg, D Zentrifuge Eppendorf 5417C

2.2 Materialien

1.0 µm Gold Microcarriers
1100 psi Rupture Disks
3MM Chromatographie-Papier
DC-Platten Baker, Si250-PA.
Elektroporationsküvette, 1mm
GC/HPLC-Röhrchen + Verschlusskappen

<u>GC/GC-MS-Säule</u> SP-2380, 30 m x 0,53 mm x 0,2 μm HP-5MS 30m x 0,25 mm x 0,25 μm <u>HPLC-Säulen</u> Eurosphos-100-C18, 250 x 5 mm Nucleosil-120-C18, 250 x 3 mm LiChrospher 500-Diol, 250 x 3 mm YMC-Pack ODS-A, 250 x 4,6 mm SupelcosilTM ABZ+Plus, 250 x 4,6 mm, 5 μm Hybond N+ Membran

Menadion, Menachinon-4 MSTFA NBT/BCIP-Tabletten Nitrozellulose-Membran Protran BA85 Nylon-Membran Hybond-N⁺ Nucleospin[®]Plant, Nucleospin[®]Plasmid, *o*-Anisinsäure Optical 384-Well Reaction Plate Optical Adhesive Film Rediprime Labelling System Salicylat Wizard®SV Gel and PCR clean-up X-OMAT-AR-Röntgenfilme BioRad, München, D BioRad, München, D Whatman, Maidstone, UK J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA Peqlab, Erlangen, D Chromacol LTD, Welwyn Gardencity, USA

Supelco, Taufkirchen, D Agilent Techn:, Böblingen, D

Knauer, Berlin, D YMC Europe GmbH, Dinslaken, D Supelco, Taufkirchen, D Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D Sigma-Aldrich, München, D Macherey-Nagel, Düren, D Roche, Mannheim, D Whatman, Maidstone, UK Amersham Bioscience, München, D Macherey-Nagel, Düren, D Macherey-Nagel, Düren, D Sigma-Aldrich, München, D Applied Bioscience, Foster City, USA Applied Bioscience, Foster City, USA NEB, Beverly, USA Sigma-Aldrich, München, D Promega GmbH, Mannheim, D Kodak Eastman, Rochester, USA

Die gebräuchlichsten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) oder Fluka (Taufkirchen) erworben.

Radiochemikalien

[α-32P]-dCTP (800Ci/mmol)Hartmann Analytic[1-3H]-Phytol (20Ci/mmol)AmericanRadi/Biotrend, Köln, DEnzyme

DNase (RNase-frei) Restriktionsenzyme RNase H SuperscriptTM III First-Strand Synthesis Sybr®Green PCR Master Mix T4-Ligase Taq-Polymerase Hartmann Analytic, Braunschweig, D American Radiolabeled Company /Biotrend, Köln, D

Roche, Mannheim, D Roche, Mannheim, D Ambion Ltd., Huntington, UK Invitrogen, Karlsruhe, D Applied Bioscience, Foster City, USA NEB, Beverly, USA Invitrogen, Groningen, NL

Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden von Agriserva AB, Vännäs, Schweden erhalten.		
PsaC	Untereinheit von Photosystem I (8,8 kDa)	
PsbD	Untereinheit von Photosystem II (17,9 kDa)	
PetA	Untereinheit des Cytochrom-b ₆ /f-Komplexes (31 kDa)	

Pflanzenmaterialien

Solanum lycopersicum	Wildtyp, Ökotyp Moneymaker (MM)
Arabidopsis thaliana	Wildtyp, Ökotyp Columbia 0 (Col0)

Pflanzenmutanten, die durch *A. tumefaciens*-vermittelte Gentransfer eines Vektors (T-DNA) mutagenisiert wurden, werden von verschiedenen Stockcentern angeboten. Durch Insertion der T-DNA in das Genom können betroffene Abschnitte nicht mehr einwandfrei transkribiert werden, was zumeist zum Aktivitätsverlust des entsprechenden Proteins führt. Auf den Internetseiten dieser Anbieter kann nach T-DNA-Insertionslinien für verschiedene Gene gesucht und die entsprechenden Mutanten können käuflich erworben werden (http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress).

GABI_565F06 At1g23360, Ökotyp Columbia 0, GABI, Köln, D

Medien

• Anzuchtmedium für *Arabidopsis thaliana* (Murashige und Skoog, 1962)

2MS: 0,44 % (w/v) MS; 1 % (w/v) Saccharose; 0,8 % Selectagar, pH 5,8

• Anzuchtmedium für *E. coli* (Sambrock *et al.*, 1989)

YT: 0,8 % (w/v) Pepton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,0 1,5 % (w/v) Bacto-Agar bei Festmedien

• Anzuchtmedium für A. tumefaciens (Vervliet et al., 1975)

YEB: 0,5 % (w/v) Rindfleischextrakt; 0,1 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) Pepton; 0,5 % (w/v) Saccharose; 2mM Magnesiumsulfat; pH 7,0 1,5 % (w/v) Bacto-Agar für Festmedien

Verwendete Antibiotika:	Ampicillin	100 µg/ml
	Kanamycin	$50 \mu g/ml$
	Hygromycin B	$25 \mu g/ml$
	Rifampicin	$100 \mu g/ml$
	Gentamycin	$20 \mu g/ml$

2.3 Synthetische Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, B) hergestellt.

Primer zum Durchmustern der T-DNA-Population

PD464 (GABI_565F06-F)	AGAAATGTGTAGCTTGGCTTGATT			
PD465 (GABI_565F06-R)	GTTACTGGTTGTAGCAAGTTTGGA			
PD394 (LB T-DNA GABIKAT)	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC			
Primer zum Klonieren des Konstrukts pCL60-AtmenG				
PD592 (At1g23360-F, BamHI)	AGGGATCCTATGGCGGCTCTACTCGGT			
PD593 (At1g23360-R, NcoI)	ATCCATGGACCTCATAGCGACCAAATTC			
Primer zum Klonieren des Konstrukts pBinAR-PHYLLO(ICS)				
PD644 (vorwärts, KpnI)	AGGTACCATGCGATCTTCGTTTCTAGT			
PD645 (rückwärts, BamHI)	CAGGATCCGATTGTATACTTTTCAGGGT			
Primer zum Sequenzieren des Gens ICS1				
PD596	AGAAAAAGGGTTAAAGCTAA			
Primer zum Screenen homozygoter T-DNA-Insertionsmutanten SALK_084635				
PD702 (ICS2 genspezifisch, vorwärts)	GGACAAACATTCACCCCTAAGC			
PD703 (ICS2 genspezifisch, rückwärts)	GATAACCTGCAGAACAAGTCAAG			
PD300 (SALK-Insertion)	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT			

Primer zum Überprüfen der RNA für RT-PCR

Actin-F	

Actin-R

Primer für RT-PCR

ACTTTCATCAGCCGTTTTGA ACGATTGGTTGAATATCATCAG

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
4CL3	TTCGTGGTGCGATCAAATGG	GAACACCACCTGTTTGGCAA
CHS	AAGCGCATGTGCGACAAGTC	AGAAGGAGCCATGTAAGCAC
CHI	CTCTCTTACGGTTGCGTTTTC	GTTCTTCCCGATGATAGATTC
F3H	ACCACGGCCATTTTTTGAGC	CGTGGCTATGGATAATCTGC
F3'H	CTTACCTTCAGGCGGTTATC	ATCTCACAGCTCTCTGACGC
FLS	CGATCAGATTCTGAGGTTGAG	CACGACATCCTCGTCTTCTC
DFR	AAAGATCCTGAGAACGAAGTG	ATCTTCGTACGGTCTTTGCC
TT19	GAACATCTTCTTCGTCAGCC	GTAGTATCTCGCGATGGCTC
LDOX	AAGCTCACACCGATGTAAGC	TTTGCAGTGACCCATTTGCC
PAP1	TGTAAGAGCTGGGCTAAACC	GAAGATCGACTTCATCAGAGC

2.4 Vektoren und Konstrukte

Vektoren		
pBinAR	Stabile Überexpression in Pflanzen durch 35S-Promotor, Kanamycin-Resistenz in Pflanzen,	
	Höfgen und Willmitzer (1990)	
pCL60	Transiente Expression in Pflanzenzellen (für GFP- Experimente)	
	Bauer <i>et al.</i> (2002)	
pBluescript II SK+	Stratagene, Amsterdam, NL	
pGemTeasy	Promega, Mannheim, D	
Konstrukte		
RAFL09-78-P20 (AV813563)	cDNA-Klon von At1g68890 (Riken, Japan)	
pBluescriptSK-At1g23360	cDNA von At1g23360 aus <i>Arabidopsis</i> in pBluescriptSK ligiert (zur Verfügung gestellt von Edgar B. Cahoon, St. Louis, USA)	

pCL60-AtmenG



Abb. 7: Schematische Darstellung des Konstruktes pCL60-AtmenG

Die At1g23360-cDNA wurde mit Hilfe der Primer PD592 und PD593 amplifiziert. Als DNA-Matrize diente das Konstrukt pBluescriptSK-At1g23360. Nach Restriktion mit BamHI und NcoI wurde die At1g23360-cDNA in translationaler Fusion mit dem N-terminalen Bereich der GFP-Sequenz in den Vektor pCL60 ligiert. Die cDNA steht unter Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S-Promotors (35S). Als Terminator dient das 3'-Ende des Nopalinsynthasegens (nos). Ampicillin-Resistenz zur Selektion transgener Pflanzen wird durch β -Lactamase verliehen.

pBinAR-AtmenG



Abb. 8: Schematische Darstellung des Konstruktes pBinAR-AtmenG

Die At1g23360-cDNA wurde mit KpnI und BamHI aus dem Konstrukt pBluescriptSK-At1g23360 geschnitten und mit dem binären Vektor pBinAR ligiert. Die cDNA steht unter Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S Promotors (35S). Als Terminator dient das 3'-Ende des Octopinsynthasegens (OCS) aus *A. tumefaciens*. Die Kanamycinresistenz zur Selektion transgener Pflanzen wurde durch Neomycinphosphotransferase (KanR) verliehen.

pBinAR-PHYLLO-ICS



Abb. 9: Schematische Darstellung des Konstruktes pBinAR-PHYLLO-ICS

PHYLLO-ICS wurde mit Hilfe der Primer PD644 und PD645 amplifiziert. Als DNA-Matrize diente der cDNA-Klon RAFL09-78-P20. Nach Restriktion mit KpnI und BamHI wurde die cDNA in den Vektor pBinAR ligiert. Die cDNA steht unter Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S Promotors (35S). Als Terminator dient das 3'-Ende des Octopinsynthasegens (OCS) aus *A. tumefaciens*. Die Kanamycinresistenz zur Selektion transgener Pflanzen wurde durch Neomycinphosphotransferase (KanR) verliehen.

2.5 Bakterienstämme

<u>Escherichia coli</u>				
DH10B	Invitrogen, Karlsruhe; D			
Genotyp: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS araD139Δ(ara, leu)7697 galU gal	Genotyp: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL nupG			
ElectroTenBlue	Stratagene, Amsterdam, NL			
Genotyp: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ endA1 supE44 thi-1 recA1				
gyrA96 relA1 lac Kanr [F´ proAB	gyrA96 relA1 lac Kanr [F´proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]			
Agrobacterium tumefaciens				
GV3101 (pGV 2260)	Koncz und Schell (1986)			
Genotyp: pmP90 (pTiC58∆T-DNA	A)			

2.6 Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA GmbH, Berlin, D sowie MWG Biotech AG, Martinsried, D ausgeführt. Sequenzanalysen wurden mit der Software Lasergene (DNA Star Inc., Madison, USA) durchgeführt.

2.7 Anzucht von Arabidopsis thaliana

Zur Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkultur wurden die Samen zunächst oberflächensterilisiert, indem sie für 15 min in Sterilisationslösung (5-6 % NaOCl, 0,1 % Triton X-100) inkubiert, zwei- bis dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend in 0,1 % steriler Agarose resuspendiert wurden. Die Samen wurden auf Platten mit 2MS-Medium ausplattiert und zur Vernalisation über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden die Platten in die Gewebekultur (16 h Licht, 140 µmol m⁻² s⁻¹, 22 °C; 8 h Dunkelheit, 22 °C; 70 % Luftfeuchtigkeit) überführt. Nach zirka 14 Tagen wurden die Keimlinge auf Erde (Gartenerde:Vermicult (1:1), gewässert mit 0,15 % (v/v) Previcur und 0,186 % (w/v) Borsäure) pikiert und zum weiteren Wachstum in Klimakammern (16 h Licht, 150 µmol m⁻² s⁻¹, 20 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit; 8 h Dunkelheit, 16 °C, 75 % Luftfeuchtigkeit) gestellt.

Für Hochlicht-Experimente wurden die Pflanzen etwa 6 Wochen lang unter Standardbedingungen angezogen und dann für 4 bis 5 Tage in eine Hochlichtwachstumskammer (16 h Licht, 450 μ mol m⁻² s⁻¹, 22 °C; 8 h Dunkelheit, 18 °C; 70 % Luftfeuchtigkeit) gestellt.

2.8 Molekularbiologische Methoden

Es wurden Standardmethoden (Plasmidpräparation aus *E. coli*, Restriktionsanalysen, Ligation, Transformation in *E. coli* und *A. tumefaciens*, Gelelektrophorese) nach Sambrock *et al.* (1989) oder die Protokolle der eingesetzten Kits verwendet. Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen sowie zum Durchmustern von Mutantenpopulationen wurde Taq-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, D) genutzt.

2.8.1 Isolierung genomischer DNA aus Blättern

Blattmaterial (ca. 100 mg) wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und zerkleinert und mit 500 μ l CTAB-Puffer (140 mM Sorbitol; 220 mM Tris-HCl pH 8,0; 22 mM EDTA; 800 mM NaCl; 1 % Sarkosyl; 0,8 % Cetyltrimethylammoniumbromid; pH 8) versetzt. Die Proben wurden für mindestens 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde 0,2 ml Chloroform zugegeben, gut durchmischt und zentrifugiert (5300 g, 5 min, RT). Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 0,7 ml Isopropanol versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit kaltem 70% igem Ethanol gewaschen und in 100 μ l TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

2.8.2 Northern Blot Analyse

(Logemann et al., 1987)

150 mg Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zerkleinert, mit 500 μl "Z6"-Puffer (8 M Guanidiniumhydrochlorid; 20 mM Morpholinoethansulfonsäure (MES); 20 mM EDTA; pH 7,0; 0,4 % β-Mercaptoethanol (frisch vor Gebrauch zugegeben)) versetzt und gut gemischt. Anschließend wurden 500 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und kräftig gemischt. Nach Zentrifugation (10600 g, 10 min, RT) wurde die obere Phase abgenommen. Die RNA wurde mit 1/20 Volumen 1 M Essigsäure (DEPC-behandelt) und 0,7 Volumen 100 % Ethanol über Nacht bei 4 °C gefällt. Nach 25minütiger Zentrifugation bei 10600 g and 4°C wurde das Pellet einmal mit 250 μl 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde einmal mit 150 μl 3 M Natriumacetat (DEPC-behandelt) (pH 4,8) und weitere zwei Male mit 70 % Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde in 50 μl Wasser (DEPC-behandelt) gelöst. Verunreinigungen in der Probe wurden durch Zentrifugieren für 5 min bei 15300 g entfernt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (260 nm und 280 nm) bestimmt.

Etwa 10 bis 15 µg RNA wurden in 1 x RNA-Probenpuffer (0,8 x MEN [1 x MEN = 20 mM MOPS-NaOH, 5 mM Natriumacetat, 1mM EDTA, pH 7,0], 4,44 % Formaldehyd, 40 % Formamid, 0,1 mg/ml Ethidiumbromid, 0,001 mg/ml Bromphenolblau) gelöst, denaturiert (56 °C, 10 min) und in einem 1,5% igem Agarosegel (1 x MEN, 6 % Formaldehyd, Elektrophoresepuffer: 1 x MEN) elektrophoretisch bei 100 V getrennt. Der Transfer auf die Nylonmembran Hybond N⁺ erfolgte über Nacht in 10 x SSC (1,5 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat). Die RNA wurde anschließend mittels UV-Licht auf der Membran fixiert.

Die Prähybridisierung (Puffer: 250 mM Na₂HPO₄, pH 7,4, 7 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, 1 % BSA, 1 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA, vor Gebrauch frisch denaturiert und dazugegeben) der Membran erfolgte im 60 °C-Wasserbad für etwa 3 h. Als Sonden dienten 20 ng PCR- oder DNA-Fragment, welche mit Hilfe des Kits "Rediprime TM II-random prime labelling system" radioaktiv markiert wurden. Nach Denaturierung (95 °C, 5 min) der markierten Sonde wurde diese in den Prähybridisierungspuffer gegeben und über Nacht bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 2 x SSC, 0,5 % SDS gewaschen und in einer Expositionskasette mit Verstärkerfolie mit einem Film (X-Omat AR Röntgenfilm) bei -70 °C exponiert.

DEPC-Behandlung: Lösungen wurden zuvor 12 h bei 37 °C mit 0,1 % DEPC geschüttelt und anschließend zweimal autoklaviert.

2.8.3 Southern Blot Analyse

Genomische DNA wurde aus etwa 500 mg Blattmaterial wie in 2.12.1 beschrieben isoliert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. 40 μ g DNA wurden anschließend wie folgt über Nacht bei 37 °C verdaut: 50 μ l DNA (= 40 μ g)

1 μl RNase (10 mg/ml) 4 μl HindIII 10 μl Puffer B 50 μl H₂O.

Die DNA wurde dann durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 100 % Ethanol für eine Stunde bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation (20000 g, 5 min) wurde das Pellet einmal in 70 % Ethanol gewaschen, in 20 µl Wasser gelöst und in einem 0,8% igem Agarosegel gelelektrophoretisch getrennt. Der Transfer auf die Nylonmembran Hybond N⁺ erfolgte über Nacht in 0,4 M NaOH. Die Membran wurde am nächsten Tag mit 2 x SSC (0,3 M NaCl, 3 mM Natriumcitrat) zur Neutralisierung gewaschen. Die DNA wurde mittels UV-Licht auf der

Membran fixiert. Die Hybrisierung der Membran erfolgte wie für den Northern Blot in 2.12.2 beschrieben.

2.8.4 Western Blot Analyse

Die Thylakoidproteine wurden mittels SDS-PAGE (12% iges Gel) in Standard-Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS) aufgetrennt und anschließend unter Verwendung des Fastblot-B33/B34 Systems (Biometra) auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran BA85) übertragen. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 20 min in Blockingpuffer (0,3 % Milchpulver; 20 mM Tris HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20) wurde diese anschließend für 1 h in der jeweiligen Antikörper-Lösung inkubiert und dann erneut dreimal für 10 min mit Blockingpuffer gewaschen. Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti-Rabbit-IgG alkalische Phosphatase-Konjugat), welcher in TBST-Puffer (20 mM Tris HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) gelöst war, wurde die Membran dreimal für 20 min mit TBS-Puffer (20 mM Tris HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) gelöst war, wurde die Membran dreimal für 20 min mit TBS-Puffer (20 mM Tris HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) gelöst war, wurde die Membran dreimal für 20 min mit TBS-Puffer (20 mM Tris HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) gelöst war, wurde die Membran dreimal für 20 min mit TBS-Puffer (20 mM Tris HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl) gewaschen. Im Anschluss wurden die Proteine angefärbt, indem die Membran mit NBT/BCIP (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) wie im Protokoll beschrieben behandelt wurde.

2.8.5 Transformation von Arabidopsis thaliana

Durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer wurden transgene *Arabidopsis thaliana* Linien erzeugt. Dafür wurden 400 ml-Übernachtkulturen der Agrobakterien abzentrifugiert (5000g, 30 min, RT) und die Zellen im gleichen Volumen Infiltrationsmedium (5 % (w/v) Saccharose, 0,22 % (w/v) Murashige-Skoog-Medium, 2,5 mM MES-KOH pH 5,7, 44 nm Benzylaminopurin) resuspendiert. 200 ml der Bakteriensuspension, 100 ml Infiltrationsmedium sowie 500 µl Silwett L-77 wurden gemischt. Die Knospen der etwa 6 Wochen alten Pflanzen wurden für zirka 10 sec in die Lösung getaucht. Anschließend wurden die Pflanzen einen Tag liegend gelagert (Clough und Bent, 1998). Nach der Samenreife wurden die Samen auf antibiotikumhaltigem Medium selektioniert.

2.8.6 Biolistische Transformation von Arabidopsis-Blättern

Bei der so genannten biolistischen Transformation werden Goldpartikel mit DNA beladen und mit Hilfe einer Partikelkanone (BioRad, München, D) mit hoher Geschwindigkeit auf das zu transformierende Gewebe geschossen.

60 mg der verwendeten Goldpartikel (BioRad, München, D) wurden dafür zunächst in 1 ml 100 % Ethanol und dann in 1 ml sterilem Wasser gewaschen, zentrifuigert (10000 g, 1min) und anschließend in 1 ml sterilen Wasser resuspendiert. 50 μ l dieser Goldpartikellösung wurden abgenommen und mit 5 μ l DNA (1 μ g/ μ l), 50 μ l 2,5 M CaCl₂ sowie 20 μ l 0,1 M Spermidin unter ständigem Schütteln vermischt. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 sec wurden die Partikel mit 100 % Ethanol gewaschen und in 60 μ l 100 % Ethanol resuspendiert.

Die für die Transformationen notwendigen Macrocarrier, Rupture Disks und Stoppgitter wurden vor Gebrauch in 100 % Ethanol sterilisiert und unter der Sterilbank getrocknet. 10 µl der beladenen Goldpartikel wurden auf die sterilen Macrocarrier pipettiert und unter der Sterilbank getrocknet. Für die Transformation wurden Rosettenblätter vom *Arabidopsis*-Wildtyp Col0 verwendet, welche mit der Unterseite nach oben auf 2MS-Platten gelegt wurden. Der Beschuss der Blätter erfolgte wie im Handbuch der Partikelkanone (Biolistic PSD-1000/He Particle Delivery System) beschrieben. Die beschossenen Blätter wurden für 24 bis 48 h bei 20 °C und Dunkelheit inkubiert und im Anschluss unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Leica TCS SP2 Konfokal Fluoreszenz Mikroskop) untersucht.

2.8.7 Real-Time PCR

Gesamt-RNA wurde wie in 2.8.2 beschrieben nach Logemann *et al.* (1987) isoliert. Abweichend davon wurden etwa 500 mg Blattmaterial verwendet. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt; 5 μ g RNA wurde wie in 2.8.2 beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Qualität der RNA zu überprüfen. Anschließend wurde die RNA mit DNaseI (RNase-frei) wie im Protokoll beschrieben verdaut. 2 μ l der DNAseI verdauten RNA dienten anschließend als Matrize für eine Kontroll-PCR (Primer Actin-F und Actin-R, Annealing 60 °C, Elongation 30 sec), wobei bei vollständig abgebauter DNA kein PCR-Produkt amplifiziert werden konnte. 5 μ g RNA wurden im Folgenden für die cDNA-Synthese verwendet, welche entsprechend des Protokolls mit Hilfe des Kits "SuperScriptIII First Strand Synthesis System" erfolgte. Als Primer dienten die dem Kit beigefügten Random Hexamere. Nach erfolgreicher cDNA-Synthese konnte anschließend mit der oben beschriebenen Kontroll-PCR ein Fragment von etwa 180 bp amplifiziert werden.

Die Real-Time PCR wurde folgendermaßen angesetzt: 5 μl Sybr®Green PCR Master Mix, 1 μl cDNA (1:10 verdünnt), 2 μl Vorwärtsprimer (0,5 pmol/μl), 2 μl Rückwärtsprimer (0,5 pmol/μl). Für die Messungen wurde das RT-PCR-Gerät 7900 HT Fast System verwendet. Das verwendete Programm lautete wie folgt: 50 °C 2 min

50 °C	$2 \mathrm{min}$	
95 °C	10 min	
95 °C	15 sec	J
60 °C	1 min	l
95 °C	15 sec	40 Zyklen
60 °C	15 sec	J
95 °C	15 sec	

Nach Abschluss der Real-Time PCR wurden die Daten mit Hilfe der Programme SDS 2.2.1 (Applied Bioscience) und LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003) ausgewertet. Die Primereffizienzen P_{eff} aller Gene wurden mit Hilfe des Programms LinRegPCR bestimmt. Anschließend wurden Mittelwerte der P_{eff} für jedes untersuchte Gen ermittelt. Die Berechnung der relativen Expression eines jeden Gens in den untersuchten Linien wurde wie folgt durchgeführt:

$$\frac{\sum_{n=1}^{n} [P_{eff}(HKG)]^{MW \Delta C_{t}(HKG)}}{n * [P_{eff}(Gen)]^{MW \Delta C_{t}(Gen)}}$$

n = Anzahl der Haushaltsgene (HKG)

 $\Delta C_t = C_t$ nach Hochlichtstress – C_t vor Hochlichtstress.

Die Standardabweichungen der relativen Expressionen wurden bestimmt, indem in obige Gleichung anstelle der gemittelten ΔC_t -Werte (MW C_t) die gemittelten ΔC_t -Werte zuzüglich bzw. abzüglich der dazugehörigen Standardabweichung (MW $\Delta C_t \pm SD \Delta C_t$) eingesetzt und die dabei erhaltenen Werte voneinander abgezogen wurden. Als Haushaltsgene (HKG) dienten Ubiquitin und das 3'-Ende sowie das 5'-Ende der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

2.9 Biochemische Methoden

2.9.1 Bestimmung des Phyllochinongehalts

Phyllochinonextraktion

• Arabidopsis-Blätter

Für die Extraktion von Phyllochinon aus *Arabidopsis*-Blättern wurde 50 bis 150 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und zerkleinert. Anschließend wurden 800 μ l Isopropanol/Hexan (3:1) sowie 50 μ l des Menachinon-4-Standards (5 ng/ μ l in 100% Ethanol) zugegeben und die Probe gut durchmischt. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 20000 g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet mit 600 µl Hexan ein zweites Mal extrahiert. Zu den vereinigten Überständen wurden 600 µl Methanol/Wasser (9:1) gegeben, kräftig gemischt und für 2 min bei 20000 g zentrifugiert. Die obere Hexanphase wurde in ein Glasröhrchen überführt, bis zur Trockenheit eingeengt, in 100 µl Dichlormethan/Methanol (1:9) aufgenommen und anschließend in HPLC-Röhrchen überführt.

• Tomatenfrüchte

300 bis 600 mg Frischgewicht der Tomatenfrüchte wurden im Vakuum-Konzentrator bei 60 °C eingetrocknet. Anschließend wurde das Trockengewicht der Proben bestimmt. Nach Zugabe von 800 μ l Isopropanol/Hexan (3:1) sowie 50 μ l des Menachinon-Standards (5 ng/ μ l in 100% Ethanol) wurden die Proben in der Schwingmühle (5 min, 25 U/min) zerkleinert und für 2 Minuten bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet wurde ein weiteres Mal mit 600 μ l Hexan extrahiert. Die Überstände wurden vereinigt, mit 600 μ l Methanol/Wasser (9:1) versetzt und gut durchmischt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 20000 g wurde die Hexanphase in ein Glasröhrchen abgenommen, bis zur Trockenheit unter einem Luftstrom eingeengt und in 100 μ l Dichlormethan/Methanol (1:9) aufgenommen. Die Extrakte wurden anschließend in HPLC-Röhrchen überführt.

Quantifizierung von Phyllochinon mittels HPLC

(Jakob und Elmadfa, 1996)

Die Messung von Phyllochinon erfolgte in einer HPLC mit Nachsäulen-derivatisierung. Mittels Autoinjektor wurden 20 μ l des Phyllochinon-Extrakts auf eine Umkehrphasensäule (Europhos-100-C18, 250 x 4,6 mm) injiziert. Hinter dieser Säule befand sich eine zweite, 3 cm lange Säule, welche mit Zinkpulver (Korngröße 63 μ m) gefüllt war. Die Zinksäule diente zur Reduktion der Chinone, da diese nur in reduziertem Zustand durch Fluoreszenz detektierbar sind. Die Phyllochinonprobe wurde innerhalb von 15 min bei einer Flussrate von 1 ml/min und 40 °C isokratisch eluiert. Als Elutionsmittel diente Dichlormethan/Methanol (1:9), welches mit 5 ml einer methanolischen Lösung - bestehend aus 1,37 g Zinkchlorid, 0,41 g Natriumacetat und 0,3 ml Essigsäure – versetzt wurde. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor (Excitation 243 nm, Emission 430 nm). Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des internen Standards Menachinon-4 (Abb. 10)


Abb. 10: Chromatografische Trennung von Vitamin K1 und K2

Gezeigt ist der Separationslauf eines Dichlormethan/Methanol-Extrakts aus *Arabidopsis*-Wildtyp Blättern. Zu sehen sind zwei Peaks: Menachinon-4 (Vitamin K₂) mit einer Retentionszeit von etwa 9,5 min sowie Phyllochinon (Vitamin K₁), welches zirka 4 min später eluiert wird.

2.9.2 Bestimmung photosynthetischer Pigmente

Extraktion photosynthetischer Pigmente

• Arabidopsis-Blätter

Das Blattmaterial (40 bis 100 mg) wurde in flüssigem Stickstoff zerkleinert und mit 500 μ l 80% igem Aceton versetzt. Die Proben wurden gut durchmischt und für 5 min bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zwei weitere Male mit je 500 μ l 100% igem Aceton extrahiert. Die Überstände wurde vereinigt und erneut zentrifugiert (5 min, 20000 g). 200 μ l des Pigmentextrakts wurden anschließend in ein HPLC-Röhrchen überführt

• Tomatenfrüchte

300 bis 600 mg der Tomatenfrüchte wurden geerntet. Das Trockengewicht der im Vakuum-Konzentrator bei 60 °C getrockneten Proben wurde bestimmt. Nach Zugabe von 500 μ l Lösungsmittel (Hexan/Chloroform/Methanol/Aceton (5:2:2:1)) wurden die Proben für 5 min und 25 U/min in der Schwingmühle zerkleinert und anschließend bei 20000 g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet zwei weitere Male mit je 500 μ l Lösungsmittel extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden mit 500 μ l Wasser versetzt, gut durchmischt und erneut zentrifugiert. Von der oberen organischen Phase wurden dann 200 μ l in ein HPLC-Röhrchen überführt.

Quantifizierung der Pigmente mittels HPLC

(Thayer und Björkmann, 1990)

• Arabidopsis-Blätter

Mit Hilfe eines Autoinjektors wurden 20 μ l des Pigmentextrakts auf eine Umkehrphasensäule (Nucleosil-120-C18, 250 x 3 mm) injiziert und bei einer Flussrate von 0,4 ml/min und 30 °C mit folgendem Lösungsmittelgradienten eluiert:

- 0 25 min linearer Gradient von 100 % Puffer A auf 100% Puffer B
- 25 28 min linearer Gradient von 100% Puffer B auf 100% Puffer A

29 – 38 min 100% Puffer A

Postrun 7 min

Die Substanzen wurden anschließend mittels UV/Vis-Detektor bei 440 nm detektiert. Die Quantifizierung der Pigmente erfolgte mit Hilfe von Eichgeraden, welche zuvor erstellt wurden (Abb. 11).

• Tomatenfrüchte

Mit Hilfe eines Autoinjektors wurden 10 μ l des Pigmentextrakts auf eine Umkehrphasensäule (YMC-Pack ODS-A, 250 x 4,6 mm) injiziert und bei einer Flussrate von 0,75 ml/min und 30 °C mit folgendem Lösungsmittelgradienten eluiert:

0 – 5 min	100% Puffer A
5 – 20 min	100% Puffer B
20 – 30 min	100% Puffer A

Die Substanzen wurden anschließend mittels UV/Vis-Detektor bei 440 nm detektiert. Die Quantifizierung der Pigmente erfolgte mit Hilfe von Eichgeraden, welche zuvor erstellt wurden.

Puffer A: Acetonitril/Methanol/0,1 M Tris-HCl, pH 8 (72:8:3)

Puffer B: Methanol/Ethylacetat (68:32)



Abb. 11: Chromatografische Trennung photosynthetischer Pigmente

Gezeigt ist der Separationslauf eines Pigmentextrakts aus Arabidopsis-Wildtyp Blättern: 1 Neoxanthin, 2 Violaxanthin, 3 Antheraxanthin, 4 Lutein, 5 Zeaxanthin, 6 Chlorophyll b, 7 Chlorophyll a, 8 β -Carotin, 9 Lycopin (in roten Tomatenfrüchten, nicht aber in Arabidopsis-Blättern vorhanden).

2.9.3 Salicylatbestimmung

Salicylatextraktion

(Nawrath und Métraux, 1999)

200 bis 400 mg Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff zerkleinert und anschließend in 3 ml Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von 3 μ g o-Anisinsäure als internem Standard wurde die Probe gut durchmischt und 10 min bei 4 °C und 2500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in verschließbare Glasröhrchen überführt, das Pellet erneut mit 1 ml Methanol extrahiert. Im Anschluss wurden die vereinigten Überstände unter einem Luftstrom bis zur Trockenheit eingeengt. Nach Zugabe von 2 ml Wasser sowie 1 ml 37 % HCl wurden die Proben verschlossen und für 1 h im 80 °C-Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen der Proben wurden diese mit 2 ml Ethylacetat/Hexan (1:1) versetzt, gut gemischt und für 2 min bei 800 g zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, die untere erneut mit 1 ml Ethylacetat/Hexan (1:1) extrahiert. Die vereinigten oberen Phasen wurden dann im Luftstrom bis zur Trockenheit eingeengt, in 60 μ l Acetonitril aufgenommen und zur Analyse in HPLC-Röhrchen überführt.

Quantifizierung von Salicylat mittels HPLC

(nach Dewdney et al., 2000)

30 µl der Probe wurden mittels Autoinjektor auf die Säule (Supelcosil[™] ABZ+Plus, 250 x 4,6 mm) injiziert und bei einer Flussrate von 1 ml/min und 27 °C mit folgendem Lösungsmittelgradienten eluiert:

0 – 1 min	85 % Puffer A, 15 % Puffer B	
1 – 6 min	linearer Gradient von 85 % Puffer A auf 80 % Puffer A	
6 – 16 min	80 % Puffer A, 20 % Puffer B	
16 – 25,5 min	linearer Gradient von 80 % auf 45 % Puffer A	
25,5 – 30,5 min	linearer Gradient von 45 % auf 10 % Puffer A	
30,5 – 32 min	linearer Gradient von 10 % auf 100 % Puffer A	
32 – 33 min	linearer Gradient von 100 % auf 85 % Puffer A	
Postrun 4 min		
Puffer A: Wasser pH 2,6 (mit Phosphorsäure eingestellt)		
Puffer B: Acetonitril		

Die Substanzen wurden anschließend mittels Fluoreszenzdetektor detektiert (Salicylat: Excitation 305 nm, Emission 407 nm; o-Anisinsäure: Excitation 305 nm, Emission 365 nm). Die Quantifizierung von Salicylat erfolgte mit Hilfe des internen Standards o-Anisinsäure (Abb. 12).





Gezeigt ist der Separationslauf zweier Substanzen: Des internen Standards o-Anisinsäure mit einer Retentionszeit von etwa 15 min sowie Salicylat, welches nach etwa 28 min eluiert wird.

Qualitativer Nachweis von Salicylat mittels GC-MS

Für den qualitativen Nachweis von Salicylat mit Hilfe des GC-MS wurde Salicylat wie zuvor beschrieben aus Blättern isoliert. Die bis zur Trockenheit eingeengten Proben wurden durch Zugabe von 50 μ l MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid) für 1 h bei 80 °C im Wasserbad silyliert, anschließend im Luftstrom getrocknet, in 40 μ l Hexan aufgenommen und in GC-Röhrchen überführt. Der Salicylat-Standard (1 μ g) wurde ebenfalls bis zur Trockenheit eingeengt und wie beschrieben mittels MSTFA silyliert. 1 μ l der Probe wurde auf die Säule (Agilent HP-5MS) injiziert, wobei die Inlet-Temperatur 260 °C und der Helium-Strom 5,1 ml pro min betrugen. Die Säule hatte eine Anfangstemperatur von 80 °C und wurde dann mit 1 °C pro min auf 180 °C erhöht. Diese Temperatur wurde für 1 min gehalten und anschließend mit 20 °C pro min wieder auf die Ausgangstemperatur von 80 °C abgekühlt.

2.9.4 Tocopherolbestimmung

Tocopherolextraktion

Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und gut zerkleinert. Nach Zugabe von 1 ml Diethylether, 0,3 ml Puffer (1 M KCl/ 0,2 M H₃PO₄) sowie 500 ng Tocol als internem Standard zur Quantifizierung von Tocopherol wurde die Probe gut durchmischt und anschließend bei 4 °C, 14000 *g* für 5 min zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde in ein Reagenzglas überführt, die untere Phase weitere zwei Male mit je 0,5 ml Diethylether extrahiert. Die Überstände wurden vereinigt und unter Luftstrom bis zur Trockenheit eingeengt. Die Proben wurden anschließend in 100 µl Hexan aufgenommen und in HPLC-Röhrchen überführt.

Quantifizierung von Tocopherol

(Balz et al., 1992)

Mit Hilfe eines Autoinjektors wurden 20 μ l des Tocopherol-Extraktes auf die Säule (LiChrospher 500-Diol, 250 x 3 mm) injiziert. Tocopherole wurden mit 4 % (v/v) Tertiärbutylmethylether in Hexan bei einer Flussrate von 0,75 ml/min isokratisch innerhalb von 40 Minuten eluiert und mittels Floureszenzdetektor (Excitation 290 nm, Emission 330 nm) detektiert. Die Quantifizierugn erfolgte mit Hilfe des internen Standards Tocol.

2.9.5 Anthocyaninbestimmung

(Lange und Mohr, 1971)

In flüssigem Stickstoff gefrorenes und zerkleinertes Blattmaterial wurde mit 1 ml Lösungsmittel (1-Propanol/HCl_{konz}/Wasser (18:1:41)) versetzt und für 3 min bei 100 °C gekocht. Nach zweistündiger Inkubation in Dunkelheit wurden die Proben für 5 min bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Die Messung der Anthocyanine erfolgte photometrisch bei Wellenlängen von 535 nm und 650 nm. Die Anthocyaninkonzentration ($\Delta E/g$ FG) wurde anschließend mit folgender Formel bestimmt:

 $(E_{535nm} - 2*E_{650nm})/g$ Frischgewicht.

2.9.6 Chlorophyllbestimmung

(Porra et al., 1989)

Gefrorenes Blattmaterial wurde zusammen mit 80% (v/v) Aceton in einem Porzellanmörser zerkleinert. Der Extrakt wurde für 2 min bei 10000 g abzentrifugiert. Die Extinktion bei den Wellenlängen 750 nm, 646,6 nm und 663,6 nm wurde photometrisch ermittelt. Der bei 750 nm gemessene Wert diente als Korrektur für die bei λ =663,6 nm und λ =646,6 nm ermittelten Extinktionen. Der Chlorophyllgehalt wurde nach folgender Formel berechnet:

Chlorophyll a $[\mu g/ml] = 12,25 \; (E_{663,6}) \; \text{-}2,55 \; (E_{646,6})$

Chlorophyll b $[\mu g/ml] = 20,31 (E_{646,6}) - 4,91 (E_{663,6})$

2.9.7 Charakterisierung des Photosyntheseapparates

Thylakoid-Isolation

Pflanzen wurden für etwa 20 h in Dunkelheit gestellt, um den Stärkegehalt in den Blättern zu minimieren. Die Thylakoide wurden anschließend nach Schöttler *et al.* (2004) aus den Rosettenblättern isoliert. Die Bestimmung des Chlorophyllgehalts der Thylakoide erfolgte wie in 2.9.5 beschrieben.

77K-Chlorophyll-a-Fluoreszenz

77K-Chlorophyll-a-Fluoreszenz-Emissionsspektren der isolierten Thylakoide (10 μ g/ml) wurden bei Wellenlängen von 660 bis 800 nm in 0,5 nm Intervallen mit Hilfe des F6500 Fluorometers (rotsensitiver Photomultiplier) gemessen. Die Anregung der Thylakoide erfolgte bei einer Wellenlänge von 430 nm. Die Spektren wurden bei der Auswertung auf das Fluoreszenzmaximum von PSII (λ =685 nm) normiert.

Quantifizierung von Photosystem I, Photosystem II und Cyt-b₆/f-Komplex (Kirchhoff *et al.*, 2002)

Die Gehalte an PSI, PSII und Cyt-b₆/f-Komplex wurden mittels Differenzabsorptionsspektroskopie bestimmt, mit der das unterschiedliche Absorptionsverhalten spezifischer Chromophore in verschiedenen Redoxzuständen gemessen werden kann.

Die Quantifizierung von PSI, PSII und Cyt-b₆/f-Komplex erfolgte an isolierten Thylakoiden entsprechend eines Chlorophyllgehalts von 50 μ g/ml. Zur PSI-Bestimmung wurden die Thylakoide in Medium (0,2 % (w/v) β -Dodecylmaltosid, 10 mM KCl, 30 mM HEPES pH 7,6) gelöst. 10 mM Ascorbat wurde als Elektronendonor eingesetzt, damit P₇₀₀ in Dunkelheit in vollständig reduziertem Zustand vorliegt. Mit Hilfe eines sättigenden roten Lichtpulses (2000 μ mol m⁻² s⁻¹, 200 ms) wurde P₇₀₀ photooxidiert, wobei 100 μ M Methylviologen als Elektronenakzeptor diente. Aus dem resultierenden Differenzabsortionssignal wurde der PSI-Gehalt berechnet:

 $c=E/(e^*d)$ mit $e_{(P_{700} bei \lambda=810 nm - 870 nm)} = 6,0 cm^2/\mu mol und d=1 cm.$

Für die Quantifizierung von PSII und Cyt-b₆/f-Komplex wurden die Thylakoide zunächst in Niedrigsalzmedium mit 0,03 % (w/v) β -Dodecylmaltosid entstapelt. Die Cytochrome wurden durch 1mM Ferricyanid oxidiert und anschließend durch Zugabe von 10 mM Ascorbat reduziert. Dies führte zur Reduktion von Cyt-f und der Hochpotentialform (HP) von Cytochrom-b559. Durch Zugabe von 10 mM Dithionit wurde dann Cytochrom-b6 und die Niedrigpotentialform (LP) von Cytochrom-b559 reduziert. Für jedes Redoxpotential wurden die Absorptionsspektren zwischen den Wellenlängen von 575 und 540 nm mit Hilfe des J-550 Spektrophotometers aufgezeichnet. Mittels Differenzabsorptionskoeffizienten für die Cytochrome und Referenzspektren wurden die Differenzabsorptionsspektren mathematisch angepasst und entfaltet. Bei der Berechnung der Cytb₆/f-Konzentration wurde berücksichtigt, dass pro Komplex zwei Cyt-b₆ und ein Cyt-f vorliegen. Die Bestimmung der PSII-Gehalte wurden aus der Summe der Differenzabsorptionsspektren von HP und LP berechnet (Lamkemeyer *et al.*, 2006).

Bestimmung der PSI-Elektronentransferrate

(Izawa, 1980)

Die Aktivität des PSI-Elektronentransfers wurde an isolierten Thylakioden bestimmt. Dafür wurde der Sauerstoffverbrauch in kontinuierlichem, weißen Licht (5000 μ mol m⁻² s⁻¹) mit Hilfe einer Clark-Elektrode aufgezeichnet. Zu diesem Zweck wurde durch Zugabe von 100 μ M DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff) das PSII inhibert. Der Elektronentransport ausgehend vom künstlichen Elektronendonor Ascorbat (10 mM) über der Mittler TMPD (100 μ M

Tetramethylphenylendiamin) und Plastocyanin zum PSI wurde gemesssen. 100 μ M Methylviologen wurden als Elektronenakzeptor dazugegeben, wodurch Sauerstoff (O₂) zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) reduziert wurde. Die Aktivität der Katalase wurde durch Zugabe von 1 mM Natriumazid NaN₃ inhibiert, so dass die Aktivität des PSI anhand der O₂-Reduktion ermittelt werden konnte.

Bestimmung von photochemisch aktivem Photosystem I

Der Gehalt an photochemisch aktivem PSI wurde bestimmt, indem die durch Photooxidation von P_{700} entstandenen Transmissionsänderungen bei λ =810 bis 870 nm in *Arabidopsis*-Blättern ermittelt und mit den Transmissionsänderungen von Plastocyanin, gemessen bei λ = 870 bis 950 nm, korrigiert wurden (Abb. 13). Das dabei angewandte Messprinzip basiert auf Kirchhoff *et al.* (2004), modifiziert durch M. A. Schöttler, C. Klughammer und U. Schreiber (Schöttler *et al.*, 2007). Für die Messungen wurde das Gerät Dual Pam-S verwendet, welches die gleichzeitige Messung der Transmissionssignale von P_{700} und Plastocyanin ermöglicht. Anschließend wurde in dem für die Messungen genutzten Blattsegment der Chlorophyllgehalt bestimmt, und die ermittelten Transmissionsänderungen wurden auf 1 mg Chlorophyll normalisiert.





Die durch Photooxidation von P_{700} entstandenen Transmissionsänderungen bei Wellenlängen von 810 nm bis 870 nm wurden ermittelt und um die Transmissionsänderungen von Plastocyanin bei Wellenlängen von 870 nm bis 950 nm korrigiert (nach M. A. Schöttler).

Bestimmung der PSII-Quantenausbeute

(Schreiber et al., 1986)

Die Messung der *in vivo* Chlorophyll-Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Puls-Amplituden-Modulationsfluorimeters (Imaging PAM) an dunkeladaptierten Pflanzen. Dabei wurde ein Blatt sukzessive jeweils für 5 min photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR) steigender Intensität (10 Intensitätsstufen von 0 bis 1200 μ mol m⁻² s⁻¹) ausgesetzt. Vor jeder Änderung der Lichtintensität wurde ein sättigender, aktinischer Lichtpuls appliziert, um F_m, zu bestimmen. Die PSII-Quantenausbeute wurde berechnet durch (F_m - F_t)/F_m, wobei F_m die Fluoreszenz während und F_t die Fluoreszenz vor einem Lichtimpuls ist.

2.9.8 [1-³H]-Phytol-Fütterung

Arabidopsis-Pflanzen wurden unter Standardbedingungen angezogen. Zirka drei Wochen alte Keimlinge (~ 150 mg) wurden in Flüssigmedium (20 mM MES, pH 6,5; 0,2 % (v/v) Tween 80, supplementiert mit 150 pmol [1-³H]-Phytol) über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Keimlinge dreimal mit Flüssigmedium gewaschen, trocken getupft und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das mit Hilfe einer Schwingmühle zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde mit 500 μ l 0,9 % NaCl und 500 μ l Chloroform/Methanol (2:1) versetzt, gut durchmischt und bei 10000g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Glasröhrchen überführt, das Pellet wurde weitere zwei Male mit 500 μ l Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert. Die Überständen wurden vereinigt, im Stickstoffstrom bis zur Trockenheit eingeengt und in 40 μ l Chloroform/Methanol (2:1) gelöst. Die so isolierten Lipide wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Als Laufmittel diente ein Hexan-Diethylether-Essigsäure-Gemisch (85:15:1). Die Identifizierung der radioaktiv markierten Lipide erfolgte durch Komigration nicht radioaktiver Standards, die Visualisierung wie im Handbuch beschrieben mit Hilfe des ß-Scanners (Automatic TLC Analyzer).

2.9.9 Isolierung und Lipidanalysen von Chloroplastenfraktionen

Isolierung der Chloroplastenfraktionen

(Vidi et al., 2006)

Chloroplasten aus homogenisierten *Arabidopsis*-Blättern wurden durch Einfrieren für etwa 2 h bei -70 °C aufgebrochen, mit Hilfe eines Glasmörsers homogenisiert und anschließend in einem Saccharose-Gradienten (5 % bis 38 %) durch Zentrifugation fraktioniert. Durch Western Blot Analysen wurde die Verteilung von Plastoglobuli, Hüllmembranen und Thylakoiden in den einzelnen Fraktionen bestimmt und diese dementsprechend zu fünf Fraktionen vereinigt. Die Fraktionen F1 und F2 enthielten hauptsächlich Plastoglobuli, die Fraktion F3 zumeist Hüllmembranen und geringe Mengen an Thylakoiden, die Fraktion 4 hauptsächlich Thylakoide und wenige Hüllmembranen, die Fraktion F5 bestand überwiegend aus Thylakoiden.

Lipidextraktion

In die für die Extraktion verwendeten Glasröhrchen wurden zuvor 250 ng Menachinon-4 für die Phyllochinonmessungen sowie 5 μ g Pentadecansäure (15:0) für die Analysen der Fettsäuren als Standards vorgelegt und bis zur Trockenheit im Stickstoffstrom eingeengt. 500 μ l der verschiedenen Chloroplastenfraktionen wurden in die so vorbereiteten Glasröhrchen gegeben, mit 1 ml Chloroform/Methanol/Ameisensäure (1:1:0,1) versetzt und kräftig durchmischt. Nach 3minütiger Zentrifugation bei 800 g wurde die organische Phase abgenommen und die Probe weitere zwei Male mit 1 ml Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und im Stickstoffstrom bis zur Trockenheit eingeengt. Für die Messung von Phyllochinon wurden die Proben anschließend in 100 μ l Dichlormethan/Methanol (1:9) aufgenommen und in HPLC-Röhrchen überführt.

Fettsäurequantifizierung mittels Gaschromatographie

(Browse et al., 1986)

Für die Fettsäurebestimmung wurden die eingeengten Lipidextrakte mit 1 ml 1 N methanolischer HCl versetzt und im Wasserbad (80 °C, 20 min) inkubiert, wodurch die Fettsäuren methyliert wurden. Zu den abgekühlten Proben wurden 1 ml 0,9 % NaCl und 1 ml Hexan pipettiert, alles kräftig gemischt und bei 800 g für 3 min zentrifugiert. Die Hexanphase wurde abgenommen, im Stickstoffstrom eingeengt und in zirka 80 μl Hexan aufgenommen. Nach Überführen in GC-Röhrchen wurden 2 μl der Probe in einem Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor analysiert. Die Injektortemperatur lag bei 220 °C, die des Detektors bei 250 °C. Die Flussrate des Trägergases Helium war 11 ml pro min. Die Kapillarsäule hatte eine Ausgangstemperatur von 100 °C, die 1 min lang gehalten wurde, um dann innerhalb von 2,4 min auf 160 °C, anschließend innerhalb von 6 min auf 220 °C erhöht zu werden. Diese Temperatur wurde 4 min gehalten, dann wurde die Säule in 5 min wieder auf 100 °C abgekühlt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Chemstation (Agilent, Böblingen, D).

3 Ergebnisse

3.1 Die Isochorismatsynthase ist ein kritischer Schritt für die Phyllochinon- und Salicylatbiosynthese

Der erste Schritt der Phyllochinon-Biosynthese, die Umwandlung von Chorismat in Isochorismat, wird durch das Enzym Isochorismatsynthase (AtmenF) katalysiert, für welches in *Arabidopsis* zwei Gene kodieren: ICS1 (At1g74710) und ICS2 (At1g18870). Weiterhin existiert eine verkürzte Form der Isochorismatsynthase, PHYLLO-ICS, die nur zum N-terminalen Bereich der beiden anderen Gene Sequenzähnlichkeiten aufzeigt (Gross *et al.*, 2006). Isochorismat ist zudem Vorläufermolekül für die Biosynthese von Salicylat, einem wichtigen Mittler in der Abwehr von Pathogenen (Wildermuth *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit soll zum einen untersucht werden, ob die Doppelmutante *ics1ics2* noch Phyllochinon synthetisieren kann und damit das dritte, verkürzte ICS-Gen PHYLLO-ICS eventuell funktionell aktiv ist. Zum anderen soll analysiert werden, ob in *ics1ics2* noch Salicylat akkumuliert, um damit die Fragen zu klären, ob neben *ICS1* auch *ICS2* an der Sylicylatbiosynthese beteiligt ist, und ob Saliclyat in *Arabidopsis* auch über den PAL-Weg gebildet werden kann.

3.1.1 Isolierung der phyllochinonfreien Doppelmutante ics1ics2

Isochorismat, welches durch die Aktivität einer Isochorismatsynthase aus Chorismat gebildet wird, ist Zwischenprodukt der Phyllochinon- und Salicylatbiosynthse. Die Mutante *ics1* (*sid2-1*), welche durch Behandlung mit Ethylmetahnsulfonat (EMS) generiert wurde, konnte auf Grund ihrer Salicylatdefizienz isoliert werden (Nawrath und Métraux, 1999). Sie weist in der Chorismat bindenden Domäne einen Basenaustausch von C zu T auf, wodurch ein Stoppcodon entsteht (Wildermuth *et al.*, 2001). Die homozygote Mutante *ics2* wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit aus der T-DNA-Insertionslinie SALK_084635 isoliert (Lohmann, Diplomarbeit 2005). Dass das Gen ICS1 innerhalb der Phyllochinon-Biosynthse die Hauptaktivität besitzt, konnte in früheren Experimenten bewiesen werden, in denen gezeigt wurde, dass der Gehalt an Phyllochinon in *ics1* etwa 50

% dessen im Wildtyp entspricht, während in *ics2* keine Veränderungen ermittelt werden konnten.

Durch Kreuzen der beiden Einzelmutanten *ics1* und *ics2* sollte eine doppelt homozygote Mutante icslics2 erzeugt werden. In den auf Erde angezogenen F2-Nachkommen der Kreuzung ics1 x ics2 konnten zunächst keine homozygoten Doppelmutanten gefunden werden. In den Kreuzungsnachkommen wurde anschließend mit Hilfe des Primers PD596 der Abschnitt der genomischen DNA sequenziert, der für das Gen ICS1 kodiert. Es konnte gezeigt werden, dass in der Chorismat bindenden Domäne des Gens ICS1 der Basenaustauch von C nach T vorhanden ist, d.h. alle untersuchten Nachkommen waren homozygot für ics1 (Abb. 14A). Mittels Southern Blot sollte im Anschluss getestet werden, ob die Kreuzungsnachkommen die T-DNA-Insertion SALK_084635 nur in einem oder in beiden Allelen des Gens ICS2 tragen. Dafür wurde genomische DNA aus verschiedenen Nachkommen der Kreuzung *ics1* x *ics2* isoliert, mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit der ³²P-markierten Sonde PHYLLO-ICS hybridisiert. Im Wildtyp wurden zwei Fragmente mit den ungefähren Größen 4,6 kb und 5,2 kb erwartet, in der homozygoten T-DNA-Insertionsmutante 3 Fragmente von zirka 5,2 kb, 6,5 kb und 2,5 kb (Abb. 14B). Alle durchmusterten Nachkommen trugen entweder das Wildtypallel ICS2/ICS2 (# 16, 18) oder waren heterozygot ics2/ICS2 (Abb. 14C).

Da alle auf Erde angezogenen Nachkommen zwar homozygot für *ics1*, jedoch heterozygot für *ics2* waren, wurden im nächsten Schritt die Kreuzungsnachkommen nicht auf Erde, sondern auf 2MS-Platten angezogen. Unter den auf diese Weise gewachsenen Pflanzen konnten mittels PCR doppelt homozygote Mutanten *ics1ics2* identifiziert werden. Wie Abb. 14D zeigt, konnte sowohl in der Pflanze I als auch in II mit Hilfe des Primerpaars PD703/PD300 eine etwa 800 bp große Bande amplifiziert werden, die spezifisch für die T-DNA-Insertion SALK_084635 ist. Eine PCR mit den Primern PD702/PD703, die spezifisch für das Gen ICS2 sind, führte nur in Pflanze II zu einem etwa 1100 bp großen Produkt, nicht aber in Pflanze I. Da die Homozygotie dieser Pflanzen für *ics1* bereits zuvor mittels Sequenzierung bestätigt wurde, ist Pflanze I somit doppelt homozygot *ics1/ics1 ics2/ics2*, Pflanze II heterozygot für *ics2* und homozygote Fflanze I ist im Wachstum deutlich reduziert und zeigt eine gelblich-grüne Blattfarbe, während Pflanze II ics1/ics1 ics2/ICS2 wie Wildtyp aussieht (Abb. 14E).

Wie bereits meiner Diplomarbeit beschrieben, unterscheiden in sich die Phyllochinongehalte im Wildtyp und in der Mutante *ics2* mit 4,6 bzw. 4,2 µg g⁻¹ FG nicht signifikant, während die Menge an Phyllochinon in der Mutante *ics1* mit etwa 1,6 μ g g⁻¹ FG auf 40 % des Wildtyp-Wertes reduziert ist. Messungen in der Doppelmutante icslics2 (Pflanze I) zeigten, dass diese völlig frei von Phyllochinon ist, während Pflanze II, welche homozygot für ics1 und heterozygot für ics2 ist, noch immer Phyllochinon akkumuliert (Abb. 14F). Der Gehalt entspricht jedoch mit etwa 0,85 μ g g⁻¹ FG nur noch etwa 50 % des Wertes in der Mutante ics1, was darauf hindeutet, dass bereits eine heterozygote Mutation des Gens ICS2 zu einem teilweisen Verlust der ICS2-Aktivität führt. Durch Ausschalten beider Isochorismat-Gene ICS1 und ICS2 kann der Biosyntheseweg von Phyllochinon vollständig blockiert werden.



WT ics2 ics1 x ics2 #11 #13 #15 #16 #18 #20 #24

2000



Abb. 14: Screening nach einer doppelt homozygoten Isochorismat-Mutanten ics1ics2

- A Ausschnitt aus der Sequenzierung der Kreuzungsnachkommen *ics1* x *ics2*. Die Nachkommen sind homozygot für die Mutation *ics1*.
- B Lage der T-DNA-Insertion SALK_084635 sowie der HindIII-Restriktionsschnittstellen im Bereich des Gens ICS2. Restriktionsverdau mit HindIII führt im WT zu zwei Fragmenten mit ungefähren Größen von 4,6 kb und 5,2 kb; in der homozygoten T-DNA-Insertionsmutante entstehen 3 Fragmente von zirka 5,2 kb, 6,5 kb und 2,5 kb.
- C Dargestellt ist mit HindIII geschnittene genomische DNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Hybrisierung mit der radioaktiv markierten Sonde PHYLLO-ICS (s. Absatz 2.4). Alle Nachkommen sind entweder heterozygot für *ics2* (# 11, 12, 12, 20, 24) oder zeigen das WT-Bandenmuster (# 16, 18).
- D Amplifizierung eines für das Gen ICS2 (PD702/PD703) sowie eines für die T-DNA-Insertion SALK_084635 (PD300/PD703) spezifischen Fragments mittels PCR: Die Pflanze I ist homozygot für die Insertion SALK_084635, Pflanze II heterozygot.
- E Sichtbarer Phänotyp: Die Doppelmutante *ics1ics2* (I) ist deutlich kleiner als die heterozygote Mutante (II) und zeigt gelblich-grüne Blätter gelblich, während die heterozygote Mutante kräftig grüne Blätter hat.
- F Bestimmung des Phyllochinongehalts in den Linien WT, *ics1, ics2* sowie *ics1/ics1 ics2/ICS2* und *ics1/ics1 ics2/ics2* mittels HPLC. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus Fünffachbestimmungen (siehe auch Tab. I). Die mit * gekennzeichneten Werte sind nach Student's t-Test signifikant verschieden (p<0,05).

3.1.2 Überexpression der verkürzten ICS-Domäne PHYLLO-ICS führt nicht zur Komplementation von *ics1*

Neben den beiden Genen ICS1 und ICS2, die beide eine Isochorismatsynthase kodieren, existiert in *Arabidopsis* eine dritte, verkürzte Form der Isochorismatsynthase (Lohmann, Diplomarbeit, 2005). Gross *et al.* (2006) konnte zeigen, dass das *Arabidopsis*-Gen PHYLLO vier Gene des Phyllochinon-Biosyntheseweges vereinigt, welche den Genen menF (N-terminaler Bereich von ICS), menC, menD und menH aus *Synechocystis* entsprechen. Die ICS-Domäne des Gens PHYLLO ist dabei verkürzt und zeigt nur zum N-terminalen Bereich der Isochorismatsynthase-Gene ICS1 und ICS2 Homologien (Abb. 15). Dieser Teil des Gens PHYLLO soll im Folgenden als PHYLLO-ICS bezeichnet werden.



Abb. 15: Struktur des Gens PHYLLO (Schematische Darstellung)

Im Gen PHYLLO aus *Arabidopsis* sind vier Gene des Phyllochinon-Biosyntheseweges fusioniert: AtmenF (ICS 5'), AtmenC, AtmenD und AtmenH. Die ICS-Domäne ist verkürzt. Sie zeigt nur zum N-terminalen Bereich der Isochorismatgene ICS1 und ICS2 Sequenzhomologien. Die eingezeichneten Primer PD644 und PD645 wurden zum Klonieren der ICS-Domäne in den binären Vektor pBinAR genutzt.

Untersucht werden sollte, ob diese verkürzte ICS-Domäne funktionell aktiv ist und die Mutante *ics1* komplementieren kann. Dafür wurde mit Hilfe der Primer PD644 und PD645 die verkürzte ICS-Domäne aus dem cDNA-Klon RAFL09-78-P20 amplifiziert und in den Vektor pBinAR kloniert. Das auf diese Weise klonierte Konstrukt pBinAR-*PHYLLO-ICS* wurde anschließend mittels *Agrobacterium* in die Mutante *ics1* transformiert. Die Selektion transgener Pflanzen erfolgte mit Hilfe der durch das Konstrukt vermittelten Kanamycinresistenz. Mittels Northern Blot konnte im Anschluss gezeigt werden, dass in allen transformierten und selektionierten Nachkommen das Transkript des Gens PHYLLO-ICS stark expremiert wird, wohingegen in der Mutante *ics1* als auch im Wildtyp kein Transkript nachgewiesen werden konnte (Abb. 16A). Als Sonde für den Northern Blot diente die aus dem cDNA-Klon RAFL09-78-P20 amplifizierte ICS-Domäne PHYLLO-

ICS. Anschließende Messungen des Phyllochinongehalts per HPLC ergaben in den das Gen PHYLLO-ICS überexpremierenden Linien ähnliche Gehalte wie in der Mutante *ics1*, d.h. geringere Phyllochinonmengen, als sie im Wildtyp gemessen werden können (Abb. 16B). Die verkürzte Domäne PHYLLO-ICS kann die Phyllochinon-Defizienz von *ics1* nicht komplementieren.



Abb. 16: Überexpression von PHYLLO-ICS in *ics1* führt nicht zur Komplementation

- A Northern Blot: Gesamt-RNA aus Blättern wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die 25S rRNA-Bande im Agarosegel diente als Ladungskontrolle. Die Hybridisierung erfolgte mit der radioaktiv markierten Sonde PHYLLO-ICS. Eine Überexpression von PHYLLO-ICS ist in allen untersuchten Linien deutlich zu erkennen.
- B Phyllochinongehalte wurden per HPLC mit Nachsäulenreduktion bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus Dreifachbestimmungen sowie der Linien # 1, 2, 5, 8 und 10, welche laut Northern Blot (A) PHYLLO-ICS überexpremieren (siehe auch Tab. II)

3.1.3 Salicylatbestimmung in der Doppelmutante icslics2

Isochorismat, welches in *Arabidopsis* durch die Aktivität der Isochorismatsynthasen ICS1 und ICS2 aus Chorismat gebildet wird, ist Intermediat des Phyllochion-Biosyntheseweges, aber auch Vorläufermolekül für die Synthese von Salicylat. Wildermuth *et al.* (2001) hat gezeigt, dass in der *Arabidopsis*-Mutante *ics1*, die eine Punktmutation in der Chorismat

3 Ergebnisse

bindenden Domäne des Gens ICS1 trägt, im Gegensatz zum Wildtyp die Biosynthese von Salicylat durch UV-Stress kaum noch induziert wird. Um die Frage zu klären, welchen Einfluss das zweite Isochorismatsynthase-Gen ICS2 auf den Salicylatgehalt hat, sollte dieser sowohl in der Einzelmutante *ics2* als auch in der Doppelmutante *ics1ics2* bestimmt werden. Dafür wurden Pflanzen der vier Linien Wildtyp, *ics1, ics2* und *ics1ics2* auf 2MS-Platten angezogen. Die doppelt homozygoten Pflanzen *ics1ics2* wurden aus den Nachkommen der heterozygoten Linie ics1/ics1 ics2/ICS2 selektiert. Salicylat wurde mittels HPLC in ungestressten Kontrollpflanzen sowie in Pflanzen nach UV-Stress (20 min UV-Licht $\lambda = 254$ nm) quantitativ bestimmt. Mit Hilfe der GC-MS sollte der als Salicylat zugeordnete Peak der HPLC verifiziert werden.

Abb. 17 zeigt die Chromatogramme dreier HPLC-Läufe, in denen jeweils der interne Standard *o*-Anisinsäure als Peak mit einer Retentionszeit von etwa 15 min zu erkennen ist. Im Extrakt aus Wildtyp-Pflanzen (Abb. 17A) erkennt man einen Peak mit einer Retentionszeit von zirka 28,5 min, der mit dem Salicylat-Standard (Abb. 17C) koeluiert. In der Doppelmutante icslics2 taucht bei dieser Retentionszeit ein kleiner Peak auf, der ebenfalls mit dem Standard Salicylat koeluiert (Abb. 17B). Um zu beweisen, dass es sich dabei tatsächlich um Salicylat handelt, wurden die Proben im Anschluss mit MSTFA silyliert und in der GC-MS analysiert. Mit Hilfe dieser GC-MS-Messungen konnte das HPLC-Ergebnis bestätigt werden. Abb. 19 zeigt die Einzelionen-Aufzeichnung sowie das zum Peak bei 10,8 min gehörige Massenspektrum. Die Analyse von Salicylat in der GC-MS ergibt einen Peak mit der charakteristischen Masse von 267 bei einer Retentionszeit von etwa 10,8 min in der Einzelionen-Aufzeichnung (Abb. 19C). Dieser Peak konnte sowohl in der Wildtyp- (Abb. 19A) als auch in der Doppelmutanten-Probe (Abb. 19B) detektiert werden. Die Massenspektren der Peaks aus Wildtyp und icslics2 zeigen das gleiche Zerfallsmuster wie das des Salicylat-Standards (Abb. 18), so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei dieser Substanz um Salicylat handelt. Bei dem Peak mit einer Masse von 209 und einer Retentionszeit von zirka 10 min handelt es sich o-Anisinsäure, die als interner Standard in den Proben mitgeführt wurde.



Abb. 17: Salicylatquantifizierung in Wildtyp und ics1ics2 mittels HPLC

Acetonitril-Extrakte aus Blättern nach UV-Stress wurden mittels HPLC aufgetrennt. Wie im WT (A) so kann auch in der Doppelmutante *ics1ics2* (B) ein kleiner Peak mit einer Retentionszeit von zirka 28,5 min detektiert werden, der mit dem Standard Salicylat (C) koeluiert. Als interner Standard diente *o*-Anisinsäure, die nach etwa 15 min eluiert wird.



Abb. 18: Typisches Zerfallsmuster von silyliertem Salicylat

Durch MSTFA werden sowohl die Hydroxyl- als auch die Carboxylgruppe des Salicylat silyliert. Nach Ionisierung im Massenspektrometer zerfällt dieses Molekül dann in typische Fragmente mit Massen von u. a. 267, 209, 193 und 73. Die Molekülmasse des silyliertem Salicylats beträgt 282.



Abb. 19: Einzelionen-Aufzeichnung und Massenspektren von Salicylatextrakten

Dargestellt sind die Einzelionen-Aufzeichungen (SIM) der Massen 209 und 267 sowie jeweils die zum Peak bei 10,8 min gehörigen Massenspektren. Die Masse 267 ist charakteristisch für Salicylat, die Masse 209 für *o*-Anisinsäure. Es ist zu erkennen, dass wie im WT nach UV-Stress (A) auch in der Doppelmutante nach UV-Stress (B) ein kleiner Peak bei 10,8 min erscheint, dessen Massenspektrum dem des Salicylat-Standards (C) entspricht.

Die Berechnung der Salicylatgehalte ergab, dass in ungestressten Pflanzen der Linien Wildtyp und *ics2* etwa 0,56 bzw. 0,47 μ g pro Gramm Frischgewicht enthalten sind und diese Werte nicht signifikant verschieden sind, wohingegen die Menge an Salicylat in der Mutante *ics1* mit 0,28 μ g g⁻¹ FG auf zirka 50 % des Wildtyp-Wertes reduziert ist. In der Doppelmutante *ics1ics2* konnte ein Salicylatgehalt von 0,12 μ g g⁻¹ FG, d.h. etwa 20 % des Wildtyp-Wertes, ermittelt werden. Bekanntlich steigt der Gehalt an Salicylat nicht nur nach Stress durch Pathogenbefall, sondern auch durch UV-Licht in höheren Pflanzen wie *Arabidopsis* stark an (Yalpani *et al.*, 1994). Dies konnte für den Wildtyp und *ics2* eindeutig gezeigt werden (Abb. 20). In diesen beiden Linien wurde nach Stress durch UV-Licht ein Salicylatgehalt von etwa 4,1 μ g g⁻¹ FG ermittelt, d.h. eine Erhöhung auf das Sieben- bis Achtfache der in ungestressten Pflanzen gemessenen Menge. Im Gegensatz dazu hat sich der Salicylatgehalt in der Mutante *ics1* nach UV-Stress mit 0,47 μ g g⁻¹ FG noch nicht einmal verdoppelt, der in der Doppelmutante *ics1ics2* ist annäherungsweise konstant geblieben.



Abb. 20: Salicylatgehalt in den Isochorismatsynthase-Mutanten

Arabidopsis-Pflanzen der Linien WT, *ics1*, *ics2* und *ics1ics2* wurden auf 2MS-Platten angezogen. Salicylat-Gehalte wurden in Extrakten aus Blättern vor und nach UV-Stress mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus Siebenfachbestimmungen (siehe auch Tab. X). Die mit * gekennzeichneten Werte sind nach Student's t-Test signifikant verschieden (p<0,05). (a –Messwert nach UV-Stress ist signifikant verschieden zu Messwert vor UV-Stress innerhalb der gleichen Linie; b – Messwert der betrachteten Linie ist signifikant verschieden zum Wildtyp-Messwert unter gleichen Bedingungen)

3.2 Charakterisierung der Phyllochinon defizienten AtmenG-Mutante

Das Gen menG kodiert in *Synechocystis* die 2-Phytyl-1,4-naphthochinon-Methyltransferase, welche im letzten Schritt der Phyllochinon-Biosynthese die Übertragung einer Methylgruppe auf 2-Phytyl-1,4-naphthochinon katalysiert. Das Produkt dieser Reaktion ist Phyllochinon (Vitamin K₁). Bei Phyllochinon und PNQ handelt es sich um Prenylchinone, die sich nur auf Grund einer Methylgruppe voneinander unterscheiden und damit eine sehr ähnliche Struktur aufweisen. Ziel dieser Arbeit ist es, dieses Gen in Arabidopsis zu charakterisieren und die Bedeutung der Methylgruppe für die Photosynthese zu untersuchen. Anhand von Sequenzhomologien konnte in Arabidopsis ein orthologes Gen At1g23360 gefunden werden (Lange und Ghassemian, 2003), welches im Folgenden in Anlehnung an die Bezeichnung in Synechocystis AtmenG genannt werden soll. Um die Bedeutung der Methylierungsreaktion für die Pflanze näher zu untersuchen wurden Stressexperimente und biochemische Messungen wie die Bestimmung der Phyllochinon-, Anthocyanin- und Chlorophyllgehalte durchgeführt sowie das Photosystem I und II näher untersucht.

3.2.1 Isolierung und Komplementation der AtmenG-Mutante

Um zu zeigen, dass AtmenG in *Arabidopsis* ebenfalls für die Methylierungsreaktion innerhalb der Phyllochinon-Biosynthese verantwortlich ist und für weitere physiologische Untersuchungen der Funktion dieses Gens wurde zunächst die homozygote Mutante *AtmenG* isoliert. Diese wurde bereits im Verlauf meiner Diplomarbeit aus der T-DNA-Insertionslinie GABI_565F06 isoliert. Die Lage der Insertion im 7. Exon konnte dabei durch eine PCR mit den Primern PD394 und PD464 bestätigt werden. Eine Amplifizierung des Wildtyp-Lokus mit den Primern PD464 und PD465 war in der homozygoten Mutante nicht erfolgreich (Lohmann, Diplomarbeit 2005). Eine anschließende Quantifizierung von Phyllochinon mittels Umkehrphasen-HPLC in der homozygoten Mutante und im Wildtyp zeigte, dass der im Wildtyp vorhandene Phyllochinon-Peak mit einer Retentionszeit von etwa 13 min in *AtmenG* nicht mehr detektiert werden kann. Dafür ist ein neuer Peak bei zirka 11,5 min zu sehen, bei dem es sich vermutlich um die unmethylierte Form von Phyllochinon, die Vorstufe 2-Phytyl-1,4-naphthochinon (PNQ) handelt (Abb. 22). Um zu zeigen, dass diese Änderungen im Lipidmuster durch die homozygote T-DNA-Insertion GABI 565F06 im Gen AtmenG verursacht wird, sollte die Mutante AtmenG mit der cDNA von At1g23360 aus Arabidopsis komplementiert werden. Dafür wurde das Konstrukt pBinAR-AtmenG, in welchem die cDNA von At1g23360 unter Kontrolle eines 35S-Promotors in den binären Vektor pBinAR kloniert wurde, über Agrobacterium vermittelten Gentransfer in die Mutante AtmenG transformiert. Die Selektion transgener Pflanzen erfolgte mit Hilfe der durch das Konstrukt vermittelten Kanamycinresistenz. Um zu zeigen, dass in der transformierten Mutante AtmenG + At1g23360 im Gegensatz zur Mutante AtmenG wieder ein Transkript des Gens At1g23360 vorhanden ist, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Als Sonde für den Northern Blot diente die cDNA des Gens At1g23360. In Abb. 21 ist zu erkennen, dass im Wildtyp ein schwaches, in den komplementierten Linien 4, 15 und 28 ein starkes Transkript des Gens vorhanden ist, während in der Mutante kein Transkript detektiert werden konnte. Diese Daten korrelieren mit den im Anschluss daran durchgeführten Phyllochinonmessungen in den verschiedenen Linien. Diese zeigen, dass in den komplementierten Pflanzen kein PNQ, sondern wie im Wildtyp Phyllochinon akkumuliert (Abb. 22). Zudem wird deutlich, dass der Gehalt an PNQ in *AtmenG* mit 5,71 μ g g⁻¹ FG etwas höher ist als der von Phyllochinon im WT bzw. in der komplementierten Mutante, die 4,56 μ g g⁻¹ FG bzw. 4,39 μ g g⁻¹ FG Vitamin K₁ enthalten.

Im weiteren Verlauf der Experimente wurde ausschließlich mit den Nachkommen der Linie AtmenG + At1g23360 # 15 gearbeitet.





Gesamt-RNA wurde aus Blättern isoliert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die 25S rRNA-Bande im Agarosegel ist unten als Ladungskontrolle zu sehen. Oben zu erkennen sind die nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten At1g23360-Sonde detektierten Signale.



Abb. 22: Phyllochinonquantifizierung in WT, AtmenG und AtmenG + At1g23360

Dichlormethan/Methanol-Extrakte aus *Arabidopsis*-Blättern wurden mittels Umkehrphasen-HPLC mit Nachsäulenreduktion aufgetrennt. Dargestellt sind Chromatogramme von WT (A), der Mutante *AtmenG* (B) sowie der komplementierten Linie *AtmenG* + At1g23360 # 15 (C). Die angegebenen Phyllochinon- bzw. PNQ-Gehalte sind Mittelwerte \pm SD einer Dreifachbestimmung und wurden in $\mu g g^{-1}$ FG angegeben (siehe auch Tab. III).

3.2.2 [1-³H]-Phytol wird in Prenylchinone eingebaut

Während der Phyllochinon-Biosynthese wird Phytol von Phytyldiphosphat durch die DHNA-Phytyltransfearse auf DHNA übertragen. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Isoprenoide wie Phytol von *Arabidopsis* aufgenommen und umgesetzt werden können (Ischebeck *et al.*, 2006). Um zu beweisen, dass Phytol in den Linien Wildtyp und *AtmenG* + At1g23360 in Phyllochinon, in der Mutante *AtmenG* dagegen in PNQ eingebaut wird, wurden *Arabidopsis*-Keimlinge mit radioaktivem [1-³H]-Phytol gefüttert. Die anschließend isolierten Lipide wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mit Hilfe eines β-Scanners sichtbar gemacht. Durch Komigration nichtradioaktiver Standards konnten die einzelnen Banden identifiziert werden.



Abb. 23: Inkorporation von [1-³H]-Phytol in Prenylchinone

Arabidopsis-Keimlinge wurden über Nacht in Flüssigkultur mit tritiummarkiertem Phytol inkubiert. Lipide wurden isoliert, per DC aufgetrennt, mittels nicht radioaktiver Standards zugeordnet und mit Hilfe eines β -Scanners sichtbar gemacht. Zu sehen sind die Lipidmuster der Linien WT, *AtmenG* und *AtmenG* + At1g23360, aus denen deutlich wird, dass in den Linien WT und *AtmenG* + At1g23360 Phytol in Phyllochinon, in der Mutante *AtmenG* dagegen in PNQ eingebaut wird.

Phytol wurde in allen drei untersuchten Linien in Chlorophyll, Tocopherol und Fettsäurephytylester eingebaut. Zudem konnte in der beiden Linien Wildtyp und *AtmenG* + At1g23360 eine radioaktiv markierte Bande detektiert werden, die mit dem Phyllochinon-Standard komigriert und in der Mutante *AtmenG* nicht auftaucht. Dagegen wurde in dieser Linie Phytol in eine Substanz mit etwas geringerem Retentionsfaktor inkorporiert, bei der es sich vermutlich um PNQ handelt (Abb. 23). In *AtmenG* ist das Gen PNQ-Methyltransferase vollständig blockiert, so dass kein Phyllochinon mehr gebildet wird, jedoch die Vorstufe PNQ akkumuliert.

3.2.3 Das Protein AtmenG ist in Chloroplasten lokalisiert

Um die subzelluläre Lokalisation des Proteins AtmenG zu untersuchen, wurde das Konstrukt pCL60-*AtmenG* erzeugt, in welchem die cDNA von At1g23360 in translationaler Fusion mit dem N-terminalen Bereich des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in den Vektor pCL60 ligiert wurde. Dieses Konstrukt wurde anschließend mittels biolistischer Transformation in Epidermiszellen von *Arabidopsis*-Blättern transferiert. Die transiente Expression des Proteins AtmenG-GFP wurde unter einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Aus Abb. 24 wird ersichtlich, dass die grüne Fluoreszenz des GFP (A), welche auf die Lokalisation des Proteins AtmenG hinweist, mit der roten Autofluosreszenz der Chloroplasten (B) übereinstimmt. Dies ist deutlich in Abb. 24C zu sehen, welche die Überlagerung beider Fluoreszenzen zeigt. Die GFP-Lokalisationsstudie zeigt, dass das Protein AtmenG in den Chloroplasten lokalisiert ist.



Abb. 24: GFP-Lokalisation von AtmenG in Blattepidermiszellen von Arabidopsis

Epidermiszellen von *Arabidopsis*-Blättern wurden durch biolistischen Gentransfer mit dem Konstrukt pCL60-*AtmenG* transformiert. Zu sehen ist die GFP-Fluoreszenz (A), die Chlorophyll-Autofluoreszenz in den Chloroplasten (B) sowie die Überlagerung beider Fluoreszenzen (C). Der weiße Größenbalken entspricht 8 μ m.

3.2.4 Die Verteilung von Phyllochinon und PNQ in subplastidären Fraktionen

Bereits 1986 (Schoeder und Lockau) konnte gezeigt werden, dass Phyllochinon integraler Bestandteil des Photosystems I und daher in den Chloroplasten lokalisiert ist. Ungeklärt war bisher jedoch, ob Phyllochinon nur in den Thylakoidmembranen, dem Ort der Photosynthese, vorkommt. Zudem stellte sich die Frage, wo 2-Phytyl-1,4-naphthochinon (PNQ), das Vorläufermolekül von Phyllochinon, welches in *AtmenG* akkumuliert, gefunden werden kann. Dafür wurden die Gehalte an Phyllochinon und PNQ in subplastidären Membranfraktionen aus Wildtyp und der Mutante *AtmenG* bestimmt. Wie in Vidi *et al.* (2006) beschrieben wurden dafür aus Blättern von Wildtyp und *AtmenG* Chloroplasten isoliert, aufgebrochen und anschließend mit Hilfe eines Saccharose-Gradienten fraktioniert. Die Fraktionen wurden von Claire Bréhélin (Universität Neuchâtel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Abb. 25 zeigt, dass im Wildtyp zirka 60 % des Phyllochinons in den Fraktionen F4 und F5, welche hauptsächlich Thylakoide enthalten, vorliegen, während in den Plastoglobuli-Fraktionen F1 und F2 nur etwa 30 % lokalisiert sind. Das Verhältnis Phyllochinon zu Fettsäuren war in der Plastoglobuli-Fraktion F1 mit 0,004 am höchsten und in den Thylakoidfraktionen mit 0,002 am niedrigsten. In der Mutante hingegen lag der Anteil an Gesamt-PNQ in den Plastoglobuli-Fraktionen F1 und F2 bei etwa 70 %, in den Thylakoiden (F4, F5) bei nur zirka 25 %. Zudem wurde ein PNQ-Fettsäure-Verhältnis von 0,016 in den Plastoglobuli ermittelt. Dieser Wert ist zum einen deutlich höher als der in den anderen Fraktionen (PNQ-Fettsäure-Verhältnisse von 0,001 bis 0,004), zum anderen viermal so hoch wie der des Wildtyps in den Plastoglobuli. PNQ ist damit in den Plastoglobuli der Mutante *AtmenG* stärker angereichert als Phyllochinon in denen des Wildtyps.



Abb. 25: Verteilung von Phyllochinon und PNQ in Chloroplastenfraktionen von WT und AtmenG

In subplastidären Membranfraktionen aus WT und der Mutante *AtmenG* wurden der Phyllochinonbzw. PNQ-Gehalt per Umkehrphasen-HPLC mit Nachsäulenreduktion sowie die Totalfettsäuren per GC bestimmt. Die Fraktionen F1 und F2 enthalten zumeist Plastoglobuli, F3 Hüllmembranen, F4 und F5 Thylakoide. Dargestellt ist die Verteilung von Phyllochinon im WT und von PNQ in *AtmenG*. Die Verhältnisse Phyllochinon bzw. PNQ pro Fettsäuren in nmol/nmol sind als Mittelwerte \pm SD aus Dreifachbestimmungen der Fettsäuren angegeben (siehe auch Tab. IV und V).

3.2.5 Nach Hochlichtstress ist der Anthocyaningehalt in *AtmenG* gegenüber dem Wildtyp verändert

Unter Standardbedingungen angezogene Pflanzen der Mutante AtmenG zeigen im Vergleich zum Wildtyp bis auf ein geringfügig verringertes Wachstum keinen sichtbaren Phänotyp. Nach vier bis fünf Tagen Wachstum unter Hochlichtbedingungen wird jedoch ersichtlich, dass die Blätter von AtmenG weniger stark rot gefärbt sind als die der Vergleichslinien Wildtyp und AtmenG + At1g23360 (Abb. 26A). Da die Blätter der komplementierten Linie die gleiche rote Färbung wie die des Wildtyps aufwiesen, war davon auszugehen, dass die nicht vorhandene Rotfärbung der Mutantenblätter durch die fehlende Aktivität der Methyltransferase bedingt ist. Eine anschließende Bestimmung des Anthocyaningehalts in den Blättern der drei Linien vor und nach Hochlichtstress zeigte, dass die unter Normallichtbedingungen in Blättern gebildete Menge an Anthocyanin unter der Detektionsgrenze liegt. Nach Hochlichtstress steigt der Anthocyaningehalt in allen Linien stark an. Jedoch ist die in AtmenG akkumulierte Menge an Anthocyanin nur etwa halb so groß ist wie die im Wildtyp und in der komplementierten Linie (Abb. 26C) Dies konnte auch auf Transkriptionsebene mittels Northern Blot Analyse gezeigt werden. Als Sonde diente dabei die cDNA des Chalkonsynthase-Gens (CHS), ein Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese. In Abb. 26B ist zu erkennen, dass in unter Normallichtbedingungen gewachsenen Arabidopsis-Pflanzen das Chalkonsynthase-Gen kaum transkribiert wird, da in keiner der drei Linien ein CHS-Signal detektiert werden konnte. Nach Hochlichtstress hingegen konnte sowohl im Wildtyp als auch in der komplementierten Linie ein starkes Signal aufgezeichnet werden, während in der Mutante AtmenG ein deutlich schwächeres Signal zu erkennen ist. Die Mutation der Methyltransferase in AtmenG hat folglich Einfluss auf die durch Hochlicht induzierte Erhöhung der CHS-Transkription und damit auf den Anthocyaningehalt in Blättern.



Abb. 26: Verminderte Anthocyaninakkumulation und Chalkonsynthase-Expression in *AtmenG* nach Hochlichtstress

Arabidopsis-Pflanzen wurden unter Normallichtbedingungen angezogen und anschließend für vier Tage Hochlichtstress ausgesetzt.

- A Dargestellt sind Pflanzen der drei Linien WT, AtmenG sowie AtmenG + At1g23360 vor (links) und nach (rechts) Hochlichtstress.
- B Anthocyanin-Gehalte wurden in Extrakten aus Blättern vor und nach Hochlichtstress photometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachbestimmungen. Die mit * gekennzeichneten Werte sind nach Students t-Test signifikant verschieden (p<0,05) (siehe auch Tab. VI).
- C Expressions analyse der Chalkonsynthase (CHS) mittels Northern Blot in WT, AtmenG sowie AtmenG + At1g23360 vor und nach Hochlichtstress.

Mittels RT-PCR sollte die Frage geklärt werden, ob allein die reduzierte Expression der Chalkonsynthase Grund für die verminderte Anthocyaninbildung in AtmenG nach Hochlichtstress sein kann oder ob auch die Expression anderer Gene des Anthocyaninbiosyntheseweges in der Mutante verändert ist. Untersucht wurden die Gene 4CL3, CHI. F3H. F3'H. DFR und LDOX. CHS. welche Enzyme des Anthocyaninbiosyntheseweges kodieren. Zudem sollte die Expression von PAP1, einem Transkriptionsfaktor, und TT19, welches ein Protein kodiert, das für den vakuolären Transport der Anthocyanine verantwortlich ist (Kitamura et al., 2004), geprüft werden (Abb. 27).



Abb. 27: Schematische Darstellung des Anthocyanin-Biosyntheseweges

4CL – 4-Coumaroyl-CoA-Ligase, **CHS** – Chalkonsynthase, **CHI** – Chalkonisomerase, **F3H** – Flavonohydroxylase; **F3'H** – Flavonoid-3'-Hydroxylase, **FLS** – Flavonolsynthase, **DFR** – Dihydroflavonol-4-Reduktase, **LDOX** – Leukoanthocyanidin-Dioxygenase, **TT19** –Transparent Testa 19, **PAP1** – Transkriptionsfaktor (Production of Anthocyanin Pigment 1)

Dafür wurden Pflanzen der drei Linien unter Normallicht- und Hochlichtbedingungen angezogen. Aus Blättern dieser Pflanzen wurde Gesamt-RNA isoliert. Die daraus hergestellte cDNA diente als Template für die RT-PCR. Die relative Expression der Gene wurde wie beschrieben berechnet. Eine relative Expression von 1 bedeutet, dass das betrachtete Gen gleich stark wie die Haushaltsgene expremiert wird. Ist sie kleiner 1, wird das Gen schwächer als die Haushaltsgene expremiert, bei größer 1 stärker. Unter Normallichtbedingungen waren die Expressionen aller untersuchten Gene kleiner als 1, d.h. deutlich schwächer als die Haushaltsgene expremiert (Daten nicht dargestellt).



Abb. 28: Relative Expression von Genen der Anthocyanin-Biosynthese nach Hochlichtstress

Aus Blättern der Linien WT, *AtmenG* und *AtmenG* +At1g23360 isolierte cDNA diente als Matrize für die RT-PCR. Relative Expression bedeutet hierbei Expression des Gens im Vergleich zur Expression der mitgeführten Haushaltsgene Die Berechnung erfolgte nach der in Absatz 2.8.7 aufgeführten Formel. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD Dreifachbestimmungen. Die mit * gekennzeichneten Werte sind nach Student's t-Test signifikant verschieden (p<0,05).

Durch Hochlichtstress wurde die Expression aller betrachteten Gene induziert, wobei die Gene 4CL3, CHI, F3H, F3'H und FLS dabei einen nur sehr schwachen Anstieg aufzeigen. Die Genexpression von TT19 und LDOX steigt nach Hochlicht auf zirka 2 (LDOX) bis 4 (TT19) an. Die stärksten Anstiege der Expression konnten für die Gene Chalkonsynthase (CHS) und Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) ermittelt werden, in denen die relative Expression in den Linien Wildtyp und *AtmenG* + At1g23360 auf 6 bis 8 (CHS) bzw. 10 bis 12 (DFR) nach Hochlichtstress angestiegen ist. Auch in der Mutante *AtmenG* konnte eine

Induktion der Expression dieser beiden Gene gemessen werden. Jedoch war diese gegenüber den beiden anderen Vergleichslinien signifikant geringer: die relative Expression von CHS stieg auf etwa 2, die von DFR auf etwa 6 an (Abb. 28). Dieses Ergebnis konnte für das Gen CHS bereits mittels Northern Blot verifiziert werden (siehe Abb. 26B). Wie in Abb. 27 zu erkennen ist, werden die Gene CHS und DFR durch den Transkriptionsfaktor PAP1 reguliert. Dessen Expression steigt durch Hochlichtstress ebenfalls in allen Linien an. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Genen ist jedoch der Anstieg der PAP1-Expression in der Mutante *AtmenG* signifikant höher als in den Linien Wildtyp und *AtmenG* + At1g23360.

3.2.6 Chlorophyll- und Pigmentgehalte sind nach Hochlichtstress verändert

Da Phyllochinon ein integraler Bestandteil des Photosyntheseapparates ist, sollte untersucht werden, welchen Einfluss das Fehlen von Vitamin K_1 auf diesen hat. *Arabidopsis*-Pflanzen wurden dafür sowohl unter Normallichtbedingungen als auch unter Hochlichtbedingungen angezogen. In Acetonextrakten aus Blättern wurden die Chlorophyllgehalte photometrisch bestimmt sowie die Pigmente per HPLC quantifiziert. In Abb. 29 ist zu sehen, dass sich der Gesamtchlorophyllgehalt sowie das Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b (a/b) in allen drei Linien Wildtyp, *AtmenG* und *AtmenG* + At1g23360 unter Normallichtbedingungen nicht signifikant unterscheidet. Nach Hochlichtstress ist der Gehalt an Gesamtchlorophyll in allen Linien gegenüber den Normallichtbedingungen reduziert, jedoch ist die Reduktion in der Mutante *AtmenG* signifikant stärker als im Wildtyp und der komplementierten Linie. Umgekehrt verhält es sich mit dem Chlorophyll-a/b-Verhältnis, welches nach Hochlichtstress im Wildtyp und der Linie *AtmenG* + At1g23360 signifikant stärker reduziert ist als in der Mutante *AtmenG*.



Abb. 29: Chlorophyllgehalt und Chlorophyll-a/b-Verhältnis vor und nach Hochlichtstress

Gesamtchlorophyll wurde in einem Acetonextrakt aus Blättern photometrisch bestimmt, die Gehalte an Chlorophyll a und b wurde mittels HPLC ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von Fünffachbestimmungen. Die mit * gekennzeichneten Werte sind nach Student's t-Test signifikant verschieden (p<0,05) (siehe auch Tab. VIII)

Ebenso wie die Chlorophyllgehalte unterscheiden sich die Pigmentgehalte in den drei untersuchten Linien nicht, wenn die Pflanzen unter Normallichtbedingungen angezogen wurden. Abb. 30A macht deutlich, dass die Gehalte an Neoxanthin, Lutein und β -Carotin auch nach Hochlichtstress in den einzelnen Linien nicht signifikant verschieden sind, während die Menge an den Xanthophyllen Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin (V+A+Z) in der Mutante signifikant stärker zunimmt als in den Vergleichslinien Wildtyp und *AtmenG* + At1g23360. Die durch Hochlicht induzierte Umwandlung von Violaxanthin in Antheraxanthin und Zeaxanthin ist in der Mutante deutlich stärker als in den beiden anderen Linien zu erkennen. Dies zeigt sich in den relativen Mengen an Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin im Verhältnis zur Gesamtmenge an Xanthophyllen V+A+Z. Diese Verhältnisse sind in allen drei Linien unter Normallichtbedingungen gleich. Nach Hochlichtstress hingegen nimmt der Anteil an Antheraxanthin und Zeaxanthin im Verhältnis zum Xantophyll-Gesamtgehalt in der Mutante *AtmenG* stark zu, der prozentuale Anteil an Violaxanthin dagegen deutlich ab. Dies konnte in den beiden Linien Wildtyp und *AtmenG* + At1g23360 nicht gemessen werden (Abb. 30B).



Abb. 30: Pigmentgehalte vor und nach Hochlichtstress

Pigmente wurden mit Aceton aus Blättern isoliert und mittels HPLC quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von Fünffachbestimmungen jeweils vor (NL) und nach (HL) Hockflichtstress. Die mit * gekennzeichneten Werte sind nach Students t-Test signifikant verschieden (p<0,05) (siehe auch Tab. VII)

- A Absolute Pigmentgehalte in mmol mol⁻¹ Chlorophyll a+b
- B Relative Gehalte an Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin bezogen auf den Gesamtgehalt an Xantophyllen V+A+Z (in %)

Der Gehalt an Tocopherol stieg nach Hochlichtstress in allen drei Linien an. Vor Lichtstress war die in der Mutante *AtmenG* gemessene Menge an Tocopherol signifikant geringer als in beiden Vergleichslinien, nach Lichtstress bestätigte sich dies nur noch im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 31). Da die Tocopherolgehalte selbst im Wildtyp starken Schwankungen unterliegen und die Unterschiede zwischen den Linien recht gering sind, kann nicht unbedingt davon ausgegangen werden, dass das Ausschalten der Genfunktion von AtmenG prinzipiell zu einem verringerten Tocopherolgehalt führt.



Abb. 31: Tocopherolgehalte in WT, AtmenG und AtmenG + At1g23360

In einem Diethyletherextrakt aus Blättern wurden die Tocopherole mittels HPLC aufgetrennt und quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von Fünffachbestimmungen. Die mit * gekennzeichneten Werte sind nach Student's t-Test signifikant verschieden (p<0,05) (siehe auch Tab. IX)

3.2.7 Hochlichtstress beeinflusst die Stabilität und Aktivität von Photosystem I und II in der Mutante *AtmenG* stärker als im Wildtyp

Phyllochinon ist integraler Bestandteil des Photosystem I und damit ein wichtiger Teil des gesamten Photosyntheseapparates. In der Mutante *AtmenG* wird Phyllochinon durch das Vorläufermolekül 2-Phytyl-1,4-naphthochinon (PNQ) ersetzt, welches im Gegensatz zu Phyllochinon in Position 3 keine Methylgruppe trägt. Um die Frage beantworten zu

können, welchen Einfluss dieser Austausch bzw. das Fehlen der Methylgruppe auf den Photosyntheseapparat hat, wurde dieser näher untersucht.

Um die in den einzelnen Linien vorhandenen Mengen an PSI, PSII und Cyt-b₆/f-Komplex beurteilen zu können, wurden Western Blots durchgeführt. Dafür wurden Thylakoide aus Blättern der drei Linien Wildtyp, AtmenG und AtmenG + At1g23360, welche sowohl unter Normallicht als auch unter Hochlicht angezogen wurden, isoliert. Nach Auftrennung der Thylakoidproteine (entsprechend 50 µg Chlorophyll pro ml) mittels SDS-PAGE wurden diese mit Antikörpern gegen PsaC, eine Untereinheit des PSI, PsbD, eine Untereinheit des PSII, sowie PetA, eine Untereinheit des Cyt-b₆/f-Komplexes, markiert. Um die Signalstärken besser vergleichen zu können, wurden in den ersten beiden Spuren des Proteingels Thylakoide aus dem Wildtyp entsprechend 12,5 µg Chlorophyll (25 %) bzw. 25 µg Chlorophyll (50 %) aufgetragen. Es zeigt sich deutlich, dass zwischen den drei Linien unter Normallichtbedingungen keine Unterschiede in den Signalstärken der drei untersuchten Proteine zu erkennen sind. Unter Hochlichtbedingungen hingegen ist die Menge des PsaC-Proteins, einer Untereinheit des PSI, in der Mutante AtmenG gegenüber den anderen Linien Wildtyp und AtmenG + At1g23360 reduziert, während die Signale für die Proteine PsaD und PetA unverändert gleich stark sind (Abb. 32). Die Western Blot Analysen zeigen demnach, dass die Menge an PSI, nicht aber die Gehalte an PSII und Cytb₆/f-Komplex, unter Hochlichtbedingungen in der Mutante AtmenG gegenüber den Vergleichslinien verringert ist.



Abb. 32: Western Blot von Untereinheiten des Photosyntheseapparates

Thylakoidprotein entsprechend 50 μ g Chlorophyll aus WT (1), *AtmenG* (2) und *AtmenG* + At1g23360 (3) wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen PsaC (PSI-Untereinheit), PsaD (PSII-Untereinheit) sowie PetA (Untereinheit des Cyt-b₆/f-Komplexes) markiert. Als Ladungskontrolle dienten die ersten drei Spuren, die 25 %, 50 % bzw. 100 % des WT-Thylakoidproteins enthielten.
Die Elektronentransferrate des Photosystem I (PSI) wurde mit Hilfe künstlicher Elektronendonoren und –akzeptoren durch Bestimmung der Sauerstoffreduktion an isolierten Thylakoiden bestimmt. Man erkennt in Abb. 33, dass es unter Normallichtbedingungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Linien Wildtyp, *AtmenG* und *AtmenG* + At1g23360 gibt.



Abb. 33: Elektronentransportrate des Photosystems I

Die Rate des Elektronentransports durch das Photosystem I in μ mol Elektronenpaaren (EP) pro mg Chlorophyll und Stunde wurde nach Zugabe des künstlichen Elektronendonors Ascorbat und des Elektronenakzeptors Methylviologen an isolierten Thylakoiden (Normallichtbedingungen) durch Messung des Sauerstoffverbrauchs ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD einer Dreifachbestimmung.

Die Gehalte an PSI, PSII und Cyt-b₆/f-Komplex des Photosyntheseapparates wurden in Blättern bzw. Thylakoiden mittels Differenzabsorptionsspektroskopie bestimmt, mit der das unterschiedliche Absorptionsverhalten der einzelnen Chromophore in verschiedenen Redoxzuständen gemessen werden kann. Der Gehalt an aktiven PSI-Reaktionszentren wurde in Blättern von *Arabidopsis* gemessen. Wie aus Abb. 34A deutlich wird, ist unter Normallichtbedingungen der Gehalt an PSI in den Blättern der Mutante *AtmenG* gegenüber den Vergleichslinien Wildtyp sowie *AtmenG* + At1g23360 geringfügig um etwa 20 % reduziert. Nach Hochlichtstress wird dieser Unterschied deutlicher. In der Mutante entspricht der Gehalt an aktivem PSI dann nur noch zirka 50 % der Gehalte in den beiden Vergleichslinien. Die Bestimmung der Mengen an PSI, PSII und Cyt-b₆/f erfolgte an Thylakoiden, die aus den Blättern der verschiedenen Linien isoliert wurden. Wie bereits die Differenzabsorptionsmessungen an ganzen Blättern gezeigt haben, so ist der Gehalt an PSI auch hier unter normalen Lichtbedingungen gering auf etwa 90 % des Wildtyps reduziert. Jedoch verringert sich dieser Wert nach Hochlichtstress auf zirka 80 %. Die Mengen an PSII und Cyt-b₆/f-Komplex waren im Gegensatz dazu unter Normallichtbedingungen in allen drei Linien nicht signifikant verschieden. Nach Hochlichtstress jedoch konnte ein leichter Anstieg des PSII-Gehalts als auch der Menge an Cyt- b_6 /f-Komplex in der Mutante *AtmenG* gemessen werden (Abb. 34B).



Abb. 34: Gehalte verschiedener Komponenten des Photosyntheseapparates vor und nach Hochlichtstress

Arabidopsis-Pflanzen wurden unter Normallichtbedingungen angezogen und anschließend für vier Tage Hochlichtstress ausgesetzt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SD von Fünffachbestimmungen. Die mit * gekennzeichneten Werte sind nach Student's t-Test signifikant verschieden (p<0,05).

- A Der PSI-Gehalt in Blättern wurde mittels Differenzabsorptionsspektroskopie des P_{700} -Chlorophyll-Dimers ermittelt. Die Licht induzierten Änderungen des P_{700} -Transmissionssignals ($\Delta I/I$) wurden dabei auf den Gesamtchlorophyllgehalt bezogen.
- B Die Gehalte an PSI, PSII und Cyt-b6/f-Komplex in Thylakoidmembranen vor und nach Hochlichtstress wurden mittels Differenzabsorptionsspektroskopie bestimmt.

Die 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz kann genutzt werden, um Aussagen über die Verteilung des Chlorophylls zwischen PSI und PSII zu treffen. Die aus Blättern isolierten Thylakoide wurden dafür entsprechend 10 µg Chlorophyll verdünnt und in flüssigem Stickstoff auf 77 K gekühlt. Das Chlorophyll a wurde anschließend mit einer Wellenlänge von 430 nm angeregt und die Emissionsspektren von $\lambda = 660$ nm bis 800 nm aufgezeichnet. Photosystem I (PSI) weist bei 730 nm seine maximale Chlorophyll-a-Fluoreszenz auf, Photosystem II (PSII) bei 685 nm. Normalisiert man die bei $\lambda = 685$ nm gemessene Chlorophyllfluoreszenz auf 1, so können bei $\lambda = 730$ nm Unterschiede in der statistischen Anregungsverteilung zwischen PSI und PSII gemessen werden. In Abb. 35 zeigt sich, dass unter Normallichtbedingungen zwischen den drei untersuchten Linien keine Unterschiede vorhanden sind. Nach Hochlichtstress ist die maximale Chlorophyll-a-Fluoreszenz des PSI gemessen bei 730 nm in allen drei Linien gegenüber den Normallichtbedingungen verringert. Zudem ist diese in der Mutante *AtmenG* gegenüber den Linien Wildtyp und *AtmenG* + At1g23360 reduziert. Die Abnahme der 77K-Emission des PSI entspricht ungefähr der Abnahme des PSI-Gehalts nach Hochlichtstress (s. Abb. 34A und 34B), so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Querschnitt des PSI unverändert geblieben ist, jedoch die Stöchiometrie von PSII zu PSI verschoben ist. Dadurch kommt es zu einer Änderung der Anregungsverteilung zwischen den beiden Photosystemen, die sich in der Mutante in einer reduzierten Chlorophyll-a-Fluoreszenz bei $\lambda = 730$ nm bemerkbar macht (Abb. 35).



Abb. 35: 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Thylakoiden

Aus Blättern isolierte Thylakoide wurden entsprechend 10 µg Chlorophyll pro ml verdünnt. Nach Anregung mit einer Wellenlänge von 430 nm wurden die Emissionsspektren von 660 nm bis 800 nm aufgezeichnet und anschließend auf das PSII-Emissionssignal bei 685 nm normalisiert.

Im Photosyntheseapparat der Pflanzen fließen die Elektronen zuerst vom PSII durch den Cyt-b₆/f-Komplex in das PSI. Bekannt ist zudem, dass nach Strahlungsaufnahme die Pigmente der Photosysteme angeregt werden, jedoch nur ein Teil dieser Anregungsenergie über die Elektronentransportkette in photochemische Prozesse eingeht. Der Rest wird in Form von Wärmedissipation oder Fluoreszenz abgestrahlt. Wenn das Fehlen der Methylgruppe des Phyllochinons laut vorangegangener Untersuchungen Einfluss auf die Stabilität und Aktivität des PSI hat, stellt sich die Frage, ob dadurch auch das PSII bzw. der Elektronenfluss durch das PSII beeinflusst wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Quantenausbeute des PSII mittels Imaging PAM bestimmt. Dafür wurden Pflanzen aller drei Linien sowohl unter Normallicht- als auch unter Hochlichtbedingungen angezogen und vor der Messung über Nacht in Dunkelheit gestellt. Gemessen wurden die Quantenausbeuten des PSII nach Anregung mit verschiedener photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR). In Abb. 36 ist deutlich zu erkennen, dass die Quantenausbeute des PSII im Allgemeinen mit steigender Intensität der PAR erwartungsgemäß abnimmt. Es zeigt sich jedoch bereits in den unter Normallicht angezogenen Linien, dass im Bereich von 30 bis 300 µmol m⁻² s⁻¹ die Quantenausbeute des PSII in der Mutante AtmenG im Vergleich zu den beiden Linien Wildtyp und AtmenG + At1g23360 leicht verringert ist. Nach Hochlichtstress verstärkt sich dieser Unterschied, so dass die Quantenausbeute in der Mutante im Gegensatz zu den Vergleichslinien über alle Lichtintensitäten hinweg deutlich reduziert ist. Der Austausch des Phyllochinons durch PNQ im PSI hat folglich indirekt Einfluss auch auf das PSII.



Abb. 36: Photosystem II-Quantenausbeute vor und nach Hochlichtstress

Die PSII-Quantenausbeute wurde mittels Imaging PAM an dunkeladaptierten Blättern bestimmt. Die etwa 5 Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen der Linien WT, *AtmenG* uns *AtmenG* + At1g23360 wurden zuvor unter Normallicht- als auch unter Hochlichtbedingungen angezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von jeweils Fünffachbestimmungen.

4 Diskussion

4.1 Phyllochinon wird ausschließlich über den Isochorismatsynthase-Weg gebildet, nicht aber Salicylat

Neben der Biosynthese aromatischer Aminosäuren ist Chorismat in *Arabidopsis* auch Vorläufermolekül für die Biosynthese von Phyllochinon und Salicylat. Chorismat wird dafür durch die Aktivität einer Isochorismatsynthase (ICS) in Isochorismat umgewandelt. Beide Biosynthesewege sind daher durch die enzymatische Aktivität der Isochorismatsynthase miteinander verknüpft. Während Phyllochinon eine bedeutende Funktion als Elektronenüberträger im Photosystem I ausübt, ist Salicylat als wichtiger Mittler in der Abwehr von Pathogenen oder bei der Stressantwort bekannt.

In *Arabidopsis* existieren zwei Gene, welche eine Isochorismatsynthase kodieren: ICS1 und ICS2. Nawrath und Métraux (1999) konnten die Mutante *ics1 (sid2-1)* aufgrund ihrer Salicylatdefizienz isolieren. Die Mutante *ics2* wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit aus der T-DNA-Insertionspopulation SALK_084635 isoliert (Lohmann, Diplomarbeit 2005).

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welchen Einfluss die Kombination der Mutationen in beiden dieser Isochorismatgene auf den Gehalt an Phyllochinon und Salicylat und damit auch auf die Physiologie der Pflanze hat.

4.1.1 Die Doppelmutante *ics1ics2* ist phyllochinonfrei und nicht

photoautotroph

Durch Kreuzen der beiden Mutanten *ics1* und *ics2* konnte eine doppelt homozygote Mutante *ics1ics2* erzeugt werden. Sequenzieren des Gens ICS1 zeigte, dass *ics1ics2* in beiden Allelen den von Wildermuth *et al.* (2001) beschriebenen Basenaustausch von C nach T in der Chorismat bindenden Domäne aufweist. Dass *ics1ics2* zudem die T-DNA-Insertion SALK_084635 in beiden Allelen des Gens ICS2 trägt, konnte durch eine PCR nachgewiesen werden, mit der in *ics1ics2* kein Fragment spezifisch für das Wildtyp-Gen ICS2, jedoch eines spezifisch für die T-DNA-Insertion amplifiziert werden konnte.

Es war nicht möglich, diese doppelt homozygoten Pflanzen aus auf Erde angezogenen Nachkommen der Linie *ics1/ics1 ics2/ICS2* zu selektieren. Alle auf diese Weise gewachsenen Nachkommen zeigten entweder den Genotyp *ics1/ics1 ics2/*ICS2 wie die Elternpflanze oder *ics1/ics1* ICS2/ICS2, d.h. sie trugen in keinem der Allele die T-DNA-Insertion SALK_084635. Doppelt homozygote Pflanzen *ics1/ics1 ics2/ics2* konnten nur aus Nachkommen selektiert werden, welche auf Petrischalen mit zuckerhaltigem Medium angezogen wurden.

Bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass die Isochorismatsynthase 1 (ICS1) innerhalb der Phyllochion-Biosynthese die Hauptaktivität besitzt. Denn während ein völliger Verlust der Genfunktion von ICS2 keinen Einfluss auf den Phyllochinongehalt hat, weist die Mutante *ics1* nur noch etwa 40 % des Wildtyp-Phyllochinongehalts auf (Lohmann, Diplomarbeit 2005). Phyllochinonmessungen in der Doppelmutante *ics1ics2* zeigten nun, dass diese völlig frei von Phyllochinon ist. Pflanzen mit dem Genotyp *ics1/ics1 ics2*/ICS2, die wie die Einzelmutanten *ics1* und *ics2* auch auf Erde angezogen werden konnten, enthalten dagegen noch zirka 0,85 µg g⁻¹ FG Phyllochinon, d.h. etwa 50 % des Gehalts von *ics1* bzw. 20 % des Wildtyp-Gehalts. Während Pflanzen mit nur einem intakten ICS2-Allel noch geringe Mengen an Phyllochinon akkumulieren, führt ein vollständiges Ausschalten der Isochorismatgene ICS1 und ICS2 zu phyllochinonfreien Pflanzen, d.h. sowohl bei der Mutation in *ics1* als auch in *ics2* handelt es sich um eine Nullmutation..

Phyllochinon ist in höheren Pflanzen wie Arabidopsis integraler Bestandteil des Photosystem I und fungiert dort als der Elektronenüberträger A_1 in der Elektronentransportkette. In der Doppelmutante icslics2 fehlt dieser Elektronenüberträger A₁. Während die Funktion des fehlenden Phyllochinons in Synechocystis zum Teil von Plastochinon übernommen werden kann (Johnson et al., 2001), ist dies in Arabidopsis möglich. In der phyllochinonfreien Doppelmutante *ics1ics2* nicht ist der Elektronentransport aufgrund des fehlenden Überträgers Phyllochinon stark beeinträchtigt. Vermutlich kann dadurch die Photosynthese nur noch in geringem Umfang stattfinden, so dass die Pflanzen auf Erde nicht mehr überlebensfähig sind, sondern nur noch auf zuckerhaltigem Medium wachsen können. Da der geringe Gehalt an Phyllochinon in der Linie ics1/ics1 ics2/ICS2, d.h. 20 % des Wildtyp-Gehalts dagegen ausreichend zu sein scheint, um die Abläufe in der Photosynthese aufrecht zu erhalten und die Überlebensfähigkeit auf Erde zu garantieren, kann vermutet werden, dass in Arabidopsis-Pflanzen mehr Phyllochinon gebildet wird, als für die Aufrechterhaltung der photosynthetischen Aktivitäten unbedingt notwendig ist.

70

4.1.2 Die verkürzte ICS-Domäme PHYLLO-ICS ist funktionell nicht aktiv

In *Arabidopsis* existiert neben den beiden bereits bekannten Genen ICS1 und ICS2, welche beide eine Isochorismatsynthase kodieren, eine dritte verkürzte Form dieses Gens. Diese ist auf dem *Arabidopsis*-Gen PHYLLO lokalisiert und zeigt nur zum N-terminalen Bereich der Isochorismatsynthase-Gene ICS1 und ICS2 Homologien (Gross *et al.*, 2006). Bisher war unbekannt, ob diese verkürzte Form PHYLLO-ICS funktionell aktiv ist. Es sollte untersucht werden, ob PHYLLO-ICS die Mutante *ics1* komplementieren kann. Dafür wurde PHYLLO-ICS unter Kontrolle eines 35S-Promotors in *ics1* transferiert. In Messungen des Phyllochinongehalts in den transformierten Nachkommen und der Mutante *ics1* konnten keine Unterschiede ermittelt werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass PHYLLO-ICS keine Isochorismatsynthase-Aktivität besitzt.

Dieses Ergebnis bestätigt zudem die Phyllochinonmessungen in der Doppelmutante *ics1ics2*. Da *ics1ics2* völlig frei von Phyllochinon ist, kann davon ausgegangen werden, dass in *Arabidopsis* keine weitere Isochorismatsynthase existiert, die funktionell aktiv ist.

4.1.3 Die Isochorismatsynthase 2 ist ebenfalls an der Salicylatbiosynthese beteiligt

Isochorismat ist in *Arabidopsis* Vorläufermolekül für die Phyllochinon- als auch für die Salicylatbiosynthese. Die Umwandlung von Chorismat in Isochorismat wird durch eine Isochorismatsynthase katalysiert, für welche zwei Gene ICS1 und ICS2 kodieren. Wildermuth *et al.* (2001) konnte zeigen, dass in Pflanzen mit einer Mutation im Gen ICS1 unter normalen Bedingungen weniger Salicylat gebildet wird und eine stressbedingte Induktion der Salicylatbiosynthese kaum noch stattfindet. Fraglich blieb bisher, in welchem Ausmaß das zweite Isochorismatsynthase-Gen ICS2 an der Salicylatbiosynthese beteiligt ist und ob Salicylat auch über einen anderen Weg, den sogenannten PAL-Weg (Lee *et al.*, 1995) gebildet werden kann. Ausgangspunkt dabei ist ebenfalls Chorismat, welches jedoch nicht zu Isochorismat, sondern zunächst in die aromatische Aminosäure Phenylalanin umgewandelt wird. Aus dieser entsteht dann durch die Aktivität der Phenylalaninammonium-Lyase (PAL) Zimtsäure. Diese wird durch eine Decarboxlierung zu Benzoat, welches schließlich zu Salicylat hxdroxyliert wird (Yalpani *et al.*, 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun geklärt werden, ob ICS2 an der Biosynthese von Salicylat beteiligt und ob auch der PAL-Weg in Arabidopsis aktiv ist. Dafür wurden die Gehalte an Salicylat in den Linien Wildtyp, *ics1*, *ics2* sowie der Doppelmutante *ics1ics2* sowohl vor als auch nach UV-Stress bestimmt. Wie bereits von Wildermuth et al. (2001) gezeigt, ist der Salicylatgehalt in der ungestressten Mutante ics1 etwas geringer als im Wildtyp, während in der ungestressten Mutante *ics2* ähnlich viel Salicylat wie im Wildtyp akkumuliert. Nach UV-Stress steigt die Menge an Salicylat im Wildtyp wie auch in *ics2* sehr stark von etwa 0,6 μ g g⁻¹ FG auf über 4 μ g g⁻¹ FG an, während in *ics1* nur eine sehr schwache Induktion von 0,28 μ g g⁻¹ FG auf 0,47 μ g g⁻¹ FG gemessen werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in der Doppelmutante icslics2 noch Salicylat akkumuliert. In ungestressten Pflanzen dieser Linie konnte zirka 0,12 µg g⁻¹ FG gemessen werden. In Pflanzen nach UV-Stress wurden 0,17 µg Salicylat pro Gramm Frischgewicht ermittelt. Eine stressbedingte Induktion der Salicylatbiosynthese findet in *ics1ics2* demnach gar nicht mehr statt. Da in der Mutante *ics1* mit 0.28 µg g⁻¹ FG etwa doppelt so viel Salicylat wie in icslics2 gemessen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Isochorismatsynthase 2 ebenfalls an der Umwandlung von Chorismat in Isochorismat beteiligt ist. Was bereits für die Phyllochinon-Biosynthese gezeigt werden konnte, bestätigt sich nun auch mit Hilfe der Salicylatmessungen: Die ICS1 besitzt die Hauptaktivität beider Isochorismatsynthasen.

Die Tatsache, dass auch in der Doppelmutante *ics1ics2* noch Salicylat nachgewiesen werden konnte, deutet darauf hin, dass Salicylat in *Arabidopsis* auch über den sogenannten PAL-Weg, d.h. über die Intermediate Phenylalanin und Benzoat gebildet werden kann. Da die Menge an Salicylat in der ungestressten Doppelmutante *ics1ics2* nur noch zirka 20 % der Wildtyp-Menge, in gestressten Pflanzen nur noch etwa 4 % dieser entspricht, kann zum einen festgestellt werden, dass die Salicylatbiosynthese über den PAL-Weg eine untergeordnete Rolle spielt. Zum anderen folgt hieraus, dass die Salicylatbildung über den PAL-Weg im Gegensatz zur Bildung über das Zwischenprodukt Isochorismat (ICS-Weg) durch UV-Stress nicht induzierbar ist.

4.1.4 Warum existieren in Arabidopsis zwei Isochorismatsynthasen?

In *Arabidopsis* existieren zwei Gene, die eine Isochorismatsynthase kodieren. Beide Proteine, *ICS1* und *ICS2*, sind funktionell aktiv und sowohl für die Phyllochinon- als auch für die Salicylatbiosynthese von Bedeutung, wobei *ICS1* die Hauptaktivität besitzt. In anderen höheren Pflanzen dagegen konnte bisher nur eine Isochorismatsynthase identifiziert werden. So findet man in der *Populus*-Spezies (Tsai *et al.*, 2006) oder auch im Wein (Jaillon und Aury *et al.*, 2007) nur ein ICS-Gen.

Blanc *et al.* (2003) konnte zeigen, dass die beiden *Arabidopsis*-Gene ICS1 und ICS2 innerhalb eines Genom-Abschnitts liegen, welcher durch eine genomische Duplikation entstanden ist. Da ICS2 den hier gezeigten Ergebnissen zu Folge die weniger wichtige Rolle spielt, kann angenommen werden, dass ICS1 das Stammgen und ICS2 das Duplikat ist. Folgt man der klassischen Evolutionstheorie, dann könnte ICS2 nach und nach verloren gehen oder zum Pseudogen werden (Wagner, 1998). Vielleicht jedoch bietet das Vorhandensein von zwei Isochorismatgenen in *Arabidopsis* aber auch Vorteile, was erklären könnte, warum ICS2 noch immer nicht verloren gegangen ist.

Auch in Prokaryonten konnte die Existenz von duplizierten Genen beobachtet werden. In *Bacillus subtilis* existieren ebenfalls zwei Gene, die eine Isochorismatsynthase kodieren (Rowland und Taber, 1996). Jedoch unterscheiden sich die Aktivitäten dieser beiden Isochorismatsynthasen insofern, dass eine für die Synthese von Menachinon und Dihydroxybenzoat dient, die andere nur in der Menachinonbiosynthese aktiv ist. Auch in *Escherichia coli* gibt es zwei ICS-Gene: Das Gen MenF ist in die Biosynthese von Menachinon (Daruwala *et al.*, 1996), das Gen EntC in die Bildung von Enterobactin involviert (Liu *et al.*, 1990; Kwon *et al.*, 1996). Beide Gene werden durch verschiedene Bedingungen induziert und auf unterschiedliche Weise reguliert, so dass von nur geringer Redundanz gesprochen werden kann (Dahm *et al.*, 1998). Dies ist in *Arabidopsis* anders, denn sowohl *ICS1* als auch *ICS2* sind an der Biosynthese von Phyllochinon und Salicylat beteiligt. Jedoch hat das Fehlen der *ICS2*-Aktivität kaum Auswirkungen und kann durch die Aktivität von *ICS1* ausgeglichen werden. Es könnte sich bei den beiden Genen ICS1 und ICS2 daher auch um eine ungleiche Redundanz handeln, ein in *Arabidopsis* weit verbreitetes Phänomen (Briggs *et al.*, 2006).

4.2 Die Phyllochinonmethylierung ist notwendig für ein einwandfreies Funktionieren des Photosyntheseapparates

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der Methylgruppe des Phyllochinons in der Photosynthese höherer Pflanzen am Beispiel der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen. In diesem Rahmen soll zudem das Gen identifiziert werden, welches in *Arabidopsis* die 2-Phytyl-1,4-naphthochinon-Methyltransferase (PNQ-Methyltransferase) kodiert, die im letzten Schritt der Phyllochinon-Biosynthese die Übertragung der Methylgruppe auf PNQ katalysiert, wodurch Phyllochinon entsteht. Bekannt ist bereits, dass in der Blaualge *Synechocystis* das Gen menG dieses Enzym kodiert. Durch Sequenzvergleiche des Gens menG mit dem Genom von *Arabidopsis* wurde ein orthologes Gen At1g23360 (AtmenG) gefunden (Lange und Ghassemian, 2003). Zudem existiert eine homozygote Mutante *AtmenG*, welche im 7. Exon die T-DNA-Insertion GABI_565F06 trägt (Lohmann, Diplomarbeit 2005). Diese ist frei von Phyllochinon, jedoch im Gegensatz zu beispielsweise der Mutante *abc4* auf Erde überlebensfähig (Shimada *et al.*, 2005). Es konnte weiterhin bereits gezeigt werden, dass die *Synechocystis*-Mutante *menG* durch Transformation mit dem *Arabidopsis*-Gen AtmenG komplementiert werden kann (Lohmann *et al.*, 2007).

4.2.1 Der Phänotyp von *AtmenG* kann durch Transformation der At1g23360cDNA komplementiert werden

Die Mutante *AtmenG* trägt im Gen At1g23360 eine T-DNA-Insertion, so dass kein biologisch aktives Protein mehr gebildet werden kann. Phyllochinonmessungen mittels HPLC haben gezeigt, dass in *AtmenG* kein Phyllochinon mehr vorhanden ist, jedoch eine im Wildtyp nicht vorhandene Substanz mit etwas geringer Retentionszeit akkumuliert.

Nach Transformation des Konstrukts pBinAR-*At1g23360* in *AtmenG* konnte dieser Phyllochinon-Phänotyp aufgehoben werden. Mittels HPLC wurde gezeigt, dass in der komplementierten Linie *AtmenG* + At1g23360 wie im Wildtyp wieder Phyllochinon gebildet wird. Dagegen konnte der Peak mit etwas geringerer Retentionszeit, welcher in den HPLC-Chromatogrammen aus Extrakten der Mutante *AtmenG* zu sehen war, nicht mehr detektiert werden. Bei der unbekannten Substanz in *AtmenG* handelt es sich vermutlich um die unmethylierte Form des Phyllochinons, d.h. um 2-Phytyl-1,4naphthochinon (PNQ), welches aufgrund der fehlenden Methylgruppe gegenüber dem Phyllochinon etwas weniger stark auf der Umkehrphasensäule der HPLC zurückgehalten und daher etwas früher eluiert wird. In Pflanzen, die das Konstrukt pBinAR-*At1g23360* tragen, kann im Gegensatz zu der Mutante *AtmenG* die Methylierungsreaktion wieder stattfinden, so dass kein PNQ-, sondern ein Phyllochinonpeak im HPLC-Chromatogramm zu erkennen ist (Abb. 22).

Ischebeck *et al.* (2006) konnte nachweisen, dass Isoprenoide von *Arabidopsis* aufgenommen und umgesetzt werden können. So wurde u. a. gezeigt, dass *Arabidopsis*-Keimlinge Phytol aus Flüssigmedium aufnehmen und dieses anschließend in Tocopherol, Chlorophyll und Fettsäurephytylester einbauen können. Der vorletzte Schritt der Phyllochinon-Biosynthese ist die Übertragung eines Phytylrests auf 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat (DHNA). Das Produkt dieser Reaktion, welche durch die DHNA-Phytyltransferase *ABC4* katalysiert wird (Shimada *et al.*, 2005), ist 2-Phytyl-1,4-naphthochinon (PNQ), d.h. die Substanz, die in der Mutante *AtmenG* an Stelle des Phyllochinons akkumuliert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass Phytol auch in Phyllochinon und PNQ inkorporiert werden kann. Inkubiert man *Arabidopsis*-Keimlinge der Linien Wildtyp, *AtmenG* sowie *AtmenG* + At1g23360 in Flüssigmedium supplementiert mit radioaktiv markiertem Phytol, so erkennt man in den anschließend isolierten, aufgetrennten und sichtbar gemachten Lipiden in den Linien Wildtyp und *AtmenG* + At1g23360 eine Bande, die mit dem nicht radioaktiven Phyllochinon-Standard komigriert. Diese ist in der Mutante *AtmenG* nicht vorhanden, jedoch taucht in *AtmenG* eine neue Bande mit etwas geringerem Retentionsfaktor auf (Abb. 23). Dieses Ergebnis bestätigt die Phyllochinonmessungen mittels HPLC, d.h. auch dieses Experiment zeigt, dass in der Mutante kein Phyllochinon, sondern 2-Phytyl-1,4-naphthochinon akkumuliert, welches bedingt durch die fehlende Methylgruppe wie auch in der HPLC eine leicht veränderte Retention aufweist.

Es konnte folglich nachgewiesen werden, dass in der Mutante *AtmenG* das Gen PNQ-Methyltransferase durch die T-DNA-Insertion GABI_565F06 vollständig blockiert ist, d.h. es handelt sich um eine Nullmutation. Dadurch kann kein Phyllochinon mehr gebildet werden kann, sondern es akkumuliert das Zwischenprodukt PNQ. Außerdem wurde gezeigt, dass dieser Phänotyp durch Transformation der cDNA von At1g23360 komplementiert werden kann, d.h. At1g23360 kodiert in *Arabidopsis* die PNQ- Methyltransferase. Da die massive Überexpression der PNQ-Methyltransfearse in *AtmenG* keine gesteigerte Phyllochinon-Biosynthese zur Folge hatte (Abb. 21 und 22), kann zudem festgestellt werden, dass die Methylierung von PNQ zu Phyllochinon in *Arabidopsis* keinen limitierenden Schritt der Phyllochinon-Biosynthese darstellt.

4.2.2 Die Plastoglobuli sind Speicher für überschüssiges Phyllochinon und PNQ

Phyllochinon ist als integraler Bestandteil des Photosystems I innerhalb der Chloroplasten in den Thylakoiden lokalisiert. Mit Hilfe des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) konnte gezeigt werden, dass das Protein AtmenG ebenfalls in den Chloroplasten lokalisiert ist, d.h. dass die Methylierung von PNQ zu Phyllochinon dort stattfindet.

In früheren Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass in jedem Photosystem I zwei Moleküle Phyllochinon vorhanden sind (Ben-Shem *et al.*, 2003). Gross *et al.* (2006) hat gezeigt, dass Mutationen in den Genen Isochorismatsynthase 1 und 2 (ICS1, ICS2) zwar zu einer Reduzierung des Phyllochinongehalts in diesen Pflanzen führen, die Aktivität des Photosystems I jedoch nicht in gleichem Maße betroffen ist. Dies führte zu der Annahme, dass Phyllochinon nicht nur im Photosystem I lokalisiert ist, sondern auch in anderen Fraktionen der Chloroplasten gefunden werden kann. Berechnet man für den Wildtyp und die Mutante *AtmenG* zudem mit Hilfe der Messdaten aus den Chorophyll-, PSI- sowie Phyllochinon- bzw. PNQ-Bestimmungen (Abb. 29, 34B und 22) die Anzahl der Moleküle Phyllochinon bzw. PNQ pro Photosystem I, so ergibt sich mit etwa 3,1 Phyllochinonen pro PSI bzw. 4,4 PNQ pro PSI eine Zahl, die über dem theoretischen Wert von 2 Molekülen pro PSI liegt (Tab. 2). Es stellte sich folglich die Frage, wo das überschüssige Phyllochinon bzw. PNQ lokalisiert ist.

	Chl a+b	Chl a+b	Phyllochinon	Phyllochinon	Phyllochino/PSI	PSI/Chl a+b	Phyllochinon/PSI
			bzw. PNQ	bzw. PNQ	bzw. PNQ/PSI		bzw. PNQ/PSI
	[µg g ⁻¹ FG]	[µmol g ⁻¹ FG]	[µg g ⁻¹ FG]	[µmol g ⁻¹ FG]	[nmol mol ⁻¹]	[nmol mol ⁻¹]	
Wildtyp	1338	1,5	4,6	10,1	6,8	2,22	3,1
AtmenG	1342	1,5	5,7	13,1	8,8	1,99	4,4

Tab. 2: Anzahl der Moleküle Phyllochinon bzw. PNQ pro Photosystem I in WT und AtmenG

Basierend auf Messungen des Chlorophyll-, Phyllochinon- bzw. PNQ- und PSI-Gehalts in den Linien WT und *AtmenG* wurde die Anzahl der Moleküle Phyllochinon bzw. PNQ pro PSI berechnet.

Für den Wildtyp wurde ein Verhältnis von 3,1 Phyllochinonmolekülen pro PSI berechnet (Tab. 2), d.h. etwa zwei Drittel des Gesamtphyllochinons sind notwendig, um den theoretischen Wert von 2 Phyllochinon pro PSI zu erreichen. Messungen des Phyllochinongehalts in einzelnen Chloroplastenfraktionen haben gezeigt, dass im Wildtyp etwa 60 % des Gesamtphyllochinons in den Thylakoiden und zirka 30 % in den Plastoglobuli vorhanden sind. Das überschüssige Drittel Phyllochinon ist also hauptsächlich in den Plastoglobuli lokalisiert und nicht mit dem PSI oder - wie bisher angenommen (Gross *et al.*, 2006) - außerhalb der Chloroplasten assoziiert. Dies bestätigt zudem die Ergebnisse früherer Experimente, in denen Phyllochinon als eine Substanz, die in den Plastoglobuli gespeichert wird, identifiziert werden konnte (Tevini und Steinmüller, 1985).

In der Mutante *AtmenG* konnte mit 5,7 μ g g⁻¹ FG etwa 25 % mehr PNQ als Phyllochinon im Wildtyp gemessen werden. Die Messungen des Phyllochinon- und PNQ-Gehalts in den einzelnen Fraktionen der Chloroplasten zeigten, dass das Verhältnis von Phyllochinon pro Fettsäuren in den Plastoglobuli des Wildtyps zirka 0,0047 beträgt, dieser Wert in der Mutante *AtmenG* mit 0,0154 jedoch mehr als dreimal so hoch ist. Der Überschuss an PNQ in *AtmenG* wird folglich in den Plastoglobuli gespeichert. Die Ergebnisse bestätigen, dass die Plastoglobuli als Speicher für sowohl Phyllochinon als auch für dessen Vorstufen dienen.

4.2.3 In der Mutante AtmenG ist die Anthocyanin-Biosynthese beeinträchtigt

Anthocyanine sind sekundäre Metabolite der Pflanze, die zahlreiche wichtige Funktionen übernehmen. Neben der Bedeutung als Blütenpigmente und Signalmolekül zwischen der Pflanze und verschiedenen Mikroorganismen spielen sie vor allem als Schutzpigmente bei übermäßiger UV-Strahlung in der Photosynthese eine wichtige Rolle (Winkel-Shirley, 2001). Auch in *Arabidopsis* werden nach Hochlichtstress vermehrt Anthocyanine gebildet, um die Photosysteme der Pflanze vor zu starkem UV-Licht und dadurch entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies zu schützen (Nagata *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Mutation im Gen At1g23360, welches die PNQ-Methyltransferase kodiert, Einfluss auf die hochlichtinduzierte Anthocyaninbiosynthese hat. Diese wird im Wildtyp und in der komplementierten Linie *AtmenG* + At1g23360 als Rotfärbung der Blätter nach Hochlichtstress deutlich sichtbar, während sich die Blätter der

Mutante AtmenG weniger stark verfärben (Abb. 26A). Ein ähnlicher Effekt konnte bereits in anderen Arabidopsis-Mutanten beobachtet werden. So wurde gezeigt, dass sowohl in der ascorbatdefizienten Mutante vtc2-2 (Giacomelli et al., 2006) als auch in der tocopheroldefizienten Mutante vtel (Porfirova et al., 2002) die Akkumulation der Anthocyanine nach Hochlichtstress gegenüber dem Wildtyp verringert ist. Es ist überraschend. dass Mutationen in Genen. welche in die Biosynthese von Chloroplastenlipiden involviert sind, wie dies bei AtmenG und vtel der Fall ist, Auswirkungen auf die Anthocyaninbiosynthese haben. Denn diese werden im Cytosol der Zelle synthetisiert und kommen vor allem in den Vakuolen vor, d.h. es muss ein Transport der Anthocyanine vom Ort ihrer Synthese in die Chloroplasten stattfinden, damit sie dort ihre Schutzfunktion ausüben können.

Solfanelli et al. (2006) konnte zeigen, dass verschiedene Zucker - vor allem jedoch Saccharose - die Induktion der Anthocyanin-Biosynthese in Arabidopsis induzieren. Dabei werden in erster Linie die Gene CHS, DFR und LDOX sowie der Transkriptionsfaktor PAP1 induziert. Dies korreliert mit den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR-Experimenten, in denen ebenfalls gezeigt wurde, dass vor allem die Gene CHS, DFR and LDOX nach Hochlichtstress sehr stark induziert werden. Diese Induktion ist in der Mutante AtmenG jedoch signifikant geringer. Daher kann vermutet werden, dass die Induktion der Anthocyaninbiosynthese durch Saccharose in der Mutante AtmenG beeinträchtigt ist. Ein Grund hierfür könnte die geringere photosynthestische die Leistung von AtmenG nach Hochlichtstress sein. eine reduzierte Kohlenstoffassimilation und damit verminderte Synthese von Zuckern in der Zelle zur Folge hat.

Interessanterweise haben die Messungen zudem ergeben, dass die Expression des Transkriptionsfaktors PAP1 nach Hochlichtstress in *AtmenG* signifikant stärker induziert wird als im Wildtyp und der komplementierten Linie *AtmenG* + At1g23360. Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor PAP1 die Expression verschiedener Gene der Anthocyaninbiosynthese reguliert, so z.B. CHS und DFR (Borevitz *et al.*, 2000). Denkbar ist daher, dass in der Mutante *AtmenG* noch weitere, bisher unbekannte Regulationsmechanismen greifen, durch welche die geringere Expression von CHS, DFR und LDOX in *AtmenG* ausgeglichen werden soll. So könnte zum Beispiel durch eine erhöhte Genexpression von PAP1 die Expression von CHS, DFR und LDOX positiv beeinflusst werden.

78

4.2.4 Hochlicht induziert den Xanthophyllzyklus in AtmenG stärker

Die Xanthophylle gehören zu den Carotinoiden und haben u. a. eine wichtige Funktion als Photoprotektoren, d.h. sie schützen durch regulierte Wärmedissipation die Photosysteme vor übermäßiger, absorbierter Lichtenergie und verhindern damit die Bildung von Sauerstoffradikalen, welche die Thylakoidlipide und die Proteine der Photosysteme schädigen können (Horton und Ruban, 1992). Besonders wichtig dabei ist Zeaxanthin (Z), welches im so genannten Xanthophyllzyklus ausgehend vom Violaxanthin (V) durch die Aktivität einer Deepoxidase gebildet wird, aber auch Antheraxanthin (A), das Zwischenprodukt dieser Umwandlung spielt eine wichtige Rolle (Demming-Adams *et al.*, 1990; Gilmore und Yamamoto, 1993). Induziert wird diese Umwandlung durch Licht hoher Intensitäten, während die umgekehrte Reaktion durch Dunkelheit und Schwachlicht gefördert wird (Abb. 37).



Abb. 37: Xanthophyll-Zyklus

Violaxanthin wird durch die Aktivität einer Deepoxidase über das Zwischenprodukt Antheraxanthin in Zeaxanthin umgewandelt. Diese Reaktion wird durch Starklicht (HL), die Rückreaktion durch Schwachlicht (NL) induziert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass in *AtmenG* im Vergleich zum Wildtyp und der komplementierten Linie *AtmenG* + At1g23360 im Gegensatz zu den Pigmenten Lutein, Neoxanthin und β -Carotin nach Hochlichtstress insgesamt signifikant mehr Xanthophylle gebildet werden. Zum anderen wurde deutlich, dass die durch Starklicht induzierte Umwandlung von Violaxanthin in Zeaxanthin in *AtmenG* signifikant größer ist als in den beiden anderen Linien (Abb. 30). Dabei konnte eine Zunahme von sowohl Antheraxanthin als auch von Zeaxanthin in Bezug auf den Gesamt-Xanthophyllgehalt (V+A+Z) gemessen werden. Beide Xanthophylle fungieren als Schutzpigmente des PSII (Gilmore und Yamamoto, 1993), so dass festgestellt werden kann, dass in *AtmenG* der Mechanismus der Photoprotektion durch Hochlicht stärker induziert wird als im Wildtyp und der komplementierten Linie.

4.2.5 Bedeutung der Methylierung von Phyllochinon für die Photosynthese

Arabidopsis-Pflanzen mit einer Mutation im Gen At1g23360 (AtmenG), welches die PNQ-Methyltransferase kodiert, sind frei von Phyllochinon. Ebenso wie diese Mutante *AtmenG* ist die Mutante *abc4* (*AtmenA*; Shimada *et al.*, 2005) phyllochinonfrei. Während das Wachstum und die photosynthetische Leistung von *abc4* jedoch erheblich reduziert sind, sind Photosynthese und Wachstum von *AtmenG* kaum beeinträchtigt. Dies lässt die Vermutung offen, dass 2-Phytyl-1,4-naphthochinon (PNQ) den Elektronenüberträger Phyllochinon im PSI zumindest teilweise ersetzen kann, was bereits in *Synechocystis* gezeigt wurde. In der phyllochinondefizienten *Synechocystis*-Mutante *menG* konnte PNQ an Stelle des Phyllochinons im Photosystem I lokalisiert werden. Die photosynthetische Leistung der Mutante *menG* war gegenüber dem Wildtyp leicht reduziert (Sakuragi *et al.*, 2002).

Unter Normallichtbedingungen ist die Photosynthese in *AtmenG* kaum beeinträchtigt (Abb. 32 bis 36). Das ist nicht erstaunlich, denn der limitierende Schritt des Elektronenflusses durch das Photosystem I ist die Bindung des Plastocyanin an das Photosystem I sowie der Elektronentransfer zum P_{700}^+ , dem Reaktionszentrum des Photosystem I (Hope, 2000; Finazzi *et al.*, 2005). Daher haben nur drastische Veränderungen auf der Akzeptorseite des Photosystems I maßgeblichen Einfluss auf den Elektronentransport. Durch Messungen der Elektronentransportrate (ETR) des PSI konnte gezeigt werden, dass dies in der Mutante *AtmenG* jedoch nicht der Fall ist, denn der Elektronentransport ausgehend vom Ascorbat über TMPD und Plastocyanin durch das Photosystem I zum Akzeptor Methylviologen war in *AtmenG* gegenüber den Linien Wildtyp und *AtmenG* + At1g23360 unverändert (Abb. 33). Dennoch kann vermutet werden, dass geringfügige Abweichungen auf der Akzeptorseite des Photosystems I, wie sie auch von Sakuragi *et al.* (2002) beschrieben wurden, zu kleinen Veränderungen im Photosystem I führen. So könnten die Elektronen

beispielsweise anstelle der Ferredoxinreduktion auf Sauerstoff übertragen werden, was zu oxidativen Schäden des Photosystems I führen könnte. Es ist bekannt, dass dies zu einem Verlust der Photosystem I-Untereinheiten PsaC, PsaD und PsaE und damit zum Abbau des gesamten Photosystems I führen kann (Scheller und Haldrup, 2005). Das könnte eine Erklärung dafür sein, dass in *AtmenG* die Menge an Photosystem I nach Hochlichtstress im Gegensatz zum Wildtyp und der komplementierten Linie verringert ist (Abb. 32 und 34), d.h. der geringere PSI-Gehalt könnte eine Folge des PSI-Abbaus durch oxidativen Stress darstellen, welcher nicht durch *de novo* Synthese ausgeglichen werden kann (Scheller und Haldrup, 2005). Diese These wird zudem durch die Messungen des Gehalts an Photosystem II (PSII) und Cyt-b₆/f-Komplex (Cyt-b₆f) gestützt. Während nämlich PSI in der Mutante *AtmenG* nach Hochlichtstress reduziert ist, konnten keine signifikanten Veränderungen in der Menge an PSII und Cyt-b₆f gemessen werden, d.h. nur Photosystem I scheint betroffen zu sein.

Ein weiterer Beweis, dass oxidativer Stress Grund für den reduzierten PSI-Gehalt in *AtmenG* sein könnte, ergibt sich aus den Abweichungen zwischen den einzelnen PSI-Quantifizierungen. Während der PsaC-Western Blot (Abb. 32) und die Bestimmung des *in vivo* P₇₀₀-Gehalts (Abb. 34A) eine starke Reduzierung der Menge an Photosystem I in *AtmenG* nach Hochlichtstress zeigen, weisen die Ergebnisse der 77-K-Fluoreszenz (Abb. 35) und der *in vitro* P₇₀₀-Qunatifizierung (Abb. 34B) eher darauf hin, dass der PSI-Gehalt in der Mutante nach Hochlichtstress deutlich weniger stark verringert ist.

Dieser Unterschied kann dadurch erklärt werden, dass die Eisen-Schwefel-Cluster F_A und F_B , welche an die Untereinheit PsaC des Photosystems I gebunden sind, während des Elektronentransfers enge Wechselwirkungen mit dem Phyllochinon eingehen. Veränderungen in der Phyllochinonstruktur, wie sie in der Mutante *AtmenG* auftreten, in der anstelle des Phyllochinons PNQ im Photosystem I lokalisiert ist, rufen vermutlich oxidativen Stress hervor, durch den PsaC als ein Teil des Photosystems I geschädigt werden könnte. Da PsaC für eine optimale Ladungsteilung im Photosystem I benötigt wird, kann ein Schaden am PsaC die *in vivo* P₇₀₀-Quantifizierung folglich stark beeinflussen. Dies ist eine denkbare Erklärung für die drastisch reduzierten Messdaten, wie sie in Abb. 32 und 34A zu sehen sind. Dass die *in vitro* P₇₀₀-Quantifizierung im Gegensatz dazu deutlich weniger betroffen ist, lässt sich damit erklären, dass in diesem Experiment die Elektronen vom ersten Eisen-Schwefel-Cluster F_x direkt auf den künstlichen Elektronenakzeptor Methylviologen übertragen werden können, indem sie den Eisen-

Schwefel-Cluster im PsaC umgehen. Eine Schädigung von PsaC hat in diesen Messungen weitaus weniger Einfluss auf die Messdaten.

Veränderungen in der Größe der Antennen des Photosystems I zeigen sich mit Hilfe der 77K-Fluoreszenz, denn die emittierte, gemessene Fluoreszenz stammt aus den Lhc-a-Proteinen, d.h. aus den Lichtsammelkomplexen der Antennen im Photosystem. Da unter Normallichtbedingungen gar keine Unterschiede, unter Hochlichtbedingungen nur geringe Unterschiede in der 77K-Fluoreszenz aller drei Linien gemessen werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass die Größe der Antennen in *AtmenG* kaum verändert ist.

Auch die Quantenausbeute des Photosystems II ist in der Mutante *AtmenG* verändert. Während in dunkeladaptierten Pflanzen (Abb. 36) die Quantenausbeute in allen drei Linien gleich ist, zeigt sich, dass diese in *AtmenG* – angezogen unter Normallichtbedingungen bereits im Bereich niedriger Lichtintensitäten gegenüber dem Wildtyp und der komplementierten Linie *AtmenG* + At1g23360 verringert ist. Der Mangel an funktionellem Photosystem I könnte Grund für einen verringerten Elektronenfluss durch das Photosystem II sein. In unter Hochlichtbedingungen angezogenen Pflanzen wird der Unterschied in der Quantenausbeute des Photosystems II noch deutlicher. Dies lässt vermuten, dass das Photosystem I bzw. deren Untereinheit PsaC unter diesen Bedingungen durch wie oben beschriebenen oxidativen Stress mehr geschädigt ist, wodurch der Elektronenfluss durch das Photosystem II noch stärker betroffen ist.

Die Methylierung des Phyllochinons ist folglich wichtig, um die maximale photosynthetische Effizienz der Pflanze zu gewährleisten. Dies gilt sowohl für Pflanzen, welche unter Normallichtbedingungen gewachsen sind, als auch für unter Hochlicht angezogene Pflanzen, in denen die Bedeutung der Methylgruppe für die Photosynthese jedoch noch deutlicher zu erkennen ist.

82

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei kritische Schritte der Phyllochinon- und Salicylatbiosynthese charakterisiert: zum einen die durch die Isochorismatsynthase (*ICS*) katalysierte Umwandlung von Chorismat zu Isochorismat, welches Vorstufe der Phyllochinon- und Salicylatbiosynthese ist; zum anderen die Methylierung von 2-Phytyl-1,4-naphthochinon (PNQ) durch die PNQ-Methyltransferase (AtmenG, At1g23360), dem letzten Schritt der Phyllochinon-Biosynthese.

In *Arabidopsis* existieren zwei Gene, die eine Isochorismatsynthase kodieren: ICS1 und ICS2. Bekannt war, dass die Nullmutante *ics1* noch immer Salicylat und Phyllochinon akkumuliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des zweiten Gens ICS2 auf die Biosynthese dieser beiden Moleküle untersucht. Ein Vergleich der Salicylat- und Phyllochinongehalte in den Linien *ics1*, *ics2* sowie *ics1ics2* hat gezeigt, dass auch das zweite Gen ICS2 in *Arabidopsis* funktionell aktiv ist, jedoch in deutlich geringerem Maße zur Gesamtaktivität der Isochorismatsynthasen beiträgt. Bei beiden Mutationen *ics1* und *ics2* handelt es sich um Nullmutationen, denn die Doppelmutante *ics1ics2* ist völlig frei von Phyllochinon. Dennoch akkumuliert in *ics1ics2* noch immer ein Rest Salicylat, was den Schluss zulässt, dass Salicylat in *Arabidopsis* nicht nur über den ICS-Weg, d.h. über das Zwischenprodukt Isochorismat gebildet werden kann, sondern dass ein weiterer Biosyntheseweg, vermutlich der sogenannte PAL-Weg aktiv ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass die verkürzte ICS-Domäne des Gens PHYLLO in *Arabidopsis* funktionell nicht aktiv ist.

Im Zweiten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass die Mutante *AtmenG*, welche eine Mutation im Gen der PNQ-Methyltransferase trägt, völlig frei von Phyllochinon ist, jedoch die unmethylierte Form des Phyllochinons, PNQ, akkumuliert. Sowohl Phyllochinon als auch PNQ sind in den Thylakoidmembranen, d.h. vor allem im Photosystem I lokalisiert. Überschüssige Mengen beider Moleküle werden dagegen in den Plastoglobuli gespeichert. In *AtmenG* übernimmt PNQ teilweise die Funktion des fehlenden Phyllochinons innerhalb des Photosystems I, wodurch die photosynthetische Effizienz beeinträchtigt wird. Dies wird besonders nach Hochlichtstress sichtbar. Die Menge an funktionellem Photosystem I ebenso wie die Quantenausbeute des Photosystems II sind in *AtmenG* verringert. Zudem ist

in *AtmenG* die hochlichtinduzierte Expression der Gene der Anthocyanin-Biosynthese reduziert, während der Xanthophyllzyklus in *AtmenG* durch Hochlichtstress stärker als im Wildtyp angeregt wird, vermutlich um die Photosysteme vor übermäßiger Lichtenergie zu schützen.

6 Ausblick - Möglichkeiten zur Erhöhung des Phyllochinongehalts in Nutzpflanzen am Beispiel der Tomate

Phyllochinon ist für den Menschen ein wichtiges Vitamin und muss über die Nahrung aufgenommen werden. Da Phyllochinon als Cofaktor für die Carboxylierung zahlreicher Proteine wie verschiedener Blutgerinnungsfaktoren oder Faktoren der Knochenbildung verantwortlich ist (Furie, 1988), ist eine ausreichende Versorgung mit Phyllochinon für den Menschen sehr wichtig. Während früher angenommen wurde, dass die tägliche Zufuhr an Phyllochinon mehr als ausreichend ist, hat sich dies in den letzten Jahren verändert, so dass mittlerweile davon ausgegangen wird, dass vor allem jüngere Menschen nicht immer genügend Phyllochinon zu sich nehmen (McBride, 2000).

Während vor allem in grünem Gemüse große Mengen an Phyllochinon enthalten sind, können in vielen anderen Lebensmitteln nur deutlich geringere Gehalte gemessen werden (Tab. 3). So enthält das weit verbreitete Lebensmittel die Kartoffel in gekochter Form nur 0,02 bis 0,03 μ g g⁻¹ FG. In Mais und Reis - vor allem in ärmeren Ländern häufig verwendete Nahrungsmittel - können nur 0,05 μ g g⁻¹ FG bzw. 0,01 μ g g⁻¹ FG nachgewiesen werden. In anderen Gemüsesorten wie Paprika oder Karotten konnten maximal 0,2 μ g g⁻¹ FG gemessen werden. Viele Getreide weisen ebenfalls nur einen geringen Phyllochinon-gehalt auf: So enthalten Mehle aus Weizen oder Gerste nicht mehr als 0,01 μ g g⁻¹ FG.

	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG]			
	roh	gekocht		
Kartoffel	0,016 bis 0,022	0,02 bis 0,03		
Paprika	0,05 bis 0,07	0,16 bis 0,21		
Zwiebel	0,002	0,22		
Karotte	0,05	0,18		
Blumenkohl	0,05	0,1		
Mais	0,005	-		
Weizenmehl	0,0	06		
Gerstenmehl	0,01			
Reis	0,01			

Tab. 3: Verbreitete Nahrungsmittel mit geringem Phyllochinongehalt (aus Booth *et al.*, 1993, 1995)

Aus diesem Grunde ist es erstrebenswert, den Gehalt an Phyllochinon in ausgewählten Nahrungsmitteln durch gentechnische Veränderung zu erhöhen, um damit die Aufnahme des täglichen Bedarfs an Phyllochinon sicher zu stellen. Eine mögliche Nutzpflanze für diesen Zweck ist die Tomate.



Abb. 38: Tomatenproduktion weltweit von 1976 bis 2006

Zwar stammt die Tomate ursprünglich aus dem mittel- und südamerikanischen Raum, doch mittlerweile hat sie weltweite Verbreitung gefunden. Die wichtigsten Anbaugegenden sind dabei Asien mit etwa 67 Mio. t gefolgt von Europa mit 16,5 Mio. t im Jahr 2006. In Nordafrika und Nordamerika wurden im Jahr 2006 jeweils zirka 11 Mio. t Tomaten geerntet (http://www.faostat.fao.org). Zudem hat sich die weltweite Tomatenproduktion in den letzten 30 Jahren von 45 Mio. t im Jahr 1976 auf etwa 125 Mio. t im Jahr 2006 beinahe verdreifacht (Abb. 38) und könnte in Anbetracht der steigenden Weltbevölkerung weiter steigen. Momentan wird das Genom der Tomate sequenziert (http://sgn.cornell.edu), wodurch nach und nach mehr Informationen über die Gene der Tomate bereit stehen werden. Zudem existiert bereits eine Datenbank mit EST-Klonen, welche sich mit fortschreitender Sequenzierung des Tomatengenoms weiter vergrößern wird. Zudem ist die Transformation der Tomatenpflanze leicht durchführbar. Um die Eignung der Tomate zur Erhöhung des Phyllochinongehalts zu überprüfen, wurden in einem vorbereitenden Experiment verschiedene Komponenten des Isoprenoidstoffwechsels in reifenden Früchten bestimmt und die Datenbanken nach ESTs mit Sequenzähnlichkeit zu Genen der Phyllochinon-Biosynthese durchmustert.

Dargestellt ist die Menge der weltweit produzierten Tomaten in den Jahren 1976 bis 2006 in Millionen Tonnen. (Food and Agriculture Organization of the United Nations, http://www.faostat.fao.org)



Abb. 39: Phyllochinon-, β-Carotin- und Lycopingehalt in Tomatenfrüchten

Phyllochinon, β -Carotin und Lycopin wurden aus Tomatenfrüchten verschiedener Entwicklungsstadien isoliert und deren Konzentrationen mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD in μ g g⁻¹ TG bzw. μ g g⁻¹ FG von jeweils drei Messungen (siehe auch Tab. XI und XII)

In Extrakten aus Tomatenfrüchten verschiedener Reifestadien wurde die Menge an Phyllochinon mittels HPLC bestimmt. Der Reifegrad der untersuchten Früchte sollte zudem durch Messungen des β -Carotin- und Lycopingehalts per HPLC bestätigt werden. Es wird deutlich, dass mit zunehmender Reife, d.h. mit steigendem Lycopingehalt, die Menge an Phyllochinon in der Tomatenfrucht abnimmt. Beträgt der Phyllochinongehalt in der grünen Frucht noch etwa 0,28 µg g⁻¹ FG, so nimmt dieser bis zum Ende der Reife auf nur noch etwa 0,04 µg g⁻¹ FG ab (Abb. 39).

Die Tomatenfrucht, welche in den Lebensmittelhandel oder auch zur weiteren Verarbeitung in die Lebensmittelindustrie gelangt, enthält folglich nur sehr wenig Phyllochinon. Um die in Tomaten gebildete Menge an Phyllochinon zu erhöhen, bedarf es Kenntnisse über deren Biosynthese. Diese wurde bisher in der Tomate noch nicht näher untersucht, so dass bislang unbekannt ist, welche Gene für welche enzymatischen Schritte verantwortlich sind. Zwar ist das Genom der Tomate noch nicht vollständig sequenziert, jedoch existieren Datenbanken (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/; http://ted.bti.cornell.edu), in denen Informationen über die bereits sequenzierten Bereiche des Genoms und entsprechende EST-Klone hinterlegt sind. Durch Sequenzabgleiche der in *Arabidopsis* bereits bekannten Gene des Phyllochinon-Biosyntheseweges mit den Informationen in den genannten Datenbanken konnte für jedes *Arabidopsis*-Gen mindestens ein sequenzähnlicher EST-Klon aus der Tomate gefunden werden (Tab. 4). Diese könnten als Ansatzpunkt zur Aufklärung der Biosynthese von Phyllochinon in der Tomate dienen.

Gen	MIPS-Code	5' EST-Klon	Gene Bank Accession	
	Arabidopsis	Tomate	Tomate	
ICS1	At1g74710			
ICS2	At1g18870	EST309187	AW398687	
PHYLLO (AtmenD)	At1g68890	siehe AtmenD	siehe AtmenD	
PHYLLO (AtmenC)	At1g68900	EST548233	BI928344	
AAE14	At1g30250	EST545900	BI926011	
AtmenB	At1g60550	EST584639	BM410312	
		BP901679	BP901679	
PHYLLO (AtmenH)	At1g68900	siehe AtmenD	siehe AtmenD	
ABC4	At1g60600	EST277232	AW033661	
		EST277096	AW033525	
		EST279295	AW035024	
		EST266067	AI896624	
AtmenG	At1g23360	BP901380	BP901380	
		BP881554	BP881554	
		EST476114	BG130468	
		BP910273	BP910273	
		EST358564	AW932721	

Tab. 4: EST-Klone aus Tomate mit Sequenzähnlichkeit zu Genen der Phyllochinon-Biosynthese in *Arabidopsis*

Sequenzen der bereits bekannten Gene des Phyllochinon-Biosyntheseweges in *Arabidopsis* wurden mit den Einträgen der Datenbanken http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/ und http://ted.bti.cornell.edu verglichen. Die Tabelle zeigt die EST-Klone, welche die größten Sequenzähnlichkeiten zu *Arabidopsis*-Genen zeigen.

Während des Reifungsprozesses kommt es zur Umdifferenzierung von Chloroplasten zu Chromoplasten (Harris und Spurr, 1969). Die grüne Frucht besitzt zudem photosynthetisch aktives Gewebe. Diese Aktivität verringert sich im Laufe der Fruchtreife, d.h. während der Chloroplast-Chromoplast-Umwandlung, und Pigmente sowie Proteine des Photosyntheseapparates werden sukzessive abgebaut (Piechulla et al., 1987). Denkbar ist daher, dass auch Phyllochinon mit zunehmender Reife in der Tomatenfrucht abgebaut wird. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Gene der Phyllochinon-Biosynthese im Laufe der Reife abgeschaltet werden, so dass Phyllochinon nicht mehr neu produziert wird. Die Tomatenfrucht wächst, doch die Gesamtmenge an Phyllochinon bleibt konstant, wodurch sich der Gehalt pro Frischgewicht immer weiter verringert. Mit Hilfe von Expressionsanalysen könnte untersucht werden, ob der geringe Phyllochinongehalt in der reifen Tomatenfrucht durch ein Abschalten der Biosynthese-Gene bedingt ist. Wenn dies der Fall wäre, so könnten diese Gene gezielt überexpremiert werden. Auch ist ein Abbau des Phyllochinons mit zunehmender Reife denkbar. Dann könnten Gene, die für diesen Prozess verantwortlich sind, durch das gezielte Einbringen von RNAi-Konstrukten in die Tomatenfrucht abgeschaltet werden. Unklar bisher ist zudem, welche enzymatischen Schritte der Phyllochinon-Biosynthese limitierend sind. Durch Überexpressionsexperimente einzelner Gene dieses Stoffwechselweges in Arabidopsis (Lohmann, Diplomarbeit 2005) konnten bisher keine Gene identifiziert werden, die für die Phyllochinon-Biosynthese limitierend sind. Dies gilt auch für die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Gene ICS 1 und 2 sowie AtmenG. Vorstellbar ist, dass innerhalb des Biosyntheseweges, d.h. ausgehend vom Chorismat bis hin zum Phyllochinon, keine limitierenden Schritte existieren. Dann bestünde noch die Möglichkeit die Pflanze dahingehend zu modifizieren, dass sie vermehrt Chorismat bildet, so dass dadurch die Entstehung von Phyllochinon positiv beeinflusst wird.

Phyllochinon ist Bestandteil des Photosyntheseapparates und wird daher vermutlich zum Großteil in photosynthetischen Geweben synthetisiert. Dies unterscheidet die reife Tomatenfrucht deutlich vom *Arabidopsis*-Blatt, so dass das bisherige Wissen über die Phyllochinon-Biosynthese in *Arabidopsis* für die Frucht der Tomate so nicht gültig ist.

89

7 Literaturverzeichnis

Balz M, Schulte E, Thier H-P (1992) Trennung von Tocopherolen und Tocotrienolen durch HPLC. Fat Sci Technol **94:** 209-213

Bauer J, Hiltbrunner A, Weibel P, Vidi PA, Alvarez-Huerta M, Smith MD, Schnell DJ, Kessler F (2002) Essential role of the G-domain in targeting of the protein import receptor atToc159 to the chloroplast outer membrane. J Cell Biol **159**: 845-854

Ben-Shem A, Frolow F, Nelson N (2003) Crystal structure of plant photosystem I. Nature **426**: 630-635

Biggins J, Mathis P (1988) Functional role of vitamin K_1 in photosystem I of cyanobacterium *Synechocystis* 6803. Biochem **27**: 1494-1500

Billeter M, Martius C (1960) Über die Umwandlung von Phyllochinon (Vitamin-K1) in Vitamin-K2(20) im Tierkörper. Biochem Z **333**: 430-439

Blanc G, Hokamp K, Wolfe KH (2003) A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the *Arabidopsis* genome. Genome Research **13**: 137-144

Borevitz JO, Xia Y, Blount J, Dixon RA, Lamb C (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell **12**: 2383-2393

Booth SL, Sadowski J, Weihrauch J, Ferland G (1993) Vitamin K-1 (phylloquinone) content of foods: A provisional table. J Food Com Anal **6**: 109-120

Booth SL, Pennington JAT, Sadowski JA (1996) Food sources and dietary intakes of vitamin K-1 (phylloquinone) in the American diet: data from the FDA Total Diet Study. J Am Diet Assoc **96**: 149-154

Booth SL, Suttie JW (1998) Dietary intake and adequacy of vitamin K1. J Nutr 128: 785-788

Briggs GC, Osmont KS, Shindo C, Sibout R, Hardtke CS (2006) Unequal genetic redundancies in Arabidopsis – a neglected phenomenon? Trends Plant Sci **11**: 492-498

Browse J, McCourt PJ, Somerville CR (1986) Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methylation formation from fresh tissue. Anal Biochem **152**: 141-145

Buchanan B, Gruissem W, Jones RL (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland

Conly JM, Stein K (1992) The production of menaquinones (vitamin K2) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. Prog Food Nutr Sci **16**: 307-343

Conly JM, Stein K (1992) Quantitative and qualitative measurements of K vitamins in human intestinal contents. Am J Gastroenterol **87**: 311-316

Dahm C, Müller R, Schulte G, Schmidt K, Leistner E (1998) The role of isochorismate hydroxymutase genes *entC* and *menF* in enterobactin and menaquinone biosynthesis in *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta **1425**: 377-386

Dam H (1929) Cholesterinstoffwechsel in Hühnereiern und Hühnchen. Biochem Z 215: 475-492

Dam H (1935) The antihaemorrhagic vitamin of the chick. Biochem J 24: 1273-1285

Dam H und Schönheyder F (1936) The occurrence and chemical nature of vitamin K. Biochem J **30**: 897-901

Damon M, Zhang NZ, Haytowitz DB, Booth SL (2005) Phylloquinone (vitamin K-1) content of vegetables. J Food Compos Anal **18:** 751-758

Daruwala R, Kwon O, Meganathan R, Hudspeth MES (1996) A new isochorisamte synthase specifically involved in menaquinone (vitamin K₂) biosynthesis encoded by the *menF* gene. FEMS Microbiol Lett **140**: 159-163

Daruwala R, Bhattacharyya DK, Kwon O, Meganathan R (1997) Menaquinone (vitamin K-2) biosynthesis: Overexpression, purification and characterization of a new isochorismate synthase from *Escherichia coli*. J Bacteriol **179**: 3133-3138

Demming-Adams B, Adams WW, Heber U, Neimanis S, Winter K, Krüger A, Czygan FG, Bilger W, Björkman O (1990) Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. Plant Phys **92**: 293-301

Dempsey DA, Shah J, Klessig DF (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. Crit Rev Plant Sci **18**: 547-575

Dewdney J, Reuber TL, Wildermuth MC, Devoto A, Cui J, Stutius LM, Drummond EP, Ausubel FM (2000) Three unique mutants of *Arabidopsis* identify *eds* loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. Plant J **24:** 205-218 **Ferreira DW, Haytowitz DB, Tassinari MA, Peterson JW, Booth SL** (2006) Vitamin K contents of grains, cereals, fast food breakfasts, and baked goods. J Food Sc **71**: 66-70

Finazzi G, Sommer F, Hippler M (2005) Release of oxidized plastocyanin from photosystem I limits electron transfer between photosystem I and cytochrome $b_{d}f$ complex *in vivo*. Proc Natl Acad Sci **102**: 7031-7036

Furie B und Furie BC (1988) The molecular basis of blood coagulation. Cell 53: 505-518

Gaudilliere J-P, d'Harlingue A, Camara B, Moneger R (1984) Prenylation and methylation reactions in phylloquinone (vitamin K₁) synthesis in *Capsicum annuum* plastids. Plant Cell Rep **3**: 240-242

Giacomelli L, Rudella A, van Wijk KJ (2006) High light response of the thylakoid proteome in *Arabidopsis* wild type and the ascorbate-deficient mutant *vtc2-2*. A comparative proteomics study. Plant Phys 141: 685-701

Gilmore AM, Yamamoto HY (1993) Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. Photosynth Res **35**: 67-78

Gross J, Cho WK, Lezhneva L, Falk J, Krupinska K, Shinozaki K, Seki M, Hermmann RG, Meurer J (2006) A plant locus essential for phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. J Biol Chem **281**: 17189-17196

Harris WM, Spurr AR (1969) Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. Amer J Bot 56: 380-389

Heldt H-W (2002) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin

Höfgen R, Willmitzer L (1990) Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). Plant Sci 66: 221-223

Hope AB (2000) Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms. Biochim Biophys Acta **1456**: 5-26

Horton P, Ruban AV (1992) Regulation of photosystem II. Photosynth Res 34: 375-385

Ischebeck T, Zbierzak AM, Kanwischer M, Dörmann P (2006) A salvage pathway for phytol metabolism in Arabidopsis. J Biol Chem **281**: 2470-2477

Izawa S (1980) Acceptors and donors and chloroplast electron transport. Methods Enzymol 69: 413-434

Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Hugueney P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyere C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pe ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quetier F, Wincker P (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature **449**: 463-468

Jakob E, Elmadfa I (1996) Application of a simplified HPLC assay for the determination of phylloquinone (vitamin K_1) in animal and plant food items. Food Chem. **56**: 87-91

Johnson TW, Shen G, Zybailov B, Kolling D, Reategui R, Beauparlant S, Vassiliev IR, Bryant DA, Jonesi AD, Golbeck JH, Chitnis PR (2000) Recruitment of a foreign quinone into the A1 site of photosystem I. I. Genetic and physiological characterization of phylloquinone biosynthetic pathway mutants in *Synechocystis* sp. PCC 6803. J Biol Chem 275: 8523-8530

Johnson TW, Naithania S, Stewart Jr C, Zybailov B, Jonesc AD, Golbeck JH, Chitnis PR (2003) The menD and menE homologs code for 2-succinyl-6-hydroxyl-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase and O-succinylbenzoic acid-CoA synthase in the phylloquinone biosynthetic pathway of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochim Biophs. Acta **1557**: 67-76

Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosochi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res **3**:109–136

Kim HU, van Oostende C, Basset GJC, Browse J (2008) The *AAE14* gene encodes the *Arabidopsis* o-succinylbenzoyl-CoA ligase that is functional for phylloquinone synthesis and photosystem-I function. Plant J (in press)

Kirchhoff H, Mukherjee U, Galla HJ (2002) Molecular architecture of the thylakoid membrane: lipid diffusion space for plastoquinone. Biochemistry **41:** 4872-4882

Kirchhoff H, Schöttler MA, Maurer J, Weis E (2004) Plastocyanin redox kinetics in spinach chloroplasts: evidence for disequilibrium in the high potential chain. Biochim Biophys Acta **1659**: 63-7

Kitamura S, Shikazono N, Tanaka A (2004) TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in Arabidopsis. Plant J **37:** 104-114

Koncz C, Schell J (1986) The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol Gen **204**: 383-396

Kwon O, Hudspeth MES, Meganathan R (1996) Anaerobic biosynthesis of enterobactin in *Escherichia coli*: Regulation of *entC* gene expression and evidence against its involvement in menaquinone (vitamin K_2) biosynthesis. J Bacteriol **178**: 3252-3259

Lamkemeyer P, Laxa M, Collin V, Li W, Finkemeier I, Schottler MA, Holtkamp V, Tognetti VB, Issakidis-Bourguet E, Kandlbinder A, Weis E, Miginiac-MaslowM, Dietz KJ (2006) Peroxiredoxin Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis. Plant J **45**: 968-981

Lange BM, Ghassemian M (2003) Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: A survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. Plant Mol Biol **51**: 925-948

Lange H und Mohr H (1971) Analysis of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis. Plant Physiol 47: 649-655

Lee HI, León J, Raskin I (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. Proc Natl Acad Sci 92: 4076-4079

Lee PT, Hsu AY, Ha HT, Clarke CF (1997) A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: Isolation and identification of the *Escherichia coli* ubiE gene. J Bacteriol **179**: 1748-175

Liu J, Quinn N, Berchtold GA, Walsh CT (1990) Overexpression, purification, and characterization of isochorismate synthase (EntC), the first enzyme involved in the biosynthesis of enterobactin from chorismate. Biochemistry **29**: 1417-1425

Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. Anal Biochem 163: 16-20

Lohmann A (2005) Die Biosynthese von Phyllochinon (Vitamin K) in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin

Lohmann A, Schöttler MA, Bréhélin C, Kessler F, Boch R, Cahoon EB, Dörmann P (2006) Deficiency in phylloquinone (vitamin K₁) methylation affects prenyl quinone distribution, photosystem I abundance, and anthocyanin accumulation in the *Arabidopsis AtmenG* mutant. J Biol Chem. **281**: 40461-40472 **Mauch-Mani B, Slusarenko J** (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. Plant Cell **8**: 203-212

MacCorquodale DW, Cheney LC, Binkley SB, Holcomb WF, McKee RW, Thayer SA, Doisy EA (1939) The constitution and synthesis of vitamin K₁. J Biol Chem **131**: 357-370

McBride J (2000) Vitamin K: Another reason to eat your greens. Agricult Res 48 (1): 16-17

McCarthy PT, Shearer MJ, Gau G, Crampton OE, Barkhan P (1986) Vitamin-K content of human-liver at different ages. Haemostasis 16: 84-85

Mansfield RW, Evans MCW (1985) Optical difference spectrum of the electron acceptor A0 in photosystem I. FEBS 190: 237-241

Meganathan R (2001) Biosynthesis of menaquinone (vitamin K-2) und ubiquinone (coenzyme Q): A perspective on enzymatic mechanisms. Vitam Horm **61**: 173-218

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15:** 473-479

Nagata T, Todoriki S, Masumizu T, Suda I, Furuta S, Du Z, Kikuchi S (2003) Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in Arabidopsis. J Agric Food Chem 51: 2992-2999

Nawrath C, Métraux JP (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. Plant Cell **11**: 1393-1404

Palaniappan C, Sharma V, Hudspeth MES, Meganathan R (1992) Menaquinone (vitamin K-2) biosynthesis – Evidence that the *Escherichia coli* menD gene encodes both 2-Succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylicacid synthase and alpha-ketoglutarate decarboxylase activities. J Bacteriol **174**: 8111-8118

Peterson JW, Muzzey KL, Haytowitz D, Exler J, Lemar L, Booth SL (2002) Phylloquinone (vitamin K-1) and dihydrophylloquinone content of fats and oils. J Am Oil Chem Soc **79**: 641-646

Piechulla B, Glick RE, Bahl H, Melis A, Gruissem W (1987) Changes in photosynthetic capacity and photosynthetic protein pattern during tomato fruit ripening. Plant Physiol **84**: 911-917

Porfirova S, Bergmüller E, Tropf S, Lemke R, Dörmann P (2002) Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclise essential for all Tocopherol biosynthesis. Proc Natl Acad Sci **99**: 12495-12500

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standard by atomic absorption spectroscopy. Biochim Biophys Acta **975**: 384-394

Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci Lett **339:** 62–66.

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. J Gen Microb **111**: 1-61

Rowland BM, Taber HW (1996) Duplicate isochorismate synthase genes of *Bacillus subtilis*: Regulation and involvement in the biosynthesis of menaquinone and 2,3-dihydroxybenzoat. J Bacteriol **178**: 854-861

Sakuragi Y, Zybailov B, Shen G, Jones AD, Chitnis PR, van der Est A, Bittl R, Zech S, Stehlick D, Golbeck JH, Braynt DA (2002) Insertional inactivation of the *menG* gene, encoding 2-phytyl-1,4-naphthoquinone methyltransferase of *Synechocystis* sp. PCC 6803, results in the incorporation of 2-phytyl-1,4-naphthoquinone into the A₁ site and the alteration of the equilibrium constant between A₁ and F_x in the photosystem I. Biochemistry **41**: 394-405

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Scheller HV, Haldrup A (2005) Photoinhibition of photosystem I. Planta 221: 5-8

Schoeder HU, Lockau W (1986) Phylloquinone copurifies with the large subunit of photosystem I. FEBS **199**: 23-27

Schönheyder F (1935) Measurement and biological action. Nature 135: 653

Schöttler MA, Kirchhoff H, Weis E (2004) The role of plastocyanin in the adjustment of the photosynthetic electron transport to the carbon metabolism in tobacco. Physiol Plant **136**: 4265-4274.

Schöttler MA, Flugel C, Thiele W, Stegemann S, Bock R (2007) The plastome encoded PsaJ subunit is required for efficient Photosystem I excitation, but notfor plastocyanin oxidation in tobacco. Biochem J 403: 251-260

Schreiber U, Hormann H, Neubauer C, Klughammer C (1995) Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis. Aust J Plant Physiol 22: 209-20

Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynth Res **10**: 51-62

Seeger JW, Bentley R (1991) Phylloquinone (Vitamin K₁) Biosynthesis in *Euglena gracilis* strain Z. Phytochemistry **30**: 3585-3589

Sharma V, Hudspeth MES, Meganathan R (1996) Menaquinone (vitamin K-2) biosynthesis: Localiszation and characterization of the menE gene from *Escherichia coli*. Gene **168**: 43-48

Sharma V, Meganathan R, Hudspeth MES (1993) Menaquinone (vitamin K-2) biosynthesis – cloning, nucleotide-sequence and expression of the menC gene from *Escherichia coli*. J Bacteriol **175**: 4917-4921

Sharma V, Suvarna K, Meganathan R, Hudspeth MES (1992) Menaquinone (vitamin K-2) biosynthesis – nucleotide-sequence and expression of the menB gene from *Escherichia coli*. J Bacteriol **174**: 5057-5062

Shearer MJ (1992) Vitamin K metabolism and nutriture. Blood Reviews 6: 92-104

Shimada H, Ohno R, Shibata M, Ikegami I, Onai K, Ohto M, Takamiya K (2005) Inactivation and deficiency of core proteins of photosystem I and II caused by genetical phylloquinone and plastoquinone deficiency but retained lamellar structure in a T-DNA mutant of Arabidospsis. Plant J **41**: 627-637

Simantiras M, Leistner E (1991) Cell free synthesis of o-succinylbenzoic acid in protein extracts from anthraquinone and phylloquinone (vitamin K_1) producing plant cell suspension cultures occurrence of intermediates between isochorismic acid and o-succinylbenzoic acid. Z Naturforsch C **46**: 364-370

Solfanelli C, Poggi A, Loretti E, Alpi A, Perata P (2006) Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. Plant Phys *140*:637-646

Suttie JW (1995) The importance of menaquinones in human nutrition. Ann Rev Nutr 15: 399-417 Suttie JW (1980) Mechanism of action of vitamin K: synthesis of γ -carboxyglutamic acid. Crit Rev Biochem 8: 191-223 Suvarna K, Stevenson D, Meganathan R, Hudspeth MES (1998) Menaquinone (vitamin K-2) biosynthesis: Localiszation and characterization of the menA gene from *Escherichia coli*. J Bacteriol **180**: 2782-2787

Taggart WV, Matschiner JT (1969) Metabolism of menadione-6,7-³H in the rat. Biochemistry 8: 1141-1146

Tevini M, Steinmüller D (1985) Compositon and function of plastoglobuli. 2. Lipid compositon of leaves and plastoglobuli during beech leaf senescence. Planta **163**: 91-96

Thayer SS, Björkmann O (1990) Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. Photosynth Res **23:** 331-343

Thijssen HHW, Drittij-Reijnders MJ (1994) Vitamin K distribution in rat tissue: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4. Brit J Nutr **72:** 415-425

Thijssen HHW, Drittij-Reijnders MJ (1996) Vitamin K status in human tissue: tissue-specific accumulation of phylloquinone and menaquinone-4. Brit J Nutr **75:** 121-127

Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M (2001) Dietary references intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. J Am Dietetic Associat **101**: 294-301

Tsai CJ, Harding SA, Tschaplinski TJ, Lindroth RL, Yuan Y (2006) Genome-wide analysis of the structural genes regulating defense phenylpropanoid metabolism in *Populus*. New Phytologist **172**: 47-62

Vervliet G, Holsters M, Teuchy H, Vanmontagu M, Schell J (1975) Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains. J Gen Virol **26**: 33-48

Vidi PA, Kanwischer M, Baginsky S, Austin JR, Csucs G, Dörmann P, Kessler F, Bréhélin C (2006) Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. J Biol Chem **281:** 11225-11234

Wagner A (1998) The fate of duplicated genes: loss or new function? BioEssays 20: 785-788

Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature **414**: 562-571

Winkel-Shirley B (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant Phys **126**: 485-493

Yalpani N, León J, Lawton MA, Raskin I (1993) Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. Plant Physiol **103**: 316-321

Yalpani N, Enyedi AJ, León J, Raskin I (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. Planta 193: 372-376

Internetquellen

- http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/ (Stand: Oktober 2007) Computational Biology and Functional Genomics – The Gene Index Project
- http://faostat.fao.org (Stand: März 2008) Food and Argiculture organization of the United
- http://ted.bti.cornell.edu (Stand: Oktober 2007) Tomato Expression Database
- http://www.sgn.cornell.edu (Stand: Oktober 2007) SOL Genomics Network
8 Anhang

Phyllochinon- und PNQ-Messungen

Tab. I: Phyllochinonquantifizierung in WT, ics1, ics2 und ics1ics2

Die Phyllochinongehalte in Blättern wurden mittels HPLC bestimmt. Durch Vergleich der integrierten Peak-Flächen des internen Standards Menachinon-4 und von Phyllochinon, wurde der Gesamt-Phyllochinongehalt in der Probe, anschließend die Menge Phyllochinon pro Gramm Frischgewicht berechnet. Es wurden jeweils Fünffachbestimmungen durchgeführt. Der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (SD) ermittelt.

Wt Col0					
#	FG [mg]	Gesamt- Phyllochinongehalt der Probe [ng]	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG]	MW	SD
1	94,2	489,70255	5,20		
2	102,3	472,83786	4,62		
3	112,6	508,07247	4,51		
4	99,9	460,52689	4,61		
5	143,7	551,65607	3,84	4,56	0,48
ics1	L				
#	FG [mg]	Gesamt- Phyllochinongehalt der Probe [ng]	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG]	MW	SD
1	91,2	184,47908	2,02		
2	94,6	228,69291	2,42		
3	65,2	52,10189	0,80		
4	55,5	61,1486	1,10		
5	76,7	138,53558	1,81	1,63	0,67
ics2	i			1	i i
#	FG [mg]	Gesamt- Phyllochinongehalt der Probe [ng]	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG]	MW	SD
1-1	78,9	371,5078	4,71		
1-2	124,3	481,51435	3,87		
1-3	150,1	471,97437	3,14		
2-1	121,6	464,41763	3,82		
	78,5	443,64838	5,65	4,24	0,96
ics1ics2	I			1	1
#	FG [mg]	Gesamt- Phyllochinongehalt der Probe [ng]	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG]	MW	SD
1	9,1	0	0,00		
2	40,6	0	0,00	0,00	0,00

Tab. II: Phyllochinonquantifizierung in WT, ics1 und ics1 + PHYLLO-ICS

Die Phyllochinongehalte in Blättern wurden mittels HPLC bestimmt. Durch Vergleich der integrierten Peak-Flächen des internen Standards Menachinon-4 und von Phyllochinon, wurde der Gesamt-Phyllochinongehalt in der Probe, anschließend die Menge Phyllochinon pro Gramm Frischgewicht berechnet. Für den Wildtyp und die Mutante *ics1* wurden Vierfachbestimmungen, für die Nachkommen der transformierten Mutante *ics1* + PHYLLO-ICS Dreifachbestimmungen durchgeführt. Der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (SD) wurden ermittelt.

Wt Col0					
		Gesamt-			
#	EG [ma]	Phyllochinongehalt	Phyllochinon [ug.g ⁻¹ EG]	N/\\/	SD
π1	22 A	353 34605			00
1 2	65,4 65,7	304 72022	4,24		
2	70.0	304,73933	4,04		
3	70,9	362,68591	5,12		
4	86,4	382,95422	4,43	4,61	0,38
ics1	I	Gosomt			I
		Phyllochinongehalt			
#	FG [mg]	der Probe [ng]	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG]	MW	SD
1	60,8	146,50089	2,41		
2	59,5	158,15293	2,66		
3	61,7	158,05984	2,56		
4	71,5	186,37995	2,61	2,56	0,11
ics1 + PH	YLLO-ICS				
		Gesamt-			
		FINIOCHINONUENAIL			
#	FG [mg]	der Probe [ng]	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG]	MW	SD
# 1-1	FG [mg] 89,9	der Probe [ng] 198,58024	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG] 2,21	MW	SD
# 1-1 1-2	FG [mg] 89,9 56,6	der Probe [ng] 198,58024 150,07905	Phyllochinon [μg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65	MW	SD
# 1-1 1-2 1-3	FG [mg] 89,9 56,6 78,6	der Probe [ng] 198,58024 150,07905 198,75061	Phyllochinon [μg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65 2,53	MW 2,46	SD 0,23
# 1-1 1-2 1-3 2-1	FG [mg] 89,9 56,6 78,6 55,6	der Probe [ng] 198,58024 150,07905 198,75061 152,9393	Phyllochinon [μg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65 2,53 2,75	<u>MW</u> 2,46	SD 0,23
# 1-1 1-2 1-3 2-1 2-2	FG [mg] 89,9 56,6 78,6 55,6 66,2	der Probe [ng] 198,58024 150,07905 198,75061 152,9393 180,41348	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65 2,53 2,75 2,75 2,73	<u>MW</u> 2,46	SD 0,23
# 1-1 1-2 1-3 2-1 2-2 2-3	FG [mg] 89,9 56,6 78,6 55,6 66,2 72,7	der Probe [ng] 198,58024 150,07905 198,75061 152,9393 180,41348 199,6198	Phyllochinon [μg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65 2,53 2,75 2,73 2,75 2,75	MW 2,46 2,74	SD 0,23 0,01
# 1-1 1-2 1-3 2-1 2-2 2-3 5-1	FG [mg] 89,9 56,6 78,6 55,6 66,2 72,7 53,3	der Probe [ng] 198,58024 150,07905 198,75061 152,9393 180,41348 199,6198 122,1818	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65 2,53 2,75 2,75 2,73 2,75 2,29	MW 2,46 2,74	SD 0,23 0,01
# 1-1 1-2 1-3 2-1 2-2 2-3 5-1 5-2	FG [mg] 89,9 56,6 78,6 55,6 66,2 72,7 53,3 65,3	der Probe [ng] 198,58024 150,07905 198,75061 152,9393 180,41348 199,6198 122,1818 141,00052	Phyllochinon [μg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65 2,53 2,75 2,75 2,73 2,75 2,29 2,16	MW 2,46 2,74	SD 0,23 0,01
# 1-1 1-2 1-3 2-1 2-2 2-3 5-1 5-2 5-2 5-3	FG [mg] 89,9 56,6 78,6 55,6 66,2 72,7 53,3 65,3 58,0	der Probe [ng] 198,58024 150,07905 198,75061 152,9393 180,41348 199,6198 122,1818 141,00052 137,91043	Phyllochinon [μg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65 2,53 2,75 2,75 2,73 2,75 2,29 2,16 2,38	MW 2,46 2,74 2,28	SD 0,23 0,01 0,11
# 1-1 1-2 1-3 2-1 2-2 2-3 5-1 5-2 5-3 8-1	FG [mg] 89,9 56,6 78,6 55,6 66,2 72,7 53,3 65,3 58,0 64,0	der Probe [ng] 198,58024 150,07905 198,75061 152,9393 180,41348 199,6198 122,1818 141,00052 137,91043 236,99826	Phyllochinon [μg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65 2,53 2,75 2,73 2,75 2,29 2,16 2,38 3,70	MW 2,46 2,74 2,28	SD 0,23 0,01 0,11
# 1-1 1-2 1-3 2-1 2-2 2-3 5-1 5-2 5-3 8-1 8-2	FG [mg] 89,9 56,6 78,6 55,6 66,2 72,7 53,3 65,3 58,0 64,0 51,6	der Probe [ng] 198,58024 150,07905 198,75061 152,9393 180,41348 199,6198 122,1818 141,00052 137,91043 236,99826 180,74103	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65 2,53 2,75 2,73 2,75 2,29 2,16 2,38 3,70 3,50	MW 2,46 2,74 2,28	SD 0,23 0,01 0,11
# 1-1 1-2 1-3 2-1 2-2 2-3 5-1 5-2 5-3 8-1 8-2 8-3	FG [mg] 89,9 56,6 78,6 55,6 66,2 72,7 53,3 65,3 58,0 64,0 51,6 48,6	der Probe [ng] 198,58024 150,07905 198,75061 152,9393 180,41348 199,6198 122,1818 141,00052 137,91043 236,99826 180,74103 171,30698	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65 2,53 2,75 2,73 2,75 2,29 2,16 2,38 3,70 3,50 3,52	MW 2,46 2,74 2,28 3,58	SD 0,23 0,01 0,11 0,11
# 1-1 1-2 1-3 2-1 2-2 2-3 5-1 5-2 5-3 8-1 8-2 8-3 10-1	FG [mg] 89,9 56,6 78,6 55,6 66,2 72,7 53,3 65,3 58,0 64,0 51,6 48,6 73,6	der Probe [ng] 198,58024 150,07905 198,75061 152,9393 180,41348 199,6198 122,1818 141,00052 137,91043 236,99826 180,74103 171,30698 264,08087	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65 2,53 2,75 2,73 2,75 2,29 2,16 2,38 3,70 3,50 3,52 3,59	MW 2,46 2,74 2,28 3,58	SD 0,23 0,01 0,11 0,11
# 1-1 1-2 1-3 2-1 2-2 2-3 5-1 5-2 5-3 8-1 8-2 8-3 10-1 10-2	FG [mg] 89,9 56,6 78,6 55,6 66,2 72,7 53,3 65,3 58,0 64,0 51,6 48,6 73,6 53,3	der Probe [ng] 198,58024 150,07905 198,75061 152,9393 180,41348 199,6198 122,1818 141,00052 137,91043 236,99826 180,74103 171,30698 264,08087 138,85811	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG] 2,21 2,65 2,53 2,75 2,73 2,75 2,29 2,16 2,38 3,70 3,50 3,52 3,59 2,61	MW 2,46 2,74 2,28 3,58	SD 0,23 0,01 0,11 0,11

Tab. III: Phyllochinon und PNQ-Quantifizierung in WT, AtmenG und AtmenG + At1g23360

Die Phyllochinon- bzw. PNQ-Gehalte in Blättern wurden mittels HPLC bestimmt. Durch Vergleich der integrierten Peak-Flächen des internen Standards Menachinon-4 und von Phyllochinon bzw. PNQ, wurden die Gesamtgehalte in den Proben, anschließend die Menge Phyllochinon bzw. PNQ pro Gramm Frischgewicht berechnet. Es wurden jeweils Fünffachbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (SD) ermittelt.

Wt Col0					
		Gesamt- Phyllochinongehalt			
#	FG [mg]	der Probe [ng]	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG]	MW	SD
2	86,4	338,71222	3,92	3,66	0,30
5	92,3	287,54444	3,12		
9	82,1	314,93923	3,84		
12	56,4	217,68594	3,86		
17	83,9	298,18207	3,55		
AtmenG	1				
		Gesamt-PNQ- Gebalt der Probe			
#	FG [mg]	[ng]	PNQ [µg g ⁻¹ FG]	MW	SD
1	92,3	537,61917	5,82	5,71	0,39
2	67,6	414,22597	6,13		
5	72	363,91065	5,05		
6	73,5	403,144701	5,48		
8	43,2	261,07733	6,04		
AtmenG -	+ At1g23360				i i
		Gesamt- Phyllochinongehalt			
#	FG [mg]	der Probe [ng]	Phyllochinon [µg g ⁻¹ FG]	MW	SD
1	83,5	285,5745	3,42	3,75	0,14
9	66,4	239,06644	3,60		
11	80,8	286,60469	3,55		
23	62,3	237,2304	3,81		
25	49,2	214,32829	4,36		

Tab. IV: Verteilung von Phyllochinon und PNQ in Chloroplastenfraktionen von WT und AtmenG

In subplastidären Membranfraktionen aus WT und *AtmenG* wurde der Phyllochinon- bzw. PNQ-Gehalt per HPLC bestimmt. Nach Berechnung der Mengen an Phyllochinon bzw. PNQ in der gesamten Probe (Ausgangsmenge), wurde die prozentuale Verteilung der Substanzen in den einzelnen Fraktion ermittelt. Es wurde für jede Fraktion eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (SD) wurden anschließend bestimmt.

WT Col0								
		Phyllochinon	MW	SD	% von Gesamt-Phyllochinon	Phyllochinon	MW	SD
		[ng in Ausgangsmenge]				[nmol/µl]		
Plastoglobuli	1	316,27284				0,00012		
(F1)	2	308,61948				0,00011		
	3	334,69044	319,86	13,40	14,21	0,00012	0,00012	0,00000
Interphase I	1	336,71103				0,00006		
(F2)	2	374,16975				0,00007		
	3	414,91149	375,26	39,11	16,67	0,00008	0,00007	0,00001
Hüllmembranen	1	239,74848				0,00009		
(F3)	2	228,53028				0,00008		
	3	213,85332	227,38	12,99	10,10	0,00008	0,00008	0,00000
Interpahse 2	1	433,467988				0,00017		
(F4)	2	451,639504				0,00017		
	3	471,741608	452,28	19,14	20,09	0,00018	0,00017	0,00001
Thylakoide	1	891,31				0,00028		
(F5)	2	842,219				0,00027		
	3	894,3326	875,95	29,25	38,92	0,00028	0,00028	0,00001
		Gesamt-Phyllochinon	2250,74					

<u>AtmenG</u>								
		PNQ	MW	SD	% von Gesamt-PNQ	PNQ	MW	SD
		[ng in Ausgangsmenge]				[nmol/µ1]		
Plastoglobuli	1	14599,7835				0,00216		
(F1)	2	13321,7541				0,00197		
	3	14528,1381	14149,89	718,08	43,55	0,00215	0,00209	0,00011
Interphase I	1	7890,26112				0,00049		
(F2)	2	8676,99504				0,00053		
	3	8266,572	8277,94	393,49	25,48	0,00051	0,00051	0,00002
Hüllmembranen	1	2437,5816				0,00045		
(F3)	2	1976,76792				0,00037		
	3	1944,87576	2119,74	275,72	6,52	0,00036	0,00039	0,00005
Interphase 2	1	1722,49152				0,00032		
(F4)	2	2154,09816				0,00040		
	3	1768,93392	1881,84	236,92	5,79	0,00033	0,00035	0,00004
Thylakoide	1	5835,6648				0,00108		
(F5)	2	6212,6532				0,00115		
	3	6129,48	6059,27	198,06	18,65	0,00113	0,00112	0,00004
		Gesamt-PNQ	32488,68					

Tab. V: Bestimmung von Phyllochinon bzw. PNQ pro Totalfettsäuren in Chloroplastenfraktionen

Totalfettsäuren wurden in den subplastidären Chloroplastenfraktionen per GC. Es wurde für jede Fraktion eine Dreifachbestimmung durchgeführt und anschließend der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) ermittelt. Phyllochinon wurde per HPLC (siehe Tab. IV) bestimmt. Das Verhältnis Phyllochinon pro Totalfettsäuren wurde in nmol pro nmol berechnet.

		Totalfettsäuren	Totalfettsäuren	MW	SD	nmol Phyllochinon pro	SD
		[nmol]	[nmol/µ1]			nmol Totalfettsäuren	
Plastoglobuli	1	13,97	0,02794				
(F1)	2	11,95	0,0239				
	3	11,95	0,0239	0,0252	0,0023	0,0047	0,0006
Interphase I	1	10,76	0,0215				
(F2)	2	9,21	0,0184				
	3	9,55	0,0191	0,020	0,002	0,0037	0,0007
Hüllmembranen	1	11,836	0,0473				
(F3)	2	11,4	0,0456				
	3	11,95	0,0478	0,047	0,001	0,0018	0,0001
Interphase 2	1	61,49	0,1230				
(F4)	2	65,07	0,1301				
	3	28,62	0,1145	0,123	0,008	0,0014	0,0002
Thylakoide	1	18,85	0,1885				
(F5)	2	17,76	0,1776				
	3	19,04	0,1904	0,186	0,007	0,0015	0,0001

WT Col0

AtmenG							
		Totalfettsäuren	Totalfettsäuren	MW	SD	nmol PNQ pro	SD
		[nmol]	[nmol/µ1]			nmol Totalfettsäuren	
Plastoglobuli	1	65,9	0,1318				
(F1)	2	63,26	0,1265				
	3	74,73	0,1495	0,136	0,012	0,0154	0,0021
Interphase I	1	63,63	0,1273				
(F2)	2	54,94	0,1099				
	3	65,01	0,1300	0,122	0,011	0,0042	0,0006
Hüllmembranen	1	190,26	0,3805				
(F3)	2	187	0,3740				
	3	199,26	0,3985	0,384	0,013	0,0010	0,0002
Interphase 2	1	135,48	0,2710				
(F4)	2	188,23	0,3765				
	3	188,83	0,3777	0,342	0,061	0,0010	0,0003
Thylakoide	1	129,22	1,2922				
(F5)	2	86,66	0,8666				
	3	78,02	0,7802	0,980	0,274	0,0011	0,0004

Anthocyanin-Bestimmung

Tab. VI: Anthocyaninquantifizierung in WT, AtmenG und AtmenG + At1g23360

Anthocyanin-Gehalte wurden in Extrakten aus Blättern vor und nach Hochlichtstress photometrisch bei Wellenlängen von 535 nm und 650 nm bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach der Formel ($E_{535} - 2*E_{650}$) dividiert durch das Frischgewicht (FG) in Gramm. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Anschließend wurde der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (SD) ermittelt. (n. d. – nicht detektierbar)

Normallich	t							
	ECI	F 525	F. (50	N/E	E525 2*E(50	Anthocyaningehalt		CD
	FG [mg]	E 535nm	E 650nm	VF	E535-2*E650	pro Gramm FG	MW	SD
Wt Col0	60,1	0,0813	0,0619	1	-0,043	n.d.	n.d.	n.d.
	65,2	0,0821	0,0650	1	-0,048	n.d.		
	80,5	0,0996	0,0729	1	-0,046	n.d.		
AtmenG	71,4	0,1159	0,0668	1	-0,018	n.d.	n.d.	n.d.
	87,7	0,1384	0,0624	1	0,014	n.d.		
	70,4	0,1248	0,1069	1	-0,089	n.d.		
AtmenG +	64,0	0,1082	0,0697	1	-0,031	n.d.	n.d.	n.d.
At1g23360	70,9	0,0908	0,0720	1	-0,053	n.d.		
	58,6	0,1646	0,0647	1	0,035	n.d.		

Hochlicht								
	FG [mg]	E 535nm	E 650nm	VF	E535-2*E650	Anthocyaningehalt pro Gramm FG	MW	SD
Wt Col0	79,4	0,4955	0,0553	10	0,385	48,48	52,08	3,80
	96,9	0,6591	0,058	10	0,543	56,05		
	72,6	0,4910	0,0578	10	0,375	51,71		
AtmenG	60,0	0,3823	0,0576	5	0,267	22,26	26,13	8,48
	66,3	0,3834	0,0573	5	0,269	20,27		
	57,7	0,5317	0,059	5	0,414	35,85		
AtmenG +	88,6	0,5643	0,0565	10	0,451	50,94	53,34	2,76
At1g23360	72,5	0,4962	0,057	10	0,382	52,72		
	61,8	0,4591	0,0554	10	0,348	56,36		

Pigmentmessungen

Tab. VII: Quantifizierung photosynthetischer Pigmente in WT, *AtmenG* und *AtmenG* + At1g23360 vor und nach Hochlicht

Pigmente wurden mit Aceton aus Blättern vor und nach Hochlichtstress isoliert und mittels HPLC aufgetrennt und quantifiziert. Der Gesamtxanthophyllgehalt Violaxanthin + Antheraxanthin + Zeaxanthin (V+A+Z) wurde ermittelt. Die prozentualen Anteile der einzelnen Xanthophylle (V, A, Z) am Gesamtgehalt wurden bestimmt. Es wurde eine Fünffachbestimmung durchgeführt und daraus die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) berechnet.

WT Col0	Normallie	nallicht Hochlicht												_
	2	3	5	7	9	MW	SD	2	3	5	7	9	MW	SD
FG in g	0,0443	0,0375	0,0523	0,0693	0,0505			0,0443	0,0375	0,0523	0,0693	0,0505		
Pigmente [mmol mol Chl1]														
Neoxanthin	31,12	29,39	31,71	30,61	33,21	31,21	1,41	36,72	31,20	31,50	43,40	29,94	34,55	5,59
Violaxanthin	28,74	26,15	28,66	26,08	30,66	28,06	1,95	54,05	38,21	32,25	56,11	36,15	43,35	10,94
Antheraxanthin	0,72	0,99	1,20	0,77	0,00	0,74	0,45	4,72	1,19	6,56	2,95	2,99	3,68	2,04
Lutein	106,24	99,48	106,85	101,38	113,41	105,47	5,44	136,61	111,92	111,44	145,77	103,65	121,88	18,22
Zeaxanthin	5,56	5,51	5,65	5,39	6,12	5,65	0,28	9,72	6,28	12,35	8,51	6,45	8,66	2,52
b-Carotin	66,68	66,87	72,92	66,62	73,07	69,23	3,44	88,39	73,01	67,49	90,78	69,32	77,80	10,98
V + A + Z	35,01	32,65	35,51	32,25	36,78	34,44	1,93	68,49	45,68	51,16	67,56	45,58	55,70	11,48
V/(V + A + Z)*100	82,08	80,08	80,71	80,88	83,36	81,42	1,30	78,91	83,65	63,03	83,05	79,30	77,59	8,41
A/(V + A + Z)*100	2,05	3,04	3,38	2,40	0,00	2,17	1,32	6,89	2,61	12,83	4,36	6,55	6,65	3,87
Z/(V + A + Z)*100	15,87	16,88	15,91	16,72	16,64	16,40	0,48	14,19	13,74	24,14	12,59	14,15	15,76	4,73

AtmenG	Normallic	cht												
	1	4	6	7	9	MW	SD	1	4	6	7	9	MW	SD
FG in g	0,0511	0,0636	0,053	0,0727	0,0604			0,0511	0,0636	0,053	0,0727	0,0604		
Pigmente [mmol mol Chl1]														
Neoxanthin	27,23	27,25	32,58	36,88	35,00	31,79	4,42	30,05	33,35	32,28	34,67	31,13	32,30	1,82
Violaxanthin	26,10	28,15	30,39	46,49	38,13	33,85	8,41	41,50	37,22	31,63	48,87	41,33	40,11	6,33
Antheraxanthin	0,86	1,30	2,67	2,12	1,47	1,68	0,71	14,60	17,03	15,83	10,11	10,97	13,71	3,03
Lutein	94,55	92,58	109,05	123,02	124,98	108,84	15,25	115,04	123,90	118,12	126,53	113,40	119,40	5,65
Zeaxanthin	4,97	5,15	6,68	6,55	6,36	5,94	0,82	21,76	22,84	26,09	12,43	14,76	19,57	5,75
b-Carotin	58,02	62,99	63,73	70,25	70,00	65,00	5,17	73,93	72,24	77,45	75,98	71,11	74,14	2,61
V + A + Z	31,92	34,60	39,74	55,16	45,96	41,48	9,34	77,86	77,08	73,54	71,41	67,05	73,39	4,41
V/(V + A + Z)*100	81,75	81,36	76,47	84,28	82,96	81,37	2,96	53,30	48,28	43,01	68,44	61,63	54,93	10,20
A/(V + A + Z)*100	2,68	3,76	6,71	3,84	3,20	4,04	1,57	18,75	22,09	21,52	14,16	16,36	18,58	3,37
Z/(V + A + Z)*100	15,57	14,88	16,81	11,88	13,84	14,59	1,86	27,94	29,63	35,47	17,40	22,01	26,49	6,99

AtmenG + At1g23360	Normallie	cht					at							
	1	3	5	7	9	MW	SD	1	3	5	7	9	MW	SD
FG in g	0,0826	0,0787	0,0733	0,0552	0,0641			0,0826	0,0787	0,0733	0,0552	0,0641		
Pigmente [mmol mol Chl1]														
Neoxanthin	30,73	37,64	31,07	24,78	43,66	31,06	5,26	31,78	34,25	30,73	37,00	30,67	32,89	2,72
Violaxanthin	31,95	39,49	35,86	25,67	50,33	33,24	5,92	41,71	55,17	48,72	42,54	43,82	46,39	5,61
Antheraxanthin	0,84	1,17	1,11	0,00	1,40	0,78	0,54	1,15	1,59	2,15	3,12	1,83	1,97	0,74
Lutein	105,96	127,40	107,02	88,80	151,82	107,30	15,79	103,93	115,11	102,96	127,40	102,23	110,33	10,90
Zeaxanthin	5,58	6,86	5,74	5,02	8,11	5,80	0,77	5,68	6,51	5,86	7,88	5,86	6,36	0,91
b-Carotin	69,11	82,75	68,80	57,94	97,42	69,65	10,16	76,34	82,93	75,37	91,00	73,98	79,93	7,08
V + A + Z	38,38	47,52	42,71	30,69	59,84	39,82	7,15	48,53	63,28	56,74	53,55	51,50	54,72	5,64
V/(V + A + Z)*100	83,26	83,10	83,97	83,64	84,11	83,62	0,44	85,93	87,19	85,88	79,45	85,08	84,71	3,03
A/(V + A + Z)*100	2,19	2,46	2,60	0,00	2,33	1,92	1,08	2,37	2,52	3,80	5,84	3,54	3,61	1,39
Z/(V + A + Z)*100	14,55	14,43	13,43	16,36	13,55	14,47	1,17	11,70	10,29	10,33	14,71	11,37	11,68	1,81

Chlorophyllmessungen

Tab. VIII: Chlorophyllbestimmung in WT, AtmenG und AtmenG + At1g23360 vor und nach Hochlicht

Chlorophyll a und b wurden in einem Acetonextrakt aus Blättern, geerntet vor und nach Hochlichtstress, photometrisch bestimmt. Mit Hilfe der bei den Wellenlängen von 663,6 nm, 646,6 nm und 750 nm gemessenen Extinktionen (E) wurde die Gehalte nach folgenden Formeln berechnet: Chl a = $12,25*(E_{646,6nm}-E_{750nm}) + 2,55*(E_{663,6nm}-E_{750nm})$ und Chl b = $20,31*(E_{646,6nm}-E_{750nm}) + 4,91*(E_{663,6nm}-E_{750nm})$ berechnet. Es wurde eine Fünffachbestimmung durchgeführt und anschließend jeweils der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (SD) ermittelt.

Normallicht				1	1					1			
WT Col0	#	FG [mg]	OD 750	OD 663,6	OD 646,6	Chl a [µg/ml]	Chl b [µg/ml]	Chl a+b [µg/g FG]]	MW	SD	Chl a/b	MW	SD
	3	78	-0,0035	0,5802	0,2423	65,2	21,3	1180,0	1338	121	3,07	3,07	0,05
	7	60,2	-0,0011	0,5235	0,2215	58,6	19,5	1379,1			3,01		
	8	69,2	-0,0031	0,6169	0,2577	69,3	22,5	1412,1			3,08		
	10	61,1	-0,003	0,5707	0,2362	64,2	20,4	1473,7			3,14		
	20	81,3	-0,0005	0,6421	0,2702	71,8	23,4	1246,6			3,07		
AtmenG										1			
	2	53,7	-0,0057	0,4031	0,1656	45,7	14,7	1197,6	1321	141	3,11	3,10	0,08
	4	54,6	-0,0041	0,4939	0,2022	55,7	17,4	1427,2			3,19		
	11	60,4	-0,0021	0,537	0,2244	60,3	19,5	1405,9			3,09		
	15	63,5	-0,0026	0,4535	0,1921	50,9	17,1	1140,0			2,97		
	18	48	-0,0023	0,4357	0,1805	49,0	15,6	1432,8			3,14		
AtmenG + At1g2	3360												
	1	54,9	-0,0031	0,4527	0,1896	50,9	16,8	1311,6	1444	197	3,04	2,98	0,11
	7	41,4	-0,0029	0,4416	0,1838	49,7	16,1	1691,0			3,09		
	11	78,6	-0,0028	0,5981	0,252	67,1	22,2	1209,5			3,02		
	20	92,6	-0,0018	0,8176	0,3552	91,3	32,3	1418,3			2,83		
	23	80,3	-0,0014	0,7992	0,3432	89,3	30,7	1588,7			2,91		
Hochlicht										i.			
WT Col0	#	fw [mg]	OD 750	OD 663,6	OD 646,6	Chl a [µg/ml]	Chl b [µg/ml]	Chl a+b [µg/g FG]]	MW	SD	Chl a/b	MW	SD
	2	64,6	-0,002	0,4548	0,2118	50,5	21,0	1174,0	1108	102	2,41	2,32	0,23
	18	121,3	-0,0019	0,721	0,3643	79,2	38,9	1030,2			2,04		
	15	60,1	-0,0024	0,4376	0,2162	48,3	22,8	1252,9			2,12		
	11	81,3	-0,0025	0,5291	0,2395	59,0	23,0	1070,7			2,56		
	1	74,7	-0,0014	0,4582	0,2102	50,9	20,4	1013,1			2,49		
AtmenG										1			
	13	72,2	-0,0035	0,4877	0,2043	54,9	18,1	1075,1	938	99	3,03	3,13	0,39
	8	58,5	-0,0026	0,2206	0,0906	25,0	8,0	599,2			3,13		
	5	52,6	-0,0017	0,3201	0,1274	36,1	10,4	943,1			3,47		
	10	55,6	-0,0006	0,3179	0,1271	35,8	10,3	882,8			3,47		
	7	51,7	-0,0077	0,2599	0,1149	29,7	11,8	850,2			2,52		
AtmenG + At1g2	3360												
	13	74,5	-0,0009	0,546	0,2548	60,5	25,1	1218,1	1162	94	2,41	2,59	0,17
	2	75,3	-0,0039	0,4959	0,2176	55,6	20,4	1072,7			2,72		
	21	66,1	-0,0041	0,5291	0,2297	59,4	21,3	1296,9			2,79		
	5	76,7	-0,0025	0,53	0,2373	59,1	22,6	1130,8			2,62		
									-		-		

Tocopherolmessungen

Tab. IX: Tocopherolbestimmung in WT, AtmenG und AtmenG + At1g23360 vor und nach Hochlicht

In einem Diethyletherextrakt aus Blättern vor und nach Hochlichtstress wurden die Tocopherole mittels HPLC aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgte dabei durch Vergleich der integrierten Peak-Fläche der jeweiligen Tocopherole und des internen Standards Tocol. Aus Fünffachbestimmunggen wurde der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (SD) berechnet.

Normall	icht	α-Τος		β-Τος		γ-Τος		δ-Toc		Gesamt			
Wt Col0	FG [mg]	Gesamtgehalt in der Probe [ng]	[µg g ⁻¹ FG]	Gesamtgehalt in der Probe [ng]	[µg g ⁻¹ FG]	Gesamtgehalt in der Probe [ng]	[µg g ⁻¹ FG]	Gesamtgehalt in der Probe [ng]	μg g ⁻¹ FG]	Gesamtgehalt in der Probe [ng]	μg g ⁻¹ FG]	MW	SD
11	85.9	778.72	9.07	6.35	0.07	179.98	2.10	0.00	0.00	965.05	11.23		
3	74,8	736,23	9,84	12,14	0,16	13,92	0,19	0,00	0,00	762,28	10,19		
4	76,3	440,00	5,77	12,51	0,16	34,20	0,45	0.00	0,00	486,71	6,38		
2	97,3	723,60	7,44	19,38	0,20	23,64	0,24	0,00	0,00	766,62	7,88		
3	67,5	489,58	7,25	10,88	0,16	12,60	0,19	0,00	0,00	513,05	7,60	8,66	1,99
AtmenG		•		•						•	•		
2	56	416,93	7,45	4,42	0,08	7,75	0,14	0,00	0,00	429,10	7,66		
3	68	420,21	6,18	0,00	0,00	10,20	0,15	0,00	0,00	430,41	6,33		
5	74,5	362,24	4,86	8,28	0,11	19,34	0,26	0,00	0,00	389,86	5,23		
2	99,5	438,02	4,40	18,15	0,18	47,71	0,48	2,76	0,03	506,63	5,09		
5	86,1	450,24	5,23	12,70	0,15	20,49	0,24	0,00	0,00	483,43	5,61	5,99	1,05
AtmenG +	At1g23360	1											
12	92,5	907,26	9,81	10,08	0,11	171,82	1,86	0,00	0,00	1089,16	11,77		
15	75,8	430,21	5,68	6,78	0,09	79,95	1,05	0,00	0,00	516,94	6,82		
13	83	343,50	4,14	3,54	0,04	99,82	1,20	0,00	0,00	446,86	5,38		
20	91,3	649,36	7,11	7,40	0,08	137,33	1,50	8,32	0,09	802,42	8,79		
1	72,1	647,57	8,98	9,16	0,13	39,91	0,55	0,00	0,00	696,65	9,66	8,49	2,48
TT 1-12 - 1		an a											
Hochnei	<u>n</u>	a-100		β-Тос		ү-Тос		δ-Toc		Gesamt			
Wt Col0	FG [mg]	Gesamtgehalt in der Probe	[µg g ⁻¹ FG]	β-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng]	[µg g ⁻¹ FG]	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng]	μg g ⁻¹ FG]	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng]	μg g ⁻¹ FG]	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng]	μg g ⁻¹ FG]	MW	SD
Wt Col0	FG [mg] 62.6	Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058.80	[μg g ⁻¹ FG] 16.91	β-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38.89	[μg g ⁻¹ FG] 0.62	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169.18	μg g ⁻¹ FG] 2.70	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29.38	μg g ⁻¹ FG] 0.47	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296.25	μg g ⁻¹ FG] 20.71	MW	SD
Wt Col0 8 9	FG [mg] 62,6 70	Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84	[μg g ⁻¹ FG] 16,91 20,98	β-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18	[μg g ⁻¹ FG] 0,62 1,02	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16	μg g ⁻¹ FG] 2,70 4,83	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48	μg g ⁻¹ FG] 0,47 1,25	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67	μg g ⁻¹ FG] 20,71 28,08	MW	SD
Wt Col0 8 9 7	<u>FG [mg]</u> 62,6 70 70,3	α-10c Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98	[μg g ⁻¹ FG] 16,91 20,98 27,89	β-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04	[μg g ⁻¹ FG] 0,62 1,02 0,81	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11	μg g ⁻¹ FG] 2,70 4,83 6,49	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41	μg g ⁻¹ FG] 0,47 1,25 0,76	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54	μg g ⁻¹ FG] 20,71 28,08 35,95	MW	SD
Wt Col0 8 9 7 10	FG [mg] 62,6 70 70,3 107,7	α-10c Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63	[μg g ⁻¹ FG] 16,91 20,98 27,89 16,67	β-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71	[µg g ⁻¹ FG] 0,62 1,02 0,81 0,79	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00	μg g ⁻¹ FG] 2,70 4,83 6,49 1,72	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64	μg g ⁻¹ FG] 0,47 1,25 0,76 0,19	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97	μg g ⁻¹ FG] 20,71 28,08 35,95 19,37	MW	SD
<u>Wt Col0</u> 8 9 7 10 4	FG [mg] 62,6 70 70,3 107,7 94,8	<i>a</i> -10c Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82	[µg g ⁻¹ FG] 16,91 20,98 27,89 16,67 26,28	β-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55	[µg g ⁻¹ FG] 0,62 1,02 0,81 0,79 0,92	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54	μg g ⁻¹ FG] 2,70 4,83 6,49 1,72 5,86	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00	μg g ⁻¹ FG] 0,47 1,25 0,76 0,19 0,00	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90	μg g ⁻¹ FG] 20,71 28,08 35,95 19,37 33,07	MW 27,44	SD 7,33
Wt Col0 8 9 7 10 4 AtmenG	FG [mg] 62,6 70 70,3 107,7 94,8	<i>a</i> -10c Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82	[µg g ⁻¹ FG] 16,91 20,98 27,89 16,67 26,28	β-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55	[µg g ⁻¹ FG] 0,62 1,02 0,81 0,79 0,92	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 2,70 \\ 4,83 \\ 6,49 \\ 1,72 \\ 5,86 \end{array}$	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 0,47 \\ 1,25 \\ 0,76 \\ 0,19 \\ 0,00 \end{array}$	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90	μg g ⁻¹ FG] 20,71 28,08 35,95 19,37 33,07	MW 27,44	SD 7,33
Wt Col0 8 9 7 10 4 AtmenG 3	FG [mg] 62,6 70 70,3 107,7 94,8 90,9	<i>a</i> -1 <i>ac</i> Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82	[µg g ⁻¹ FG] 16,91 20,98 27,89 16,67 26,28 18,54	β-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55 19,94	[μg g ⁻¹ FG] 0,62 1,02 0,81 0,79 0,92	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54 255,27	μg g ⁻¹ FG] 2,70 4,83 6,49 1,72 5,86 2,81	8-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00 0,00	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 0,47 \\ 1,25 \\ 0,76 \\ 0,19 \\ 0,00 \\ \end{array}$	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90 1960,47	μg g ⁻¹ FG] 20,71 28,08 35,95 19,37 33,07 21,57	MW 27,44	SD 7,33
Wt Col0 8 9 7 10 4 AtmenG 3 6	FG [mg] 62,6 70 70,3 107,7 94,8 90,9 78,9	a-10c Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82 1685,27 1343,91	$[\mu g g^{-1} \\ FG]$ 16,91 20,98 27,89 16,67 26,28 18,54 17,03	β-Toe Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55 19,94 24,27	[μg g ⁻¹ FG] 0,62 1,02 0,81 0,79 0,92 0,22 0,31	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54 255,27 63,93	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ \hline FG \\ 2,70 \\ 4,83 \\ 6,49 \\ 1,72 \\ 5,86 \\ \hline 2,81 \\ 0,81 \end{array}$	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00 0,00 0,00	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 0,47 \\ 1,25 \\ 0,76 \\ 0,19 \\ 0,00 \\ \hline 0,00 \\ 0,00 \\ \end{array}$	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90 1960,47 1432,11	μg g ⁻¹ FG] 20,71 28,08 35,95 19,37 33,07 21,57 18,15	MW 27,44	SD 7,33
Wt Col0 8 9 7 10 4 AtmenG 3 6 8	FG [mg] 62,6 70 70,3 107,7 94,8 90,9 78,9 78,0	a-10c Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82 1685,27 1343,91 1109,00	[µg g ⁻¹ FG] 16,91 20,98 27,89 16,67 26,28 18,54 17,03 14,22	β-Toe Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55 19,94 24,27 23,39	$\begin{matrix} [\mu g \ g^{-1} \\ FG] \end{matrix}$ 0,62 1,02 0,81 0,79 0,92 0,22 0,31 0,30	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54 255,27 63,93 130,46	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 2,70 \\ 4,83 \\ 6,49 \\ 1,72 \\ 5,86 \\ \hline 2,81 \\ 0,81 \\ 1,67 \\ \end{array}$	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \\ 0,47 \\ 1,25 \\ 0,76 \\ 0,19 \\ 0,00 \\ \hline 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ \end{array}$	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90 1960,47 1432,11 1262,84	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \end{array} \\ \begin{array}{c} 20,71 \\ 28,08 \\ 35,95 \\ 19,37 \\ 33,07 \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} 21,57 \\ 18,15 \\ 16,19 \end{array}$	MW 27,44	SD 7,33
Wt Col0 8 9 7 10 4 AtmenG 3 6 8 9	FG [mg] 62,6 70 70,3 107,7 94,8 90,9 78,9 78,9 78,0 60,8	a-10c Gesantgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82 1685,27 1343,91 1109,00 1362,93	[μg g ⁻¹ FG] 16,91 20,98 27,89 16,67 26,28 18,54 17,03 14,22 22,42	β-Toe Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55 19,94 24,27 23,39 29,24	[µg g ⁻¹ FG] 0,62 1,02 0,81 0,79 0,92 0,22 0,31 0,30 0,48	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54 255,27 63,93 130,46 135,03	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \\ 2,70 \\ 4,83 \\ 6,49 \\ 1,72 \\ 5,86 \\ \hline \\ 2,81 \\ 0,81 \\ 1,67 \\ 2,22 \\ \end{array}$	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 0,47 \\ 1,25 \\ 0,76 \\ 0,19 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \end{array}$	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90 1960,47 1432,11 1262,84 1527,21	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \\ 20,71 \\ 28,08 \\ 35,95 \\ 19,37 \\ 33,07 \\ \hline \\ 21,57 \\ 18,15 \\ 16,19 \\ 25,12 \\ \end{array}$	MW 27,44	SD 7,33
Wt Col0 8 9 7 10 4 AtmenG 3 6 8 9 7	FG [mg] 62,6 70,3 107,7 94,8 90,9 78,9 78,9 78,0 60,8 98,6	a-10c Gesantgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82 1685,27 1343,91 1109,00 1362,93 1513,38	[µg g ⁻¹ FG] 16,91 20,98 27,89 16,67 26,28 18,54 17,03 14,22 22,42 15,35	β-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55 19,94 24,27 23,39 29,24 30,85	[µg g ⁻¹ FG] 0,62 1,02 0,81 0,79 0,92 0,22 0,31 0,30 0,48 0,31	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54 255,27 63,93 130,46 135,03 198,38	μg g ⁻¹ FG] 2,70 4,83 6,49 1,72 5,86 2,81 0,81 1,67 2,22 2,01	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 16,80	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 0,47 \\ 1,25 \\ 0,76 \\ 0,19 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,17 \\ \end{array}$	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90 1960,47 1432,11 1262,84 1527,21 1759,40	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \\ \hline 20,71 \\ 28,08 \\ 35,95 \\ 19,37 \\ 33,07 \\ \hline 21,57 \\ 18,15 \\ 16,19 \\ 25,12 \\ 17,84 \\ \end{array}$	MW 27,44 19,77	SD 7,33 3,57
Wt Col0 8 9 7 10 4 AtmenG 3 6 8 9 7 10 4 AtmenG 9 7 AtmenG+	FG [mg] 62,6 70,70,3 107,7 94,8 90,9 78,9 78,9 78,9 78,9 66,8 98,6 At1g23360	a-10c Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82 1685,27 1343,91 1109,00 1362,93 1513,38	$\begin{matrix} [\mu g \ g^{-1} \\ FG \end{matrix} \\ \hline FG \end{matrix} \\ \hline 16.91 \\ 20.98 \\ 27.89 \\ 16.67 \\ 26.28 \\ \hline 18.54 \\ 17.03 \\ 14.22 \\ 22.42 \\ 15.35 \\ \end{matrix}$	β-Toc Gesamtgehalt in <u>der Probe [ng]</u> 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55 19,94 24,27 23,39 29,24 30,85	$\begin{matrix} [\mu g \ g^{-1} \\ FG \end{matrix} \\ 0,62 \\ 1,02 \\ 0,81 \\ 0,79 \\ 0,92 \\ 0,22 \\ 0,31 \\ 0,30 \\ 0,48 \\ 0,31 \\ \end{matrix}$	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54 255,27 63,93 130,46 135,03 198,38	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \\ \hline \\ 2,70 \\ 4,83 \\ 6,49 \\ 1,72 \\ 5,86 \\ \hline \\ 2,81 \\ 0,81 \\ 1,67 \\ 2,22 \\ 2,01 \\ \end{array}$	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 16,80	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 0,47 \\ 1,25 \\ 0,76 \\ 0,19 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,17 \end{array}$	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90 1960,47 1432,11 1262,84 1527,21 1759,40	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \\ \hline 20,71 \\ 28,08 \\ 35,95 \\ 19,37 \\ 33,07 \\ \hline 21,57 \\ 18,15 \\ 16,19 \\ 25,12 \\ 17,84 \\ \end{array}$	MW 27,44 19,77	SD 7,33 3,57
Wt Col0 8 9 7 10 4 4 4 6 8 9 7 10 4 4 6 8 9 7 10 4 4 7 10 4 4 6 8 9 7 10 2 7 10 2 10 <td>FG [mg] 62,6 70 70,3 107,7 94,8 90,9 78,9 78,9 78,9 78,9 78,0 60,8 98,6 At1g23360 90,9</td> <td>a-10c Gesantrgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82 1685,27 1343,91 1109,00 1362,93 1513,38</td> <td>$\begin{array}{c} [\mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 16,91 \\ 20,98 \\ 27,89 \\ 16,67 \\ 26,28 \\ 18,54 \\ 17,03 \\ 14,22 \\ 22,42 \\ 15,35 \\ 18,09 \end{array}$</td> <td>β-Toe Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55 19,94 24,27 23,39 29,24 30,85 51,96</td> <td>$\begin{matrix} [\mu g \ g^{-1} \\ FG] \end{matrix} \\ 0,62 \\ 1,02 \\ 0,81 \\ 0,79 \\ 0,92 \end{matrix} \\ 0,22 \\ 0,31 \\ 0,30 \\ 0,48 \\ 0,31 \\ 0,57 \end{matrix}$</td> <td>γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54 255,27 63,93 130,46 135,03 198,38 613,66</td> <td>µg g⁻¹ FG] 2,70 4,83 6,49 1,72 5,86 2,81 0,81 1,67 2,22 2,01 6,75</td> <td>δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00</td> <td>$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \\ 0,47 \\ 1,25 \\ 0,76 \\ 0,19 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,17 \\ 0,00 \end{array}$</td> <td>Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90 1960,47 1432,11 1262,84 1527,21 1759,40 2309,84</td> <td>$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \\ \hline \\ 20,71 \\ 28,08 \\ 35,95 \\ 19,37 \\ 33,07 \\ \hline \\ 21,57 \\ 18,15 \\ 16,19 \\ 25,12 \\ 17,84 \\ \hline \\ 25,41 \\ \end{array}$</td> <td>MW 27,44 19,77</td> <td>SD 7,33 3,57</td>	FG [mg] 62,6 70 70,3 107,7 94,8 90,9 78,9 78,9 78,9 78,9 78,0 60,8 98,6 At1g23360 90,9	a-10c Gesantrgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82 1685,27 1343,91 1109,00 1362,93 1513,38	$\begin{array}{c} [\mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 16,91 \\ 20,98 \\ 27,89 \\ 16,67 \\ 26,28 \\ 18,54 \\ 17,03 \\ 14,22 \\ 22,42 \\ 15,35 \\ 18,09 \end{array}$	β-Toe Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55 19,94 24,27 23,39 29,24 30,85 51,96	$\begin{matrix} [\mu g \ g^{-1} \\ FG] \end{matrix} \\ 0,62 \\ 1,02 \\ 0,81 \\ 0,79 \\ 0,92 \end{matrix} \\ 0,22 \\ 0,31 \\ 0,30 \\ 0,48 \\ 0,31 \\ 0,57 \end{matrix}$	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54 255,27 63,93 130,46 135,03 198,38 613,66	µg g ⁻¹ FG] 2,70 4,83 6,49 1,72 5,86 2,81 0,81 1,67 2,22 2,01 6,75	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \\ 0,47 \\ 1,25 \\ 0,76 \\ 0,19 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,17 \\ 0,00 \end{array}$	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90 1960,47 1432,11 1262,84 1527,21 1759,40 2309,84	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \\ \hline \\ 20,71 \\ 28,08 \\ 35,95 \\ 19,37 \\ 33,07 \\ \hline \\ 21,57 \\ 18,15 \\ 16,19 \\ 25,12 \\ 17,84 \\ \hline \\ 25,41 \\ \end{array}$	MW 27,44 19,77	SD 7,33 3,57
Wt Col0 8 9 7 10 4 AtmenG 3 6 8 9 7 10 4 AtmenG 3 6 8 9 7 10 4 2 7 10 4 2 7 10 4 3 5 6 8 9 7 7 10 4 2 7 10 4 10<	FG [mg] 62,6 70 70,3 107,7 94,8 90,9 78,9 78,0 60,8 98,6 At1g23360 90,9 59,2	a-10c Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82 1685,27 1343,91 1109,00 1362,93 1513,38	[µg g ⁻¹ FG] 16,91 20,98 27,89 16,67 26,28 18,54 17,03 14,22 22,42 15,35 18,09 17,08	β-Toe Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55 19,94 24,27 23,39 29,24 30,85 51,96 64,96	$\begin{matrix} [\mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 0,62 \\ 1,02 \\ 0,81 \\ 0,79 \\ 0,92 \\ 0,22 \\ 0,31 \\ 0,30 \\ 0,48 \\ 0,31 \\ 0,57 \\ 1,10 \\ \end{matrix}$	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54 255,27 63,93 130,46 135,03 198,38 613,66 149,62	μg g ⁻¹ FG] 2,70 4,83 6,49 1,72 5,86 2,81 0,81 1,67 2,22 2,01 6,75 2,53	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 77,47	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \\ \hline \\ G \\ 0,47 \\ 1,25 \\ 0,76 \\ 0,19 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,17 \\ \hline \\ 0,00 \\ 1,31 \\ \end{array}$	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90 1960,47 1432,11 1262,84 1527,21 1759,40 2309,84 1302,93	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ \overline{FG]} \\ 20,71 \\ 28,08 \\ 35,95 \\ 19,37 \\ 33,07 \\ \hline \\ 21,57 \\ 18,15 \\ 16,19 \\ 25,12 \\ 17,84 \\ \hline \\ 25,41 \\ 22,01 \\ \end{array}$	MW 27,44 19,77	SD 7,33 3,57
Wt Col0 8 9 7 10 4 4 4 4 6 8 9 7 16 6 8 9 7 1 7 1	FG [mg] 62,6 70 70,3 107,7 94,8 90,9 78,9 78,9 78,0 60,8 98,6 At1g23360 90,9 59,2 76	a-10c Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82 1685,27 1343,91 1109,00 1362,93 1513,38 1644,21 1010,87 934,85	[µg g ⁻¹ FG] 16,91 20,98 27,89 16,67 26,28 18,54 17,03 14,22 22,42 15,35 18,09 17,08 12,30	β-Toe Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55 19,94 24,27 23,39 29,24 30,85 51,96 64,96 135,90	$\begin{matrix} [\mu g \ g^{-1} \\ FG] \end{matrix} \\ 0,62 \\ 1,02 \\ 0,81 \\ 0,79 \\ 0,92 \end{matrix} \\ 0,22 \\ 0,31 \\ 0,30 \\ 0,48 \\ 0,31 \\ 0,57 \\ 1,10 \\ 1,79 \end{matrix}$	γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54 255,27 63,93 130,46 135,03 198,38 613,66 149,62 500,34	μg g ⁻¹ FG] 2,70 4,83 6,49 1,72 5,86 2,81 0,81 1,67 2,22 2,01 6,75 2,53 6,58	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 16,80 0,00 77,47 133,68	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 0,47 \\ 1,25 \\ 0,76 \\ 0,19 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,17 \\ 0,00 \\ 1,31 \\ 1,76 \\ \end{array}$	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90 1960,47 1432,11 1262,84 1527,21 1759,40 2309,84 1302,93 1704,76	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG \\ \hline \\ 20,71 \\ 28,08 \\ 35,95 \\ 19,37 \\ 33,07 \\ \hline \\ 21,57 \\ 18,15 \\ 16,19 \\ 25,12 \\ 17,84 \\ \hline \\ 25,41 \\ 22,01 \\ 22,43 \\ \end{array}$	MW 27,44 19,77	SD 7,33 3,57
Wt Col0 8 9 7 10 4 AmenG 3 6 8 9 7 10 4 AmenG 3 6 7 7 7 8 9 7 7 8 8	FG [mg] 62,6 70 70,3 107,7 94,8 90,9 78,9 78,9 78,0 60,8 98,6 At1g23360 90,9 59,2 76 79,1	a-10c Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1058,80 1468,84 1960,98 1795,63 2491,82 1685,27 1343,91 1109,00 1362,93 1513,38 1644,21 1010,87 934,85 1233,29	[µg g ⁻¹ FG] 16,91 20,98 27,89 16,67 26,28 18,54 17,03 14,22 22,42 15,35 18,09 17,08 12,30 15,59	β-Toe Gesamtgehalt in der Probe [ng] 38,89 71,18 57,04 84,71 87,55 19,94 24,27 23,39 29,24 30,85 51,96 64,96 135,90 50,63		γ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 169,18 338,16 456,11 185,00 555,54 255,27 63,93 130,46 135,03 198,38 613,66 149,62 500,34 113,83	μg g ⁻¹ FG] 2,70 4,83 6,49 1,72 5,86 2,81 0,81 1,67 2,22 2,01 6,75 2,53 6,58 1,44	δ-Toc Gesamtgehalt in der Probe [ng] 29,38 87,48 53,41 20,64 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 16,80 0,00 77,47 133,68 33,90	$\begin{array}{c} \mu g \ g^{-1} \\ FG] \\ 0,47 \\ 1,25 \\ 0,76 \\ 0,19 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,00 \\ 0,17 \\ 0,00 \\ 1,31 \\ 1,76 \\ 0,43 \\ \end{array}$	Gesamt Gesamtgehalt in der Probe [ng] 1296,25 1965,67 2527,54 2085,97 3134,90 1960,47 1432,11 1262,84 1527,21 1759,40 2309,84 1302,93 1704,76 1431,66	μg g ⁻¹ FG] 20,71 28,08 35,95 19,37 33,07 21,57 18,15 16,19 25,12 17,84 25,41 22,541 22,54 18,10	MW 27,44 19,77	SD 7,33 3,57

Salicylatmessungen

Tab. X: Salicylatbestimmung in WT, ics1, ics2 und ics1ics2 vor und nach UV-Stress

In einem Acetonitrilextrakt aus Pflanzen vor und nach UV-Stress wurde Salicylat mittels HPLC aufgetrennt und durch Vergleich der integrierten Peak-Flächen von Salicylat und *o*-Anisinsäure quantifiziert. Aus mindestens Siebenfachbestimmungen wurden die Mittelwerte (MW) und die Standardabweichungen (SD) berechnet.

Wt Col0						
#	FG [mg]	Fläche des integrierten o-Anisinsäure-Peaks	Fläche des integrierten Salicylat-Peaks	Salicylat [µg g ⁻¹ FG]	MW	SD
vor UV						
1	260,2	5382,83	440,35	0,48		
4	211,5	7234,35	351,59	0,70		
5	276,3	8137,28	459,96	0,62		
6	226,9	10066	465,27	0,62		
3	236,2	3404	245,49	0,46		
4	218,7	4970,22	280,42	0,39		
6	246,1	3672,71	402,61	0,68	0,56	0,12
nach UV						
7	261,7	3060,98	1290,52	2,45		
8	266,7	2579,85	2357,75	5,21		
9	244	2558,81	2529,33	6,16		
9	209,8	11358,4	3416,61	4,36		
10	268,3	10799,4	3399,02	3,57		
11	244,7	11349,6	3945,63	4,32		
11	228,8	3527,24	1654,23	3,12	4,17	1,26
ics1	1	Eläska das integrienten	Eläsha das integnienten	1	1	1
#	FG [mg]	o-Anisinsäure-Peaks	Salicylat-Peaks	Salicylat [µg g ⁻¹ FG]	MW	SD
vor UV						
13	242,6	3299,01	214,09	0,41		
14	275,5	3099,75	92,55	0,16		
12	272,5	9479,85	279,25	0,33		
13	287,1	7755,8	243,51	0,33		
14	232,7	8821,17	235,20	0,35		
16	283,4	3025,86	131,93	0,23		
17	265,7	2703,3	71,42	0,15		
18	212	3691,45	130,905	0,25	0,28	0,09
nach UV						
19	256,3	3418,86	219,226	0,38		
15	286,6	4502,4	275,603	0,65		
16	278,6	7784,34	449,78	0,63		
17	200,5	9109,3	325,247	0,54		
22	271,8	3336,03	179,13	0,30		
23	223,3	3639,34	197,803	0,37		
24	211,7	3451,2	192,726	0,40	0,47	0,138
ics2						
#	FG [mg]	Fläche des integrierten o-Anisinsäure-Peaks	Fläche des integrierten Salicylat-Peaks	Salicylat [µg g ⁻¹ FG]	MW	SD
vor UV						
25	241,2	3370,72	341,255	0,64		
26	217,4	3423,21	207,215	0,42		
27	256,7	3551,02	310,276	0,52		
28	263,3	3321,09	326,957	0,57		
18	292	4129,08	213,34	0,54		
19	288,4	7968,79	328,876	0,44		
20	234,7	5283,97	265,45	0,65	0,54	0,09
nach UV						
31	243,8	3756,41	1888,07	3,13		
21	234,9	7294,65	3443,02	6,11		
22	259,5	9419,63	3440,19	4,28		
23	215,9	9128,5	2142,03	3,30		1
34	292,4	3245,86	1860,63	2,98		
35	221,7	3111,64	2562,47	5,65		
36	249,8	3245,86	1860,63	3,49	4,13	1,27

ics1ics2						
	59.6	Fläche des integrierten	Fläche des integrierten	an is drai		
#	FG [mg]	o-Anisinsäure-Peaks	Salicylat-Peaks	Salicylat [µg g ' FG]	MW	SD
vor UV						
37	230,4	3660,13	34,7052	0,06		
38	216,3	3762,52	141,046	0,26		
39	272,2	2719,08	97,288	0,20		
40	248,1	3302,5	35,5107	0,07		
41	273,7	3475,32	56,0448	0,09		
42	175,9	2148,01	19,8853	0,08		
43	221,9	3060,02	33,9106	0,08	0,12	0,08
nach UV						
44	243,30	2451,90	155,16	0,40		
46	289,20	3287,03	148,48	0,24		
47	239,40	3431,58	93,56	0,17		
48	230,50	3471,88	171,70	0,33		
49	311,60	3414,50	99,77	0,14		
50	224,00	3308,11	88,52	0,18		
51	312,40	3644,38	68,39	0,09		
1	227,30	5450,78	30,59	0,08		
2	258,30	7594,49	27,01	0,04		
3	111,50	11820,60	32,72	0,08	0,17	0,12

Messungen des Phyllochinon- Lycopin- und β-Carotingehalts in Tomatenfrüchten

Die Messungen wurden in Tomatenfrüchten verschiedener Reifestadien durchgeführt: #1 ist die grüne Frucht am Beginn des Zellwachstums, #5 ist die reife grüne Frucht, #6 ist die Frucht, welche mit der Reifung beginnt, #10 ist die rote reife Tomatenfrucht. Alle anderen Nummern entsprechen Früchten, deren Reifestadien zwischen den genannten liegen.

Tab. XI: Phyllochinonquantifizierung in Tomatenfrüchten

Phyllochinon wurde mittels HPLC in Extrakten aus Tomatenfrüchten bestimmt. Durch Vergleich der integrierten Peak-Flächen des internen Standards Menachinon-4 und von Phyllochinon, wurde der Gesamt-Phyllochinongehalt in der Probe ermittelt und dann auf das Frischgewicht (FG) und das Trockengewicht (TG) bezogen. Es wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt und anschließend der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (SD) ermittelt.

#	FG [mg]	TG [mg]	Gesamt-Phyllochinon in der Probe [ng]	Phyllochinon	MW	SD	Phyllochinon	MW	SD
1	233.9	27.1	55.06239	2.03			0.24		~~
	284.9	36.2	91,58438	2,53	2.281	0.35	0.32	0.278	0.06
2	289.6	35	80.33044	2.30	_,	.,	0.28	0,210	-,
	314.7	43	80.61134	1.87			0.26		
	311.4	40.3	48,9727	1.22			0.16		
	352,9	50,3	81,26299	1,62	1,750	0,45	0,23	0,230	0,05
3	372	43.7	45,35784	1.04			0.12		
	320,3	41,5	56,13162	1,35			0,18		
	386,4	41,3	70,54171	1,71	1,366	0,34	0,18	0,160	0,03
4	268,9	26,8	38,07677	1,42	ĺ.	· · · · ·	0,14	í í	,
	339	62	55,65436	0,90			0,16		
	391,4	40,5	76,521036	1,89	1,403	0,50	0,20	0,167	0,03
5	456,9	26,3	30,68728	1,17			0,07		
	461	26,8	30,07025	1,12			0,07		
	639,8	43,4	41,07347	0,95	1,078	0,12	0,06	0,066	0,00
6	737,6	47,4	39,14065	0,83			0,05		
	542,5	30,7	29,64575	0,97			0,05		
	413,2	23	21,37066	0,93	0,907	0,07	0,05	0,053	0,00
7	481,6	27,7	27,91578	1,01			0,06		
	519,1	33,1	27,00376	0,82			0,05		
	504,5	28,8	23,34544	0,81	0,878	0,11	0,05	0,052	0,01
8	673,2	39,7	35,15171	0,89			0,05		
	486,5	31,3	29,63849	0,95			0,06		
	474,1	29,3	31,58056	1,08	0,970	0,10	0,07	0,060	0,01
9	390,2	21	17,26232	0,82			0,04		
	418,1	20,9	19,32458	0,92			0,05		
	391,6	18,5	13,61233	0,74	0,827	0,09	0,03	0,042	0,01
10	507,9	30,9	21,22234	0,69			0,04		
	413	23	15,79663	0,69			0,04		
	523,5	30	22,25211	0,74	0,705	0,03	0,04	0,041	0,00

Tab. XII: Quantifizierung von Lycopin und β-Carotin in Tomatenfrüchten

Lycopin und β -Carotin wurde mit Aceton aus Tomatenfrüchten extrahiert und mittels HPLC aufgetrennt und quantifiziert und die Gehalte pro Frischgewicht (FG) und Trockengewicht (TG) ermittelt. Es wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt. Anschließend wurden der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) berechnet.

		Gesamt-Lycopingehalt				Gesamt-β-Carotingehalt in			
#	TG [mg]	in der Probe [ng]	Lycopin [µg/g TG]	MW	SD	der Probe [ng]	b-Carotin [µg/g FG]	MW	SD
1	29,3	0	0,00			17,52588	89,72		
	33,6	0	0,00			27,92167	124,65		
	35	0	0,00	0,000	0,00	24,27917	104,05	106,142	17,56
2	55,1	0	0,00			36,07066	98,20		
	39,1	0	0,00	0,000	0,00	21,79143	83,60	102,625	17,02
3	40,5	0	0,00			24,43939	90,52		
	34,4	0	0,00			25,42	110,86		
	40,4	0	0,00	0,000	0,00	33,11	122,95	108,108	16,39
4	29,3	0	0,00			17,52588	89,72		
	33,6	0	0,00			27,92167	124,65		
	35	0	0,00	0,000	0,00	24,27917	104,05	106,142	17,56
5	25,000	2,62724	15,76			22,77	136,62		
	30,000	4,10896	20,54			23,10	115,48		
	24,300	3,31245	20,45	18,918	2,73	20,85506	128,73	126,947	10,68
6	41,1	118,12556	431,12			46,11053	168,29		
	23,9	98,44593	617,86			35,7004	224,06		
	40,3	124,44593	463,20	504,058	99,85	56,69798	211,03	201,127	29,18
7	43,3	218,49656	756,92			80,83043	280,01		
	22,9	162,19353	1062,40			33,41534	218,88		
	24,9	178,0303	1072,47	963,930	179,35	42,83604	258,05	252,313	30,97
8	35	493,45716	2114,82			102,94508	441,19		
	44,1	706,55271	2403,24			143,11861	486,80		
	31,1	671,14312	3237,02	2585,027	582,77	87,54385	422,24	450,076	33,18
9	23,4	741,62236	4753,99			120,31874	771,27		
	18,4	432,00672	3521,79			45,92821	374,41		
	28,6	694,5492	3642,74	3972,841	679,19	83,64967	438,72	528,137	213,00
10	38	1414,71773	5584,41			104,21916	411,39		
	47,9	1843,08138	5771,65			153,14083	479,56		
	38,5	1486,02955	5789,73	5715,264	113,68	91,38045	356,03	415,661	61,88

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Peter Dörmann für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Betreuung, die ständige Bereitschaft zur Diskussion und nicht zuletzt für die Begutachtung meiner Dissertation.

Prof. Dr. Ulf Stahl von der Technischen Universität Berlin danke ich ebenfalls für die freundliche Betreuung und die Übernahme des zweiten Gutachtens dieser Arbeit.

Prof. Dr. Lothar Willmitzer und Dr. Dirk Hincha danke ich für die Evaluierung meines Projekts.

Bei Mark Aurel Schöttler und Wolfram Thiele möchte ich mich für ihre große Hilfe bei den unzähligen spektroskopischen Messungen zur Charakterisierung des Photosyntheseapparates bedanken.

Großer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dörmann für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Auch allen anderen Mitgliedern des Max-Planck-Instituts möchte ich für ihre Unterstützung danken; vor allem den Mitgliedern der Service-Teams, deren Arbeit wesentlich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am Institut verantwortlich war.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die immer ein offenes Ohr für meine kleinen und großen Freuden und Ärgernisse hatten und mich zu jeder Zeit ermutigt und unterstützt haben.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht worden.

Lohmann A, Schöttler MA, Bréhélin C, Kessler F, Boch R, Cahoon EB, Dörmann P (2006) Deficiency in phylloquinone (vitamin K₁) methylation affects prenyl quinone distribution, photosystem I abundance, and anthocyanin accumulation in the *Arabidopsis AtmenG* mutant. J Biol Chem. **281**: 40461-40472

Garcion C und <u>Lohmann A</u>, Lamodière E, Catinot J, Buchala A, Dörmann P, Métraux J-P (eingereicht) Isochorisamte synthase 2 genes of *Arabidopsis thaliana*.