

FAX-Proteine in *Arabidopsis thaliana* – Struktur, Lokalisation  
und Funktion im Fettsäuretransport

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

von  
Anne Könnel

Saarbrücken  
August, 2021

Tag des Kolloquiums: 24. November 2021

Dekan: Prof. Dr. Jörn Erik Walter

Berichtersteller/in: Prof. Dr. Katrin Philippar  
Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus

Vorsitz: Prof. Dr. Bruce Morgan

Akad. Mitarbeiterin: Dr. Eva Steinmetz

Folgende Publikationen wurden während der vorliegenden Doktorarbeit angefertigt und sind bereits veröffentlicht oder in Vorbereitung:

Bugaeva W.\*, Könnel A.\*, Peter J.\*, Mees J., Hankofer V., Schick C., Schmidt A., Banguela-Castillo A., Philippar K. (2021). FAX proteins in the inner envelope of chloroplasts can complement each other for fatty acid transport. *J. Ex. Bot.* (submitted), \* these authors contributed equally

Könnel, A., Bugaeva, W., Gügel, I.L., Philippar, K. (2019). BANFF: bending of bilayer membranes by amphiphilic  $\alpha$ -helices is necessary for form and function of organelles. *Biochem Cell Biol.* doi: 10.1139/bcb-2018-0150. PMID: 30208283.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Abschlussarbeiten angeleitet, die bereits Auszüge der Daten enthielten:

„FAX4 und FAX7, Fettsäuretransporter in Pflanzen“ – Bachelorarbeit Simon Both, UdS Saarbrücken, 2018

„Analyse von intrazellulären Fettsäuretransporter in Pflanzen“ – Bachelorarbeit Julia Mees, UdS Saarbrücken, 2019

Experience is the hardest kind of teacher. It gives you the test first and the lesson afterward.

–Oscar Wilde–

Für alle, die mich lieben.

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1	Die Rolle von Fettsäuren und Lipiden in Pflanzen.....	4
1.2	Fettsäure- und Lipidmetabolismus in Pflanzen.....	4
1.3	Transport von Fettsäuren und Lipiden.....	8
1.4	Biologische „ <i>Lipid Bilayer</i> “ Membranen.....	10
1.5	Die Familie der FAX-Proteine .....	13
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
3.1	Geräte.....	16
3.2	Chemikalien und Enzyme .....	17
3.3	Kits .....	20
3.4	Pflanzen .....	20
3.4.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	20
3.4.2	<i>Nicotiana benthamiana</i> .....	22
3.5	Bakterienstämme .....	22
3.5.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	22
3.5.2	<i>Escherichia coli</i> .....	22
3.6	Hefestämme .....	23
3.7	Oligonukleotidprimer .....	24
3.8	Größenstandard .....	26
3.9	Anzuchtbedingungen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	26
3.10	Sterilisation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Samen.....	26
3.11	Sterile Anzucht auf Nährmedium-Platten .....	27
3.12	Anzucht auf Erde von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
3.13	Keimungsanalyse auf MS-Platte.....	27
3.14	Phänotypisierung auf Erde .....	27
3.15	Kreuzung von <i>Arabidopsis</i> Einzelmutanten.....	27
3.16	Segregations- und Samenentwicklungsanalysen von <i>Arabidopsis</i> -Mutanten .....	28
3.17	Lipidextraktion mittels „ <i>Boiling-Water Protocol</i> “ zur Massenspektrometrie.....	28
3.18	Isolierung genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	29
3.19	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction, PCR</i> ) .....	29
3.20	Agarosegelelektrophorese .....	30
3.21	DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	30
3.22	Restriktionsverdau und Ligation / Klonierung.....	30
3.23	PCR Klonierung mittels <i>circular polymerase extension cloning (CPEC)</i> .....	31

3.24	RNA Isolierung .....	31
3.25	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) zur cDNA Synthese.....	32
3.26	qRT-PCR ( <i>quantitative Realtime PCR</i> ).....	32
3.27	Anzucht von Bakterien .....	32
3.28	Plasmidextraktion.....	33
3.29	Sequenzierung.....	33
3.30	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	33
3.31	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	33
3.32	Herstellung kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen.....	34
3.33	Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	34
3.34	Fluoreszenzmikroskopie .....	35
3.35	Anzucht der Hefen.....	35
3.36	Transformation kompetenter Hefezellen.....	35
3.37	Herstellung kompetenter Hefezellen .....	35
3.38	Drop-Dilution-Test.....	36
3.39	Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	36
3.40	Herstellung von <i>E. coli</i> Zelllysaten .....	36
3.41	Isolation der <i>E. coli</i> Membranen .....	37
3.42	Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Agarosebeads und Imidazol .....	37
3.43	Aufreinigung mittels FPLC ( <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> ).....	38
3.44	Dynamische Lichtstreuung ( <i>Dynamic-Light-Scattering DLS</i> ) .....	39
3.45	<i>Size-Exclusion-Chromotography-Multi-Angle-Light-Scattering</i> (SEC-MALS) .....	39
3.46	SDS-Polyacrylamid Gele.....	40
3.47	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	40
3.48	Kolloidale Coomassie-Blau Färbung .....	40
3.49	Elektrotransfer von Proteinen (Western-Blot).....	40
3.50	Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper.....	41
3.51	Mitochondrien und Mikrosomen Importassay – <i>in vitro</i> .....	41
3.52	Digitale Sequenzanalysen.....	42
3.53	Statistische Analysen .....	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
4.1	Rekombinante Expression der FAX-Proteine .....	44
4.1.1	Rekombinante Proteinexpression von FAX1 in <i>E. coli</i> .....	44
4.2	Charakterisierung der Proteine FAX4, FAX5, FAX6 und FAX7 .....	54
4.2.1	Sequenzanalysen der FAX-Proteine .....	54

4.2.2	Funktionelle Analysen der FAX-Proteine in Hefezellen.....	59
4.2.3	Lokalisationsstudien der <i>Arabidopsis</i> Proteine FAX5, FAX6 und FAX7.....	63
4.2.4	Analysen von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten.....	75
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>97</b>
5.1	Rekombinante Expression in <i>E. coli</i> .....	97
5.2	Hypothese zu Topologie und Funktion der FAX-Proteine .....	104
5.3	FAX-Proteine ermöglichen den Transport von Fettsäuren .....	109
5.4	Die physiologische Rolle der FAX-Proteine in Pflanzen.....	112
5.5	FAX1 und FAX5/6 – Transporter im selben Stoffwechselweg!?	119
<b>6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>124</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>125</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>126</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>144</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>147</b>
<b>12</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>148</b>
<b>13</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>151</b>
<b>14</b>	<b>Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang .....</b>	<b>173</b>
<b>15</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>176</b>
<b>16</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>178</b>

## 1 Einleitung

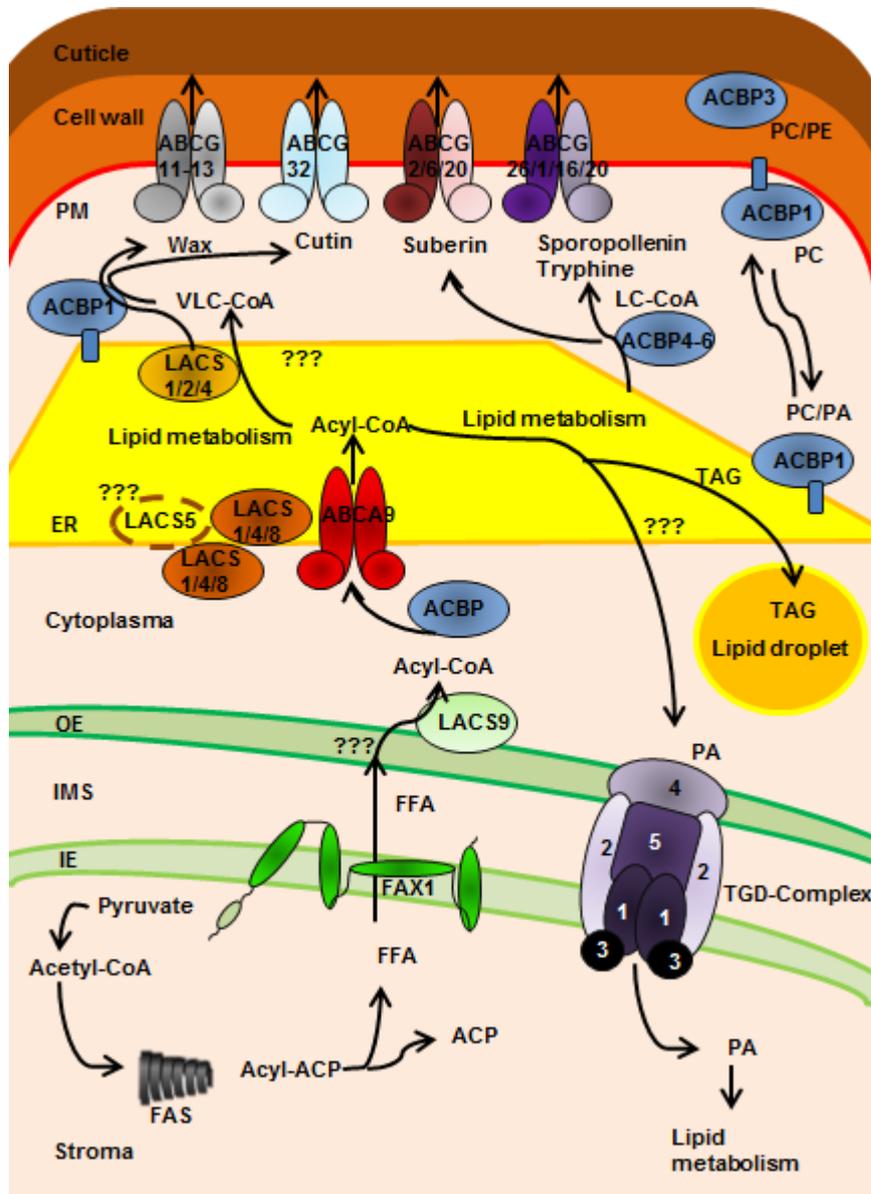
### 1.1 Die Rolle von Fettsäuren und Lipiden in Pflanzen

Als essentielle Bausteine pflanzlicher Zellen stellen Fettsäuren (*fatty acids*, FA) wichtige Komponenten biologischer Membranen und von Lipidheteropolymeren dar. Letztere fungieren als hydrophobe Barrieren auf der Pflanzenoberfläche oder Grenzgeweben, wie Epidermis (Kutin und Wachs), Wurzelendodermis und Periderm (Suberin) oder Pollengewebe (Sporopollenin) (Dobritsa *et al.*, 2009; Pollard *et al.*, 2008). In Pflanzen werden Fettsäuren zur Synthese von Acyllipiden, wie Phospho-, Galakto- und Sphingolipiden, Speicherölen, wie Triacylglycerol (TAG), oder anderen Fettsäuremetaboliten verwendet (Kalinger *et al.*, 2020; Nakamura 2013, Moellering und Benning 2011). TAG wird in drei Organen der Pflanze gebildet: Dem Samen, den Blättern und den Blütenknospen. In einem als Ölkörper oder Lipidtröpfchen (LD, *lipid droplet*) bezeichneten Organell, werden TAGs gespeichert und mittels einer einschichtigen Lipidhülle vom hydrophilen Zytosol abgegrenzt (Li *et al.*, 2016; Li-Beisson *et al.*, 2013; Bates *et al.*, 2013; Beisson *et al.*, 2012). Die pflanzliche Fettsäure und TAG Synthese sowie die transkriptionelle und entwicklungsgesteuerte Regulation dieser Prozesse wurden ausführlich untersucht (Bates *et al.*, 2013; Marchive *et al.*, 2014). Darüber hinaus bedingen Alterungsprozesse, Kälteakklimatisierung oder Nährstoffmangel einen Fettsäure/Lipid Umbau oder Umverteilung, zum Schutz der Pflanze und Erhaltung der Membranfluidität (Troncoso-Ponce *et al.*, 2013; Nakamura *et al.*, 2013; Moellering und Benning, 2011). Daher sind der Lipidmetabolismus und dessen Regulation nicht nur wichtig für die Membranfunktion, sondern auch für Entwicklung, Wachstum und Stresstoleranz der Pflanze. Um diese Mechanismen zu gewährleisten, bedarf es also dem Austausch von Fettsäuren, Lipiden und deren Intermediaten zwischen Zellorganellen und Membransystemen. Allerdings können sich lipophile Moleküle nicht frei durch eine wässrige Umgebung bewegen und ihr Transport muss directional sein. Intrazellulärer Fettsäure-/Lipidtransport kann auf verschiedene Arten stattfinden: die Bildung von Membrankontaktstellen, Diffusion innerhalb der Membran, Vesikeltransport und direktem Transport der Moleküle (Hurlock *et al.*, 2014; Block und Jouhet 2015; Bates 2016; Du *et al.*, 2016; Salminen *et al.*, 2016, Michaud und Jouhet, 2019).

### 1.2 Fettsäure- und Lipidmetabolismus in Pflanzen

Pflanzen nehmen keine Fettsäuren und Lipide aus ihrer Umwelt auf, weshalb jede Pflanzenzelle diese selbst synthetisieren muss. Dies geschieht primär in zwei Kompartimenten, den Plastiden, am besten untersucht in photosynthetisch aktiven, murenen Chloroplasten, und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Der Abbau von Lipiden findet weitestgehend über  $\beta$ -Oxidation in Peroxisomen statt. In manchen Pflanzenspezies wird auch ein geringer Teil in den Mitochondrien abgebaut. (Kalinger *et al.*, 2020; Masterson und Wood, 2001; Kindl, 1993). Im plastidären Stroma startet die *de novo* Fettsäuresynthese ausgehend von Pyruvat, welches mittels der Pyruvatdehydrogenase unter Abspaltung einer

CO<sub>2</sub>-Gruppe zu Acetyl-CoA metabolisiert wird. Acetyl-CoA stellt nun die kleinste Einheit der *de novo* Fettsäure-Synthese dar (Abb. 1).



**Abb. 1: Schematische vereinfachte Darstellung der Fettsäure/Lipid-Transportwege innerhalb der pflanzlichen Zelle.** FA Synthese ausgehend von Pyruvat im plastidären Stroma, FA/Lipid-Transport zum ER und zur Plasmamembran (PM), ebenso zurück vom ER zum Plastiden und in Lipidtröpfchen. FAS: Fatty acid synthesis/ Fettsäuresynthese. ACP: Acyl-Carrier-Protein. FFA: Free Fatty Acids/ Freie Fettsäuren. FAX1: Fatty Acid Exporter 1. LACS: Long-Acyl-CoA-Synthetase. ACBP: Acyl-Carrier-Binding-Protein. TAG: Triacylglycerol. ABC: ATP-Binding-Cassette Transporter. IE: inner envelope / innere Hüllmembran. OE: outer envelope/ äußere Hüllmembran. IMS: inter membrane space/ Intermembranraum. ER: Endoplasmatisches Retikulum. PM: Plasmamembran. PC: Phosphatidylcholin. PE: Phosphatidylethanolamin. PA: Phosphatidic acid / Phosphatidsäure. ??? : Transport-Mechanismen oder -wege / Lokalisation unbekannt. Die Darstellung ist eine Zusammenfassung der Literatur, angelehnt an Li *et al.* (2016). Die Einzelquellen sind dem Text zu entnehmen.

Der Ausgangsstoff Pyruvat kann entweder in Plastiden selbst synthetisiert werden oder als Produkt der Glykolyse aus dem Cytosol in den Plastiden transportiert werden. Hier konnte für den Na<sup>+</sup>-abhängigen Pyruvattransporter BASS2 (*bile acid sodium symporter family protein 2*) bereits in Samen von *Arabidopsis thaliana* eine Rolle im Pyruvattransport über Plastidmembranen beschrieben werden (Li-Beisson *et al.*, 2017). Im zyklischen Fettsäuresyntheseweg, werden wiederholend Acylketten verlängert, indem immer wieder C2-Gruppen hinzugefügt werden. Die an ein ACP (Acyl-Carrier-Protein) gekoppelten Acylketten erreichen so typischerweise Längen von C16 oder C18 (Troncoso-Ponce *et al.*, 2016; Kalinger *et al.*, 2020). Weiterhin, wird dann das ACP von der Acylkette, entweder über Transacylierung in ein Glycerol-3-Phosphat Rückgrat und somit in Lipide eingebaut oder durch Hydrolyse mittels einer Acyl-ACP Thioesterase zu einer freien Fettsäure abgespalten (Benning, 2009; Li-Beisson *et al.*, 2013). Im *Arabidopsis* Genom werden beispielsweise acht ACP Isoformen codiert, wovon fünf vermutlich im Chloroplasten und drei in Mitochondrien lokalisiert sind (Mekhedov *et al.*, 2000). In *Arabidopsis* sind zwei Acyl-ACP-Thioesterasen, FATA und FATB, im plastidären Stroma bekannt (Salas und Ohlrogge, 2002). Diese entlassen freie Fettsäuren, also nach Abspaltung der ACP-Gruppe, zum Export aus den Chloroplasten. Auch die Plastid-intrinsische Phospholipase PLIP1 kann durch gezielte Abspaltung von ungesättigten Acylgruppen des plastid-spezifischen Lipides Phosphatidylglycerol (PG) ebenso freie FAs zum Export aus dem Chloroplasten bereitstellen (Wang *et al.*, 2017). Da freie Fettsäuren toxisch sind, müssen diese schnell metabolisiert oder exportiert werden (Li-Beisson *et al.*, 2017). Ein Teil dieser Fettsäuren, etwa 38%, verbleibt im Chloroplasten und wird zur Synthese von Chloroplast-intrinsischen Lipiden, wie Monogalaktosyl-Diacyl-Glycerol (MGDG), Digalaktosyl-diacylglycerol (DGDG), Sulfoquinovosyl-diacylglycerol (SQDG) und Phosphatidyl-glycerol (PG) verwendet (prokaryotischer Lipid-Syntheseweg). Diese Lipide bilden zum Großteil das Membransystem der Thylakoiden und der inneren Hüllmembran (*inner envelope*, IE) der Chloroplasten. Da die plastidäre sn2-Acyltransferase ausschließlich C16-FAs als Substrat verwendet, beinhalten diese Lipide einen hohen Anteil an C16:3 Acylketten (Cook *et al.*, 2021; Wang und Benning, 2012a; Somerville und Browse, 1991; Browse *et al.*, 1986). In *Arabidopsis* wird die Mehrheit, über 60%, der synthetisierten FAs zum ER exportiert. Im ER findet nach Verlängerung oder Modifikation der Acylketten über den eukaryotischen Lipid-Syntheseweg, deren Einbau in verschiedene Lipide, wie die Phospholipide Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE), und Phosphatidylinositol (PI), Sphingolipide, Triacylglycerol (TAG) oder Vorläufern von extrazellulären lipophilen Komplexpolymeren, wie Wachs, Kutin, Suberin und Sporopollenin statt. Die ER sn2-Acyltransferase des eukaryotischen Syntheseweges besitzt eine höhere Präferenz für C18-FAs, was zu einem hohen Anteil an C18:3 Acylketten in den Lipiden führt (Li-Beisson *et al.*, 2017; Benning, 2008). Für die Synthese von plastid-intrinsischen Galaktolipiden, werden sowohl prokaryotische, als auch eukaryotische Diacylglycerol-Vorstufen verwendet, weshalb ein Lipid-Reimport aus dem ER über die Membranen der Chloroplasten nötig ist (Li *et al.*, 2016). TAGs werden in LDs gespeichert, welche durch Abknospung der äußeren ER-Membranschicht entstehen (Olzmann und Carvalho, 2019). Die Bildung von LDs durchläuft vier Prozessstufen: Keimbildung, Wachstum, Knospung und

Ablösung (Thiam und Foret, 2016). Zum Abbau von Fettsäuren hydrolysieren Lipasen freie Fettsäuren aus TAG, welche dann zu den Peroxisomen transportiert werden (Eastmond, 2006). Während der  $\beta$ -Oxidation, in den Peroxisomen, werden freie Fettsäuren mittels Acyl-CoA Synthetasen zu CoA-Thioestern aktiviert und dann durch Abspaltung zweier Kohlenstoffatome sukzessive abgebaut. Das Endprodukt CoA (Coenzym A) kann dann wieder in den Citratzyklus eingespeißt werden (Kalinger *et al.*, 2020).

Während ACP die Aktivierung der FAs während der *de novo* FA Synthese in Chloroplasten übernimmt, stellt CoA die Aktivierungsgruppe in metabolischen Prozessen außerhalb dar (Gueguen *et al.*, 2000; Ohlrogge *et al.*, 1978). CoA und ACPs in allen Organismen zu finden, jedoch sind ACP nicht immer, wie in Pflanzen, ein eigenständiges Protein, sondern beispielweise in Tieren oder Pilzen Subdomänen von größeren multifunktionalen Proteinen (Jenni *et al.*, 2007; Tsukamoto *et al.*, 1983). An der äußeren Hüllmembran von Plastiden werden freie FAs durch eine Acyl-CoA Synthetase durch ATP-abhängige Kopplung an CoA aktiviert. Der so entstehende Gradient, könnte als treibende Kraft für den Export aus dem Chloroplasten dienen (Li-Beisson *et al.*, 2017). Im Zytosol wird die Acyl-CoA Gruppe von einem Acyl-CoA Bindeprotein (ACBP) erkannt (Du *et al.*, 2016). ACBPs könnten als „Shuttle“ für Acylketten fungieren und so für die subzelluläre Verteilung aber auch für ein Gefälle der FA-Konzentration sorgen. Dieser Mechanismus der vektorialen Acylierung, also die Aktivierung von FAs durch Thioesterbindung und die anschließende Metabolisierung, scheinen auszureichen, um den Transport über die Membranen in Pro- und Eukaryoten zu ermöglichen (Li *et al.*, 2016). Bezüglich der Acyl-CoA-Aktivierungsenzyme konnte in *Arabidopsis* eine Superfamilie von 63 codierenden Genen identifiziert werden. Diese Gene können in sieben Subgruppen, hinsichtlich ihrer charakteristischen Aminosäuremotive, in Acyl-ACP- oder Acyl-CoA-Synthetasen unterteilt werden (Shockey *et al.*, 2003). Eine dieser Subgruppen wurde biochemisch charakterisiert und beinhaltet unter anderem neun Acyl-CoA-Synthetasen (*long-chain acyl-CoA synthetases*, LACS1-9). Die subzelluläre Lokalisation der LACS Proteine korreliert mit ihrer Substratspezifität. LACS1-4 und LACS8 sind ER lokalisiert. Für LACS5 wird eine ER Lokalisation vorhergesagt (Abb. 1). Für ER-assoziierte LACS Enzyme konnte in *Arabidopsis* ein Zusammenhang bei der Bildung von Bestandteilen der Kutikula beobachtet werden (Yeats und Rose, 2013). So weisen Mutanten dieser LACS Proteine verminderte Kutinschichten oder veränderte Kutinkompositionen auf (Kalinger *et al.*, 2020). In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass LACS1-3 auch am Fettsäuretransport beteiligt sind. Sie ermöglichen die Aufnahme langkettiger Fettsäuren (Pulsifer *et al.*, 2011). LACS6 und LACS7, die ein peroxisomales Targetingpeptid aufweisen, besitzen eine höhere Präferenz für Fettsäuren aus Samenölen. Lokalisiert an der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten ist LACS 9 (Shockey *et al.*, 2002). In *Arabidopsis* ist LACS9 die Mehrheit der plastidären LACS Aktivität zuzuordnen. Eine Reduktion der Fettsäure-Aktivierung um 85% konnte in *lacs9* Mutanten beobachtet werden (Schnurr *et al.*, 2002). Doppelmutanten wie *lacs1/lacs9* (Zhao *et al.*, 2010) oder *lacs4/lacs9* zeigen einen reduzierten Fettsäure-Gehalt in Samen TAGs. Eine zusätzliche Mutation von LACS8 in *lacs4/lacs9* Mutanten war letal (Jessen *et al.*, 2015). Es liegt also nahe, dass der Verlust von LACS9 durch andere LACS Enzyme

kompensiert werden kann und die Aktivität von LACS9 auf der zytosolischen Seite der äußeren Hüllmembran stattfinden muss (zur Übersicht: Li *et al.*, 2016) LACS9, plastidlokalisiert, und LACS4 und LACS8, ER-lokalisiert, könnten am retrograden Transport ER-metabolisierter Acylgruppen zurück zum Chloroplasten beteiligt sein (Jessen *et al.*, 2015). Bislang wurde allerdings davon ausgegangen, dass LACS9 an der äußeren Hüllmembran der Plastiden freie FAs aktiviert, die zur weiteren Metabolisierung im ER bestimmt sind (Kalinger *et al.*, 2020).

### 1.3 Transport von Fettsäuren und Lipiden

Wie genau der Transport von FAs über die Hüllmembranen der Chloroplasten stattfindet ist noch unklar, jedoch konnten mit der Entdeckung des Membranproteins FAX1 (*Fatty Acid Export 1*; Li *et al.*, 2015), lokalisiert in der inneren Hüllmembran, erste Schritte zur Aufklärung des Mechanismus gemacht werden (siehe unten und Li *et al.*, 2016; Li-Beisson *et al.*, 2017). In einem anderen eukaryotischen Model, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), werden freie FAs von extrazellulär über die Plasmamembran in die Zelle transportiert. Dieser Transport wird mittels des Membranproteines Fat1p (*fatty acid transport*) und einer interagierenden Acyl-CoA Synthetase (*fatty acyl-CoA synthetase, FACS*) – Faa1p oder Faa4p (*fatty acid activation*) ermöglicht. Mit seinen vier vorhergesagten hydrophoben Helices integriert Fat1p in die Plasmamembran und beinhaltet sowohl ATP/AMP- Binde- als auch FACS-Motive auf der zytosolischen Seite (DiRusso *et al.*, 2008). Die Verteilung der membranständigen Fat1p Domänen während des Fettsäure-Transportes ist bislang unklar, allerdings scheinen die zytosolischen Domänen zusammen mit Faa1p oder Faa4p die Acyl-CoA-Synthese zu ermöglichen (Li-Beisson *et al.*, 2017). Allerdings ist Fat1p kein klassischer Transporter, jedoch an der Aufnahme von freien FAs beteiligt. Nach dem Import der Fettsäuren ist eine Aktivierung durch Acyl-CoA nötig, was mehrheitlich von der Acyl-CoA-Synthetase Faa1p und dem teilweise redundanten Faa4p Enzym übernommen wird. Der Fettsäure-Import in *S. cerevisiae* ist auch unter dem Begriff der vektoriellen Acetylierung bekannt (Zou *et al.*, 2002; DiRusso *et al.*, 2000 und 2008; Tenagy *et al.*, 2015; Claus *et al.*, 2019). In Pflanzen wurde in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten ein prokaryotisch-klassifiziertes ABC- Transportersystem (*ATP-Binding-Cassette Transporter*) zum Lipidtransport beschrieben, bestehend aus den Domänen TGD1, TGD2 und TGD3 (*trigalactosyl-diacylglycerol 1– 3*)(zur Übersicht: Hurlock *et al.*, 2014; TGD1: Xu *et al.*, 2003 und 2005; TGD2: Awai *et al.*, 2006; TGD3: Lu *et al.*, 2007). TGD1 fungiert hier als Membran-intrinsische Permease, TGD2 bindet das Substrat im Intermembranraum und TGD3 stellt als Stroma-lokalisierte ATPase die Energie für den Transport zur Verfügung. An der äußeren Hüllmembran wurde ein Lipid-Transferprotein in  $\beta$ -Faltblattstruktur beschrieben, welches als TGD4 bezeichnet wird (Wang *et al.*, 2012b). TGD5, ein kleines Glycin-reiches Protein, könnte durch die Bindung an TGD4 und den TGD1-3 Komplex die Brücke über den Intermembranraum bilden und so beim Lipidtransport zwischen IE und OE des Chloroplasten helfen (Fan *et al.*, 2015). Da sowohl TGD2 als auch TGD4 eine Bindekapazität für Phosphatidsäure (PA) zeigen, wird angenommen, dass dieses Phospholipid das

Transportsubstrat für den gesamten TGD-Komplex darstellt (Abb. 1, Awai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013,).

Am Import der Fettsäuren/acyl-CoA-Gruppen in das ER könnte ABCA9, ein *Arabidopsis* ABC Transporter der Unterfamilie A beteiligt sein (Abb. 1). ABCA9 wurde als ER Membran lokalisiert beschrieben. Der Transporter scheint in den Fettsäure/acyl-CoA-Import ins ER im Samen involviert zu sein und ist während der Lipidakkumulation in Samen exprimiert (Kim *et al.*, 2013). *Knockout*- Mutanten in diesem ABCA9 Transporter zeigten weniger TAG Gehalt, reduzierte Samengröße und Gewicht. Überexpressionslinien zeigten den gegenteiligen Phänotyp (zur Übersicht: Hwang *et al.*, 2016; Theodoulou *et al.*, 2015).

Die meisten Lipid-Bausteine mitochondrieller Membranen werden in Pflanzen in anderen Organellen synthetisiert. In Folge dessen müssen Lipide aus anderen Kompartimenten in Mitochondrien importiert werden, obwohl auch in Mitochondrien eine *de novo* Synthese stattfinden kann. Diese ist allerdings enzymatisch auf die Herstellung von Phosphatidylglycerol (PG), einer Vorstufe des Mitochondrien-spezifischen Cardiolipins, beschränkt (Duncan *et al.*, 2011; Michaud *et al.*, 2017). Unter Phosphatstress gleicht das plastidäre Galaktolipid DGDG den Verlust von Phospholipiden in zellulären Membranen aus. Bei Phosphatmangel erhöhen sich die Membrankontakte zwischen Plastiden und Mitochondrien und PE wird aus den Mitochondrien exportiert, um im Zytosol als Phosphatquelle recycelt zu werden. Währenddessen wird DGDG importiert. Bei diesem Lipid austausch wird AtMic60, lokalisiert an der inneren Membran von Mitochondrien, eine wichtige Rolle zugeordnet. AtMic60 kann einem großen Lipid-Binde-Komplex (*mitochondrial transmembrane lipoprotein*, MTL) zugeordnet werden. Die Triebkraft und weitere Interaktionspartner für diesen Transport sind bislang unbekannt (Härtel *et al.*, 2000; Jouhet *et al.*, 2004; Michaud *et al.*, 2016 und 2017). Im Hefe-Modell ist das Protein Mic60 teil des sogenannten MICOS-Komplex (*mitochondrial contact site and cristae organizing system*) (Pfanner *et al.*, 2014; van der Laan *et al.*, 2016; Schorr und van der Laan, 2018). Die funktionellen Untereinheiten des MICOS, welche unter anderem Membrankrümmung und Gestaltung der inneren Mitochondrienmembran, somit von *Cristae* und *Cristae Junctions*, übernehmen, bestehen aus den Kernproteinen Mic10 und Mic60 (Zick *et al.*, 2009; Nunnari und Suomalainen 2012; Hessenberger *et al.*, 2017; Rampelt *et al.*, 2017a-c; Rampelt *et al.*, 2018).

Viele pflanzliche Epidermiszellen sind von einer hydrophoben Kutikula umgeben, bestehend aus einer Kutinschicht mit intrakutikulären und epikutikulären Wachsen. Während Kutin ein Netzwerk aus Acylglycerolen und Polyestern formt, ist Wachs ein Gemisch aus geradkettigen Alkanen, Alkoholen, Aldehyden, Ketonen, Estern und freien Fettsäuren (Kunst und Samuels, 2009; Beisson *et al.*, 2012; Bernard und Joubès, 2013). In *Arabidopsis* werden in Epidermiszellen synthetisierte FAs, Wachs- und Kutinvorstufen über die Plasmamembran exportiert (Suh *et al.*, 2005). Der aktive Export von Oberflächenlipiden aus der Plasmamembran heraus wird durch ABC Transporter der Unterfamilie G vermittelt. So spielen ABC - Transporter ABCG11-13 sowohl beim Export von Wachs/Kutin als auch von Suberin eine Rolle, und können dabei auch funktionelle Dimere unterschiedlicher Art bilden.

Beim Transport von Kutin konnte weiterhin ABCG32 eine Bedeutung zugeordnet werden. Die Transporter ABCG2, ABCG6 und ABCG20 sind an der Bildung der Suberinschicht in der Wurzelendodermis und in der Samenhülle beteiligt (Li *et al.*, 2016; Li-Beisson *et al.*, 2017, Wan *et al.*, 2020). Der Transport vom ER zur Plasmamembran wird meistens durch Vesikel oder Membrankontaktstellen vermittelt. Beispielsweise könnte der Fettsäure/Lipidaustausch zwischen ER und Plasmamembran auch mittels der acyl-CoA Bindeproteine 1 und 2 (ACBP1 und 2) stattfinden. ACBP1 und ACBP2 besitzen beide eine Transmembrandomäne, die sie der ER- und Plasmamembran anheftet. ACBP3 hingegen ist am Apoplasten lokalisiert und könnte so Lipide in die Zellwand geleiten (Abb. 1, Li *et al.*, 2016).

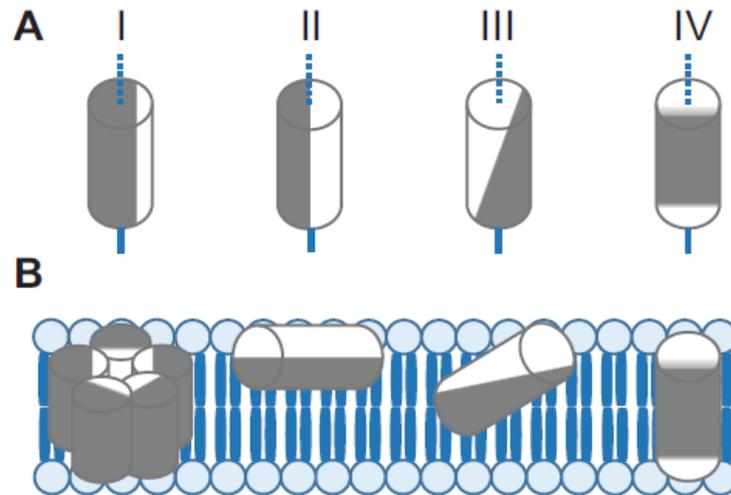
Die Pollenzellwand hat nicht nur die Aufgabe vor UV-Strahlung, Austrocknung oder Pathogenen zu schützen, sie ermöglicht auch die Interaktion mit dem Stigma während der Befruchtung. Deshalb führen bei Pflanzen Beeinträchtigungen des Zellwandaufbaus der Pollenkörner auch oft zu Störungen der männlichen Fertilität. Die Pollenwand selbst besteht aus drei Schichten: einer aus Zellulose-bestehenden Intine, der aus Sporopollenin aufgebauten Exine und dem Pollenmantel, bestehend aus Tryphine (Ariizumi und Toriyama, 2011; Quilichini *et al.*, 2015). Wie genau sich Sporopollenin und Tryphine zusammensetzen ist ungeklärt, aber es handelt sich dabei um komplexe, hydrophobe Biopolymere, die mehrheitlich aus Fettsäure/Lipid Derivaten bestehen. Während der Pollenentwicklung werden die meisten Bausteine aus den Tapetumzellen der Antheren exportiert und somit von außen auf das Pollenkorn angelagert. Der Export von Fettsäuren und Fettalkoholen aus den Chloroplasten der Tapetumzellen ist notwendig für den Aufbau von Exine und Pollenmantel. Dieser Transport wird vermutlich ebenfalls von ABC Transportern, genauer ABCG1, ABCG16, ABCG20 und ABCG26, ermöglicht. Eine Substratspezifität könnte durch die variable Dimerbildung der Transportereinheiten entstehen (Abb. 1, Li *et al.*, 2016, Wan *et al.*, 2020).

#### 1.4 Biologische „Lipid Bilayer“ Membranen

Die Bildung von Zellkompartimenten und die Unterteilung innerhalb der Organellen sind wichtig für die zelluläre Funktion und Fitness jedes eukaryotischen Organismus. Die Einteilung des zellulären Raums wird von einer komplexen intrazellulären Membranarchitektur bestimmt. Hierzu zählen beispielsweise die Tubulinstrukturen des ER, die *Cisternae* und *Stacks* des Golgi-Netzwerks, die Einstülpungen der inneren Mitochondrienmembran und das Thylakoidmembransystem der Chloroplasten. Biologische Membranen sind nicht nur Begrenzungen, sondern bieten auch Platz für membranständige Proteine, die dem Austausch von Substraten aber auch der Signalübertragung, dem Kontakt und der Kommunikation in der Zelle dienen (van Meer *et al.*, 2008; Bigay und Antonny 2012; Kozlov *et al.*, 2014). Der Lipidtransfer zwischen Organellen und somit Membranen kann vesikulär oder nicht vesikulär stattfinden. Die Biogenese mitochondrialer und plastidärer Membranen unterliegt meist den nicht-vesikulären Transportwegen (Hurlock *et al.*, 2014; Block und Jouhet, 2015; Michaud *et al.*, 2017). Dieser Transport erfordert eine enge Aneinanderlagerung zweier Membranen, um Membrankontaktstellen (MCSs, *Membrane*

*Contact Sites*), funktionelle Plattformen für den Lipidaustausch, zu bilden (Michaud und Jouhet, 2019). So wird beispielsweise angenommen, dass in Pflanzen der Lipidtransport vom ER zu den Plastiden über solche MCSs erfolgt (Hurlock *et al.*, 2014; Block und Jouhet, 2015; LaBrant *et al.*, 2018; Mueller-Schuessele und Michaud, 2018). Auch die Interaktion zwischen LDs und anderen Organellen wie Peroxisomen, Mitochondrien, Chloroplasten oder der Vakuole über MCSs wird bereits diskutiert (Michaud und Jouhet, 2019). Innerhalb mitochondrieller MCSs konnte der MTL-Komplex identifiziert werden (Michaud *et al.*, 2016 und 2017) und könnte den Kontakt zu Membranen anderer Organellen herstellen. Um darüber hinaus Prozesse wie Membranknospung, Tubulation, Spaltung und Fusion zu ermöglichen sind Membranen hoch dynamisch. So können Lokalisation, Aktivität und Signalübertragung von Membranständigen oder – assoziierten Proteinen direkt über Form und Komposition der Membran reguliert werden. Umgekehrt können auch Proteine, die Membrankrümmungen erkennen oder auslösen können, die Eigenschaften einer Membran verändern (Boucrot *et al.*, 2012; Peter *et al.*, 2004).

Im Allgemeinen enthalten amphiphile Membran-inserierende Motive einen hydrophilen Teil, der einem hydrophoben Teil gegenübersteht (Madsen und Herlo, 2017). In Proteinen werden amphiphile Motive durch  $\alpha$ -Helices repräsentiert. Amphiphile  $\alpha$ -Helices sind bekannt dafür Membranbindung, Membrandestabilisierung oder Membranbiegung zu initialisieren (Drin *et al.*, 2007). Eine Anheftung an die Membran ist durch hydrophobe Effekte und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativen Ladungen innerhalb von Lipidkopfgruppen der Lipidschicht und positiv geladenen Aminosäureresten der amphiphilen  $\alpha$ -Helix möglich (Drin *et al.*, 2007; Madsen und Herlo, 2017). Die Stärke dieser Interaktion entscheidet, ob  $\alpha$ -Helices bereits gekrümmte Membranen erkennen (*Membrane sensing*) oder wirklich aktiv biegen können (*Membrane bending*) (Gkeka und Sarkisov, 2010). Das Golgi-assoziierte Protein ArfGAP besitzt beispielsweise eine  $\alpha$ -Helix mit einer schwach geladenen, polaren Seite (mehrheitlich bestehend aus Serin und Threonin), die als *lipid packing sensor* (LPS) bezeichnet wird. Generell bilden ALPS (*ArfGAP1 lipid packing sensor*) Motive eine Familie Membran-assoziiierter Helices, die durch die Verteilung von Serin-, Glycin- und Threoninresten auf der polaren Seite bestimmt werden. Ein Zusammenhang mit der Bindung von ALPS Motiven und dem Grad der Membrankrümmung oder der Lipidkomposition konnte gezeigt werden (Bigay *et al.*, 2005; Drin *et al.*, 2007; Bigay und Antony 2012). Dadurch entsteht die Spezifität für gekrümmte gegenüber flachen Membranen für ArfGAP1 (Drin *et al.*, 2007). Weiterhin sorgt die Verteilung der polaren und hydrophoben Aminosäurereste entlang der  $\alpha$ -helikalen Achse für die Art und Weise der Integration amphiphiler Helices in die Membran, sodass eine Unterteilung in vier Typen vorgenommen werden konnte (Abb. 2).

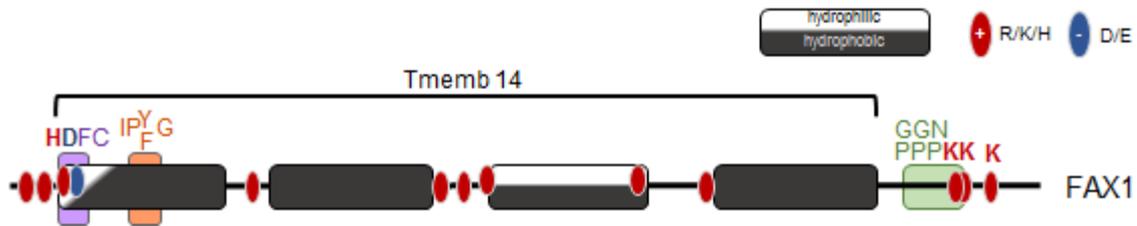


**Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus (A) und der Membran-Insertion (B) der vier Typen  $\alpha$ -helikaler, amphiphiler Helices.** Die Unterteilung nach Gkeka und Sarkisov (2010) erfolgt abhängig von Anzahl und Verteilung hydrophober Aminosäurereste entlang der Achse. Typ 1: Gleichmäßige Verteilung polarer (weiß) und hydrophober (grau) Reste entlang der vertikalen Helixachse. Die Oligomerisierung solcher Helices kann aufgrund der dominanten hydrophoben Reste zur Formation einer Pore in einer Membran führen. Typ 2: Polare und hydrophobe Seite gleich gewichtet oder polare Seite dominant. Typ 3: Konische Verteilung der hydrophoben Reste, vertikal geneigte Insertion. Typ 4: Mehrheitlich hydrophob mit polaren Gruppen am Anfang und Ende, inseriert als Transmembrandomäne. Könnel *et al.* (2019).

Die beiden ersten Typen legen eine gleichmäßige Ladungsverteilung entlang der Achse zu Grunde. Typ 1: Eine starke hydrophobe Seite führt zur vertikalen Integration in die Membran, meist Oligomerisierung und Bildung einer Wasser-gefüllten Pore. Solch eine Struktur wird beispielsweise für das Protein Translocon Tic110 in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten vorhergesagt (Balsera *et al.*, 2009; Kovács-Bogdán *et al.*, 2010). Typ 2: Ist die hydrophobe Seite gleich stark oder größer, integriert die Helix parallel zur Membranoberfläche der Lipidschicht und löst eine strenge, lokale Asymmetrie und eine resultierende Krümmung der Membran aus. Beispiele für Typ 2 Helices sind ALPS Motive (Drin *et al.*, 2007), die N-terminalen Helices von N-terminal Bin/Amphiphysin/Rvs (N-BAR) Endophiline (Gallop *et al.*, 2006; Masuda *et al.*, 2006; Kjaerulff *et al.*, 2011) oder Epsin N-terminal Homologie (ENTH) Proteine (Horvath *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2012; Putta *et al.*, 2016), aber auch Mic60 aus mitochondriellen IMs (Hessenberger *et al.*, 2017) oder *Curvature in Thylakoids 1* (CurT1) (Heinz *et al.*, 2016; Pribil *et al.*, 2014; Armbruster *et al.*, 2013) aus dem Thylakoidmembransystem im Chloroplasten. Typ 3 und Typ 4 kennzeichnet eine nicht gleichmäßige Ladungsverteilung. Typ 3: Die hydrophoben Reste verlaufen konisch oder zylindrisch entlang der Achse und führen so zu einer vertikal gekippten Integration. Beispiel hierfür wäre die amphiphile  $\alpha$ -Helix von Mic10 in der IM von Mitochondrien (Barbot *et al.*, 2015; Bohnert *et al.*, 2015). Typ 4: Hier sind die beiden Enden der Helix hydrophob, die Integration vertikal, was einer klassischen Transmembrandomäne entspricht. (Abb. 2, Könnel *et al.*, 2019; Kozlov *et al.*, 2014). Zusammengefasst sind membranständige Proteine mit amphiphilen  $\alpha$ -Helices beispielsweise in Mitochondrien (IM) oder im Plastiden (IE) nicht nur am Fettsäure/Lipid Transport beteiligt, sondern können auch eine Membran-formende/-biegende Funktion besitzen (Michaud und Jouhet 2019, Könnel *et al.*, 2019).

## 1.5 Die Familie der FAX-Proteine

Mit der Identifizierung membran-intrinsischer Proteine, die aktiv FA und/oder Lipide transportieren oder den interzellulären Transport ermöglichen, konnte erforscht werden, wie der Transport über die Hüllmembranen der Chloroplasten möglich wird (Li *et al.*, 2016; Li-Beisson *et al.*, 2017). Ein solches Protein ist *Arabidopsis thaliana* FAX1 (*Fatty Acid Export 1*). In *Arabidopsis* sind sieben FAX Proteine bekannt (Li *et al.*, 2015; Bugaeva *et al.*, 2021). FAX1 inseriert mittels vier  $\alpha$ -helikalen Membrandomänen in die Chloroplasten IE (Li *et al.*, 2015), wobei neueste Studien einen amphiphilen Charakter der ersten und dritten Helix postulieren (Abb. 3, Könnel *et al.*, 2019). Die mittels FAX1 exportierten plastidären FAs, könnten auf der zytosolischen Seite der äußeren Hüllmembran auf die acyl-CoA Synthetase LACS9 treffen, die dann ATP-abhängig FA-CoA Thioester in den Lipidmetabolismus einspeist und so das Prinzip der vektoriellen Acylierung antreibt (Li *et al.*, 2016; Li-Beisson *et al.*, 2017). Eine Interaktion von LACS9 und einem plastidären FAX-Protein konnte bereits gezeigt werden (Tian *et al.*, 2019) und lässt vermuten, dass die Bildung eines Komplexes zum Fettsäure-Export aus dem Chloroplasten nötig ist. Kürzlich konnte aufgrund des amphiphilen Charakters der dritten Helix (Abb. 3) und experimenteller Hinweise eine potenzielle Membran-biegende Funktion von FAX1 angenommen werden. Weiterhin könnten FAX Proteine eine mögliche Rolle in der Bildung von Membrankontaktstellen zwischen Chloroplast und ER einnehmen und so einem erleichterten Transport über die Membranen ermöglichen (Könnel *et al.*, 2019). In *Arabidopsis* zeigte sich, dass FAX1 von Bedeutung für die Produktion von Biomasse, die männliche Fertilität und die Verteilung von FA-basierten Komponenten, wie Lipiden, Wachsen oder Pollenzellwandmaterial, ist (Li *et al.*, 2015). Des Weiteren unterbricht der Funktionsverlust von FAX1 die zelluläre Fettsäure/Lipid-Homöostase, was die ROS-Homöostase (*Reactive Oxygen Species*) stört und die transkriptionelle Aktivierung des genetischen Netzwerkes während der Antherenentwicklung unterdrückt (Zhu *et al.*, 2020). Dies führt zu Defekten in der Tapetumentwicklung, Pollenzellwandbildung und somit zur männlichen Sterilität. Eine Samen-spezifische Überexpression führte zu mehr Öl und Protein Gehalt im Samen (Tian *et al.*, 2018). Zudem konnte FAX1 eine entscheidende Rolle während der Pollenkeimung zugeordnet werden (Bugaeva *et al.*, 2021). Mittels eines funktionellen Komplementationassays in Hefemutanten konnte gezeigt werden, dass At-FAX1 Fettsäure-Transport ermöglichen (Li *et al.*, 2015). Während FAX1, FAX2 und FAX3 in die IE von Chloroplasten inserieren (Li *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2019; Bugaeva *et al.*, 2021), konnte FAX4 ebenso in plastidären Membranen lokalisiert werden (Li *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). FAX5, FAX6 und FAX7 werden in Membranen des sekretorischen Weges vorhergesagt. Im Falle von FAX7 kann auch eine Lokalisation in Mitochondrien nicht ausgeschlossen werden (Li *et al.*, 2015). Alle FAX Proteine zeigen wie FAX1 (Li *et al.*, 2015) eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu den menschlichen mitochondrialen TMEM14A und C Proteinen und besitzen vier  $\alpha$ -Helices, die eine konservierte Domäne bilden (Tmemb\_14 Domäne, vgl. Abb. 3).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der konservierten Motive innerhalb der Tmemb\_14 Domäne des Proteins FAX1.** Gezeigt ist FAX1, inklusive der konservierten Tmemb\_14 Domäne (pfam PF03647), und C-Terminus. Die Tmemb\_14 Domäne besteht aus vier  $\alpha$ -Helices (Rechtecke) mit hydrophilen (weiß) und/oder hydrophoben (schwarz) Seiten. Die konservierte Verteilung positiv (R, K, H; rote Punkte) und negativ (D, E; blaue Punkte) geladener Aminosäuren. Konservierte Sequenzmotive werden durch farbige Boxen und der Konsensussequenz repräsentiert. Die Polypeptidketten (schwarze Linien) sind maßstabsgetreu wiedergegeben. Aminosäuren im Einbuchstabencode. Aus Bugaeva *et al.* (2021), verändert.

Weiterhin zeigen plastidär-lokalisierte FAX Proteine eine verlängerte und variable N-terminale Region, während FAX5, FAX6 und FAX7 nur aus der Tmemb\_14 Domäne bestehen und so am ähnlichsten den menschlichen TMEM14 Proteinen sind (Li *et al.*, 2015, Bugaeva *et al.*, 2021). Die plastidären Proteine FAX2 und FAX3 scheinen im vegetativen Stadium FAX1 teilweise ersetzen zu können, wobei hier vermutlich FAX3 eine wichtigere Rolle spielt. In *Arabidopsis fax1/fax3* Doppelmutanten führte der Verlust beider Proteine zu Defekten in der Samen- und/oder der Embryonalentwicklung. Des Weiteren war ein Verlust von FAX1 und FAX3 letal für Entwicklung/Wachstum von Keimlings- zu Rosettenstadium der Pflanzen (Bugaeva *et al.*, 2021). Während der Samenentwicklung in *Arabidopsis* war FAX2 stark exprimiert (Tian *et al.*, 2019). Ein Verlust von FAX2 führte zu einem geringeren Lipidgehalt im Samen und umgekehrt konnte eine Überexpression von FAX2 den Lipidgehalt um 30% im Samen steigern, weshalb Tian *et al.* (2019) eine wichtige Rolle von FAX2 im plastidären Fettsäure-Export und in der Bildung von Samenölen postulierten. Weiterhin konnte für FAX2 und ebenso FAX4 eine Rolle im Transport plastidärer Fettsäuren für die TAG Synthese während der Embryonalentwicklung im Samen gezeigt werden (Li *et al.*, 2020). Beide Transkripte waren während dieses Prozesses, genauer im „seed-filling“ Stadium, spezifisch angereichert. Der Verlust von FAX2 und FAX4 führte zu Defekten in der Entwicklung des Embryos und der Kotyledonen. Während in *fax2/fax4 knockout*-Mutanten ein reduzierter TAG-Gehalt, aber insgesamt ein höherer Anteil an plastidären Lipiden gezeigt werden konnte, konnte die Überexpression von FAX2 und FAX4 den TAG-Gehalt steigern. In Raps, *Brassica napus*, konnte FAX6 chloroplastidär lokalisiert werden und in Zusammenhang mit der Erhöhung des Linolsäurespiegels in den axillären Knospen gebracht werden (Huang *et al.*, 2021). So könnte FAX6 bei der Lipidbiosynthese und der Freisetzung der axillären Knospenfunktion mitwirken.

## 2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen zur späteren Struktur- und Funktionsanalyse die rekombinante Expression, sowie die Aufreinigung des bereits charakterisierten Proteines FAX1 (Li *et al.*, 2015) etabliert und optimiert werden. Zum anderen sollten die Proteine der FAX-Familie FAX4, FAX5, FAX6 und FAX7 funktionell und bezüglich ihrer Rolle im Fettsäure/Lipidhaushalt der Pflanze charakterisiert werden. Hierzu sollten vergleichende Sequenzanalysen durchgeführt werden, um Rückschlüsse auf die Verteilung innerhalb der pflanzlichen Evolution und Funktion dieser Proteine zu ziehen. Die Betrachtung der Rolle der FAX-Proteine innerhalb der pflanzlichen Entwicklung sollte über eine Charakterisierung und Phänotypisierung von RNAi-Linien und T-DNA-Insertionsmutanten in *Arabidopsis* erfolgen. Ebenso sollte die Lokalisation der Proteine adressiert werden. Analog zu Li *et al.* (2015) sollte, wie bereits für FAX1 gezeigt werden konnte, die Rolle der FAX-Proteine im Fettsäuretransport bestätigt werden. Zusammenfassend sollte so untersucht werden, welche Bedeutung die FAX-Proteine während der Entwicklung des pflanzlichen Organismus haben und ob innerhalb der Familie FAX-Proteine komplementär agieren können. Schlussfolgernd sollten neue Hypothesen zur Topologie und Funktion der FAX-Proteine postuliert werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, sowie deren Hersteller, sind in Tab. 1 dargestellt.

**Tab. 1: Verwendete Geräte, sowie deren Hersteller.**

Gerät	Hersteller
Autoklav DE-23	Systemec
Binokular	ASKMNIA Microscope Technik Rathenow
Brutschrank (INNOVENS)	Thermo Electron Corporation
DinoEye	ANMO Electronics Corporation
Feinwaage Ioniser	VWR
FluorChemQ	Biozym Scientific GmbH
Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-9000E	Keyence
Fluoreszenzmikroskop Typ SP5II	Leica
Forma Orbital Shaker	Thermo Electron Cooperation
Forma Orbital Shaker	Thermo Electron Corporation
French Press	SLM Aminco Instruments
French Pressure Cell Press	SLM Instruments Inc.
Heizblock	VWR
Heizblock Thriller	PEQLAB VWR Company
Heizplatte	IKAMAG RCT
Heizschrank	Memmert
Heizschrank Innovens	Thermo Electron Cooperation
Imager FluorChemQ	Proteinsimple
Inforce Multitron	Inforce
Kühlzentrifuge (5417R)	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Mischer RS-TR05	Phoenix Instrument
Multifuge 1 L-R	Heraeus
Multifuge 1 L-R	Heraeus
NanoDrop (infinite F200 Pro)	Tecan
Orbital Shaker-Incubator (ES-20)	BioSan
Orbitalschüttler KH 10/300	noctua
PCR Cycler advanced primus 96	PEQLAB VWR Company
PCR Cycler PEQStar	PEQLAB VWR Company
PCR Cycler T Gradient	Biometra
Percival CU 36L4	CLF Plant Climatics
Percival E41L2	CLF Plant Climatics
pH-Meter	SI Analytics
pH-Meter	HANNA instruments
Photometer (Novaspec)	LKB Biochrom

Photometer Spectrocord 50 plus	AnalytikJena
Photometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences
Schüttelinkubator	Inforce Ecotron
Schüttelinkubator	Inforce Multitron
Schüttelinkubator TH15	Edmund Bühler Labortechnik
SDS-Gel Kammersystem	Amersham Biosciences
Semi-Dry-Blot-Apparatur	PEQLAB VWR Comapny
Spannungsgerät E452	Consort
Spannungsgerät EV2310	Consort
Spannungsgerät PS500X	Hofer Scientific Instruments
Sterilbank Herasafe	Kendro Laboratory Products
Sterilbank LaminAir HB2448	Heraeus
Thermoblock Thermal Shake lite	VWR
Tischzentrifuge	Sigma
Tissuelyser II	Qiagen
Ultrazentrifuge Optima XPN-80	Beckmann Coulter
UV Tisch	Vilber Lourmat
Vortex Genie 2	Bender und Hobein AG
Vortex2	IKA
Waage BP 210 S	Sartorius
Waage BP 310 S	Sartorius
Waage TS 425i (42 g - 0.01 mg)	VWR
Wasserbad	GFL
Zentrifuge Sorvall RC6 Plus	Thermo Electron Cooperation
Zentrifuge Microfuge 20	Beckman Coulter

### 3.2 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien und Enzyme und deren Hersteller sind in Tab. 2 zusammengefasst.

**Tab. 2: Verwendete Chemikalien, sowie deren Hersteller.**

Chemikalie	Hersteller
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Carl Roth GmbH & Co. KG
5x HF Puffer (7,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	Biozym Scientific GmbH
10x Standard Taq Reaction Puffer (Mg-free)	New England Biolabs GmbH
10x RT Puffer	Promega
α-Linolensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Acetosyringone	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Acrylamid Xtra 30%	neoFroxx GmbH
Adenin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Agar-Agar (Kobe I und bakteriologisch)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agarose (LE)	Biozyme Scientific GmbH

Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ampicillin	Tokyo Chemical Industry/ Japan
Carbenicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Chloroform	Fisher Chemicals
CutSmart Puffer	New England Biolabs GmbH
D(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids	BD™ Thermo Fisher Scientific GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
dNTP-Mix	Fisher Chemicals
Ethanol (EtOH)	Biesterfeld Spezialchemie
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Grüssing GmbH
Glycerol	Fluka
Glycin	Merck
Isopropanol	Fisher Chemicals
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Luria-Bertani (LB)-Medium	Roth
L-Alanin	Merck
L-Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Asparagin	Serva
L-Aspartat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Cystein	Fluka
L-Glutamin	Merck
L-Glutamat	Merck
L-Histidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Leucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Methionin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Prolin	Merck
L-Serin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Threonin	Merck
L-Tryptophan	Merck
L-Tyrosin	Merck
L-Valin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
LC-H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Grüssing GmbH
Magnesiumchlorid-Lösung (25 mM)	New England Biolabs GmbH
Methanol	Fisher Chemicals
Murashige-Skoog-Medium (MS)	Serva
Myo-Inositol	Merck

Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhypochlorid 12 % (NaClO)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
n-Dodecyl $\beta$ -D maltoside (DDM)	ChemCruz
PEG3350 (40%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Rifampicin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Roti-Gel Stain Red	Carl Roth GmbH & Co. KG
SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG
SOC-Medium	AG Philippar
Sorbitol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Spectinomycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Temed	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tergitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trizma Base (TRIS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tryptone	Fluka Analytical
Tween 20 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Yeast Extract	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
Reverse Transkriptase (RT)	Promega
Ribonuklease (RNase)	Applichem
Taq-DNA-Polymerase (Taq-Polymerase)	Biochemie (Universität des Saarlandes)
Instant sticky-end Ligase (#MO370)	New England Biolabs GmbH
S7 Fusion Polymerase	Biozym Scientific GmbH
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH
BamHI-HF	New England Biolabs GmbH
EcoRI-HF	New England Biolabs GmbH
HindIII-HF	New England Biolabs GmbH
NcoI	New England Biolabs GmbH
NotI-HF	New England Biolabs GmbH
XhoI	New England Biolabs GmbH
XmaI	New England Biolabs GmbH
Sall	New England Biolabs GmbH

### 3.3 Kits

Die verwendeten Kits in dieser Arbeit und der Hersteller sind in Tab. 3 aufgeführt.

**Tab. 3: Verwendete Kits, sowie deren Hersteller.**

Kit	Hersteller
CloneJET PCR Cloning	ThermoFisher Scientific
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
mi-Gel Extraction	Metabion international AG
mi-Plasmid Miniprep	Metabion international AG
Mix2Seq	eurofins Genomics
NucleoSpin® DNA Gel und PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co KG
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel GmbH & Co KG
NucleoSpin® RNA Iso Plant and Fungi	Macherey-Nagel GmbH & Co KG
NucleoSpin® RNA Iso Plant	Macherey-Nagel GmbH & Co KG

### 3.4 Pflanzen

#### 3.4.1 *Arabidopsis thaliana*

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden Pflanzen verschiedener *Arabidopsis thaliana* Linien genutzt. Vergleichend diente der Wildtyp Ecotyp Columbia-0 (Col-0). Als Mutationslinien wurden Geschwisterlinien der jeweiligen T-DNA-Insertionslinien verwendet, die in Tab. 4 aufgeführt sind. Alle genannten Linien sind T-DNA-Insertionslinien aus dem *European Arabidopsis Stock Centre* (NASC) in Nottingham.

**Tab. 4: Verwendete T-DNA Insertionslinien.** Dargestellt sind die T-DNA. Insertionslinien, ihre Originalbezeichnung, Hersteller und daraus resultierende Geschwisterlinien.

Insertionslinie	Bezeichnung (Original)	Hersteller	Geschwisterlinien
<i>fax4-1</i>	SAIL_788_B10	SAIL Linie Syngenta	#1 und #3
<i>fax4-2</i>	SAIL_1176_C06	SAIL Linie Syngenta	#6 und #18
<i>fax4-3</i>	GK-930E07	GABI Linie GABIKat	#2, #3, #11 und #12
<i>fax5-1</i>	SALK 202443	SALK Linie	#4 und #13
<i>fax6-1</i>	GK-138G06	GABI Linie GABIKat	#2
<i>fax7-2</i>	GK-863F12	GABI Linie GABIKat	#3, #4 und #5

Als *fax4* Mutationslinien wurden weiterhin die in Col-0 durch ein *FAX4* cDNA Fragment im RNAi Vektor pH7GWIWG2 (Anhang Abb. 57) generierten *fax4* RNAi Linien verwendet, die von Wassilina Bugaeva innerhalb der AG Philippar erstellt wurden. Samen der F1 Pflanzen wurden in dieser Arbeit mittels Hygromycin (MS-Platten) selektiert und resistente Pflanzen auf Erde pikiert und vermehrt. Daraus entstanden die *FAX4*-RNAi Linien #1- #7, die in der F2 und F3 für Analysen verwendet wurden.

Eine detaillierte Übersicht der verwendeten Linien, deren Generation und Genotyp der Mutterpflanzen, sowie Experimenten, in denen sie verwendet wurden ist in Tab. 5 dargestellt.

**Tab. 5: Detailliert Übersicht der verwendeten Mutationslinien.** RNAi-Linien, T-DNA-Insertionslinien, Genotyp der Mutterpflanze, verwendete Generation und zugehörige Experimente.

T-DNA Insertionslinie/Genotyp Mutterpflanze	Generation	Experiment
<i>fax5/6</i> #14 (he/ho)	F3	Segregation
<i>fax5/6</i> #14 (ho/he)	F3	Segregation
<i>fax5/6</i> #14 (he/wt)	F3	Segregation
<i>fax5/6</i> #14 (wt/he)	F3	Segregation
<i>fax7-2</i> #3 (he)	T3	Segregation
<i>fax7-3</i> #5 (he)	T3	Segregation
<i>fax4-3</i> #11 (he)	T3	Segregation
<i>fax4-3</i> #12 (he)	T3	Segregation
<i>fax4-3</i> #3 (he)	T3	Segregation
<i>fax5/6</i> #14 (he/ho)	F3	qRT-PCR
<i>fax5/6</i> #14 (ho/he)	F3	qRT-PCR
<i>fax5/6</i> #30 (wt/wt)	F3	qRT-PCR
<i>fax5-1</i> #4 (ho)	T4	qRT-PCR
<i>fax6-1</i> #2 (ho)	T4	qRT-PCR
<i>fax4-3</i> #2 (ho)	T4	qRT-PCR
Col-0 (als wt)	-	qRT-PCR
<i>fax7-2</i> #4 (ho)	T4	qRT-PCR
<i>fax7-2</i> #3 (wt)	T4	qRT-PCR
<i>fax5/6</i> #14 (he/ho)	F3	Phänotypisierung
<i>fax5/6</i> #14 (ho/he)	F3	Phänotypisierung
<i>fax5-1</i> #4 (ho)	T4	Phänotypisierung
<i>fax6-1</i> #2 (ho)	T4	Phänotypisierung
<i>fax4-3</i> #2 (ho)	T4	Phänotypisierung
<i>fax4-3</i> #3 (wt)	T4	Phänotypisierung
<i>fax7-2</i> #4 (ho)	T4	Phänotypisierung
<i>fax7-2</i> #3 (wt)	T4	Phänotypisierung
<i>fax5/6</i> #14 (he/ho)	F3	Lipidanalytik
<i>fax5/6</i> #14 (ho/he)	F3	Lipidanalytik
<i>fax5/6</i> #30 (wt/wt)	F3	Lipidanalytik
<i>fax5-1</i> #4 (ho)	T4	Lipidanalytik
<i>fax6-1</i> #2 (ho)	T4	Lipidanalytik
Col-0	-	Lipidanalytik
FAX4-RNAi #1-#7	F2 oder F3	Phänotypisierung, qRT

### 3.4.2 *Nicotiana benthamiana*

Zur transienten Transformation in Tabak wurden ausschließlich *Nicotiana benthamiana* verwendet.

## 3.5 Bakterienstämme

### 3.5.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformation von Tabak mittels Infiltration wurden bereits kompetente Bakterienzellen des AGL1 Stammes (Resistenzplasmid tragend, Carbenicillin) eingesetzt. Dieser Stamm trägt eine chromosomale Rifampicin-Resistenz. Um eine erfolgreiche transiente Transformation durchzuführen, wurden zusätzlich noch Zellen des GV3101 Bakterienstamms (p19, Helferplasmid tragend, Resistenz für Rifampicin, Carbenicillin, Kanamycin) verwendet (Voinnet *et al.*, 2003).

### 3.5.2 *Escherichia coli*

Alle in dieser Arbeit erstellten Vektorkonstrukte, sowie deren Resistenzen und Verwendungszwecke sind in Tab. 6 aufgeführt. Zur Lagerung bei -80°C und Replikation wurden sie jeweils in *E. coli* Stämme transformiert. Die Klonierung der Gensequenzen erfolgt mittels Restriktion und Ligation.

**Tab. 6: Auflistung der erstellten oder verwendeten Vektorkonstrukte.** Bezeichnung, kloniertes Konstrukt, Vektor, zugehörige Antibiotikaresistenz, transformierter *E. coli*-Stamm und Verwendungszweck.

Bezeichnung	Konstrukt	Vektor	Resistenz	Bakterienstamm	Bemerkung/Verwendungszweck
1080	At-FAX4	pENTR	Kanamycin	TOP10	GFP-Analysen
1081	At-FAX5	pENTR	Kanamycin	TOP10	GFP-Analysen
1082	At-FAX6	pENTR	Kanamycin	TOP10	GFP-Analysen
1083	At-FAX7	pENTR	Kanamycin	TOP10	GFP-Analysen
1188	At-FAX1	pB7YWG2	Spectinomycin	TOP10	GFP-Analysen/C-terminales YFP
1089	At-FAX4	pK7FWG2	Spectinomycin	TOP10	GFP-Analysen/C-terminales GFP
1123	At-FAX5	pK7FWG2	Spectinomycin	TOP10	GFP-Analysen/C-terminales GFP
1124	At-FAX6	pK7FWG2	Spectinomycin	Mach1	GFP-Analysen/C-terminales GFP
1125	At-FAX7	pK7WGF2	Spectinomycin	Mach1	GFP-Analysen/N-terminales GFP
1310	At-FAX5	pK7WGF2	Spectinomycin	DB3.1	GFP-Analysen/N-terminales GFP
1311	At-FAX6	pK7WGF2	Spectinomycin	DB3.1	GFP-Analysen/N-terminales GFP
1098	At-FAX7	pK7FWG2	Spectinomycin	Mach1	GFP-Analysen/C-terminales GFP
1120	TPR7	pK7WGF2	Spectinomycin	TOP10	GFP-Analysen/N-terminales GFP
1158	OM64	pK7WGF2	Spectinomycin	TOP10	GFP-Analysen/N-terminales GFP
1182	FAX4-RNAi	pENTR	Kanamycin	TOP10	Klonierung RNAi Konstrukt
1187	FAX4-RNAi	pH7GWIWG2 (I)	Spectinomycin	TOP10	Stabile Transformation in <i>Arabidopsis</i>
251	Leervektor	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
253	IRT1	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
254	PIC1 fl	pDR195	Ampicillin	JM109	funktioneller Transportassay

1234	FAX4 mit TP	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1235	FAX6	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1236	FAX6	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1237	SUC-FAX6	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1238	SUC-FAX1	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1239	SUC-FAX2	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1240	SUC-FAX3	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1241	mat-FAX2	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1242	mat-FAX3	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1277	FAX7	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1324	FAX5	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1330	ycf1	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1331	ycf2	pDR195	Ampicillin	TOP10	funktioneller Transportassay
1264	Leervektor	pBadMycHisA	Ampicillin	TOP10	Expression in <i>E. coli</i>
1280	FAX1	pBadMycHisA	Ampicillin	TOP10	Expression in <i>E. coli</i>
1281	FAX7	pBadMycHisA	Ampicillin	TOP10	Expression in <i>E. coli</i>
1282	FAX5	pBadMycHisA	Ampicillin	TOP10	Expression in <i>E. coli</i>
1294	FAX1	pBadMycHisA	Ampicillin	BL21	Expression in <i>E. coli</i>
1303	FAX2	pBadMycHisA	Ampicillin	C43DE3	Expression in <i>E. coli</i>
1304	FAX2	pBadMycHisA	Ampicillin	BL21	Expression in <i>E. coli</i>
1328	FAX5/pGEM4	pGEM4	Ampicillin	TOP10	in vitro Importstudien
1329	FAX7/pGEM4	pGEM4	Ampicillin	TOP10	in vitro Importstudien
1332	Leervektor	pGEM4	Ampicillin	TOP10	in vitro Importstudien
1333	FAX4/pGEM4	pGEM4	Ampicillin	TOP10	in vitro Importstudien
1334	FAX6/pGEM4	pGEM4	Ampicillin	TOP10	in vitro Importstudien
1335	FAX6/pGEM4	pGEM4	Ampicillin	TOP10	in vitro Importstudien
1262	Leervektor	pPICZA GFP	Zeocin	TOP10	Expressionsassay in Hefe
1278	FAX5	pPICZA-GFP	Zeocin	TOP10	Expressionsassay in Hefe
1279	FAX7	pPICZA-GFP	Zeocin	TOP10	Expressionsassay in Hefe

### 3.6 Hefestämme

Für Funktionsanalysen mittels Hefeassays (Drop-Dilution-Test) und Expressionsscreening wurden ebenfalls die unter Tab. 7 aufgelisteten Hefestämme verwendet.

**Tab. 7: Liste der verwendeten Hefestämme. Bezeichnung, Konstrukt, Vektor und Erläuterungen.**

Bezeichnung	Konstrukt	Vektor	Bemerkung
1104	wt-EUS		Hefe wt-EUS BY4741 Y00000,Euroscarf
1105	delta fat1-EUS		Hefe delta fat1-EUS YBR041w Y03178,Euroscarf
1146	LS 2020		Hefe YB 332 delta fat1 Mutante
1147	LS 1849		Hefe YB 525 delta faa1/faa4 Mutante
-	GS115		WT Stamm Hefe, Labor Prof. Dr. Joanne Lemieux
-	mPEMT	pPICZA-GFP	positive Kontrolle, WT GS115, Labor Prof. Dr. Joanne Lemieux

### 3.7 Oligonukleotidprimer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer, deren Sequenz und Verwendungszweck sind in Tab. 8 aufgelistet.

**Tab. 8: Verwendete Oligonukleotidprimer. Zugehörige Sequenz, sowie wissenschaftliche Verwendung in dieser Arbeit.**

Name	Sequenz	Verwendung
FAX4LP	5'-GAGTTTCGTTGTATAGGAGATTCTGC-3'	Genotypisierung, genom. Sequenz
FAX4RP	5'-GAAGACTAAACGAGGTAATGGTCTCTG-3'	Genotypisierung, genom. Sequenz
GabiLBseq	5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'	Genotypisierung, T-DNA Linie fax4-3
LB1SAIL	5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3'	Genotypisierung, T-DNA Linie fax4-1 und fax4-2
FAX5 LP2	5'-AAGAAGAAGACATCGTTACTCGC-3'	Genotypisierung, genom. Sequenz
FAX5 RP2	5'-GGTAACAATAACCACAATCCACA-3'	Genotypisierung, genom. Sequenz
LBKp0	5'-CGATTTCCGAACCACCATCAAACAGG-3'	Genotypisierung, T-DNA Linie fax5-1
FAX6LP	5'-CAATTAGGCCACAAAAATGATGGACCG-3'	Genotypisierung, genom. Sequenz
FAX6RP	5'-CACATCTTGTAATTGAAAGTCTTCCC-3'	Genotypisierung, genom. Sequenz
GabiLBseq	5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'	Genotypisierung, T-DNA Linie fax6-1
FAX7-2LP	5'-ATGATTTTCGTTGACTTGATCTAGTT-3'	Genotypisierung, genom. Sequenz
FAX7-2RP	5'-CAACGCATTACATGTTACATGTTAG-3'	Genotypisierung, genom. Sequenz
GabiLBseq	5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'	Genotypisierung, T-DNA Linie fax7-2
AtAct2 fw	5'-CTCCTGAAGAGCACCC-3'	PCR Aktin, genom. Sequenz
AtAct2 rev	5'-TCAGTAAGGTCACGTCCA-3'	PCR Aktin, genom. Sequenz
AtAct2/8 fw	5'-GGTGATGGTGTGTCT-3'	PCR Aktin, genom. Sequenz, qRT-PCR
AtAct2/8 rev	5'-ACTGAGCACAATGTTAC-3'	PCR Aktin, genom. Sequenz, qRT-PCR
FAX1 LCfw	5'-CCTATGATTCGTCCCCAG-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX1 LCrev	5'-CACTCACAACGAGACCA-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX2 LC E2 fw	5'-AAGCGAAAAGTGGTTAGTGA-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX2 LC E5 rev	5'-AGGAACGTCGATTTCTG-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX3 LC-CT fw	5'-TTCTCGTCGGAGTTGG-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX3 LC-CT rev	5'-GAGTGTTTGCTACTGCTT-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX4 LC-CT fw	5'-TAGGAGGCGGTCTCTT-3'	qRT-PCR, cDNA

FAX4 LC-CT rev	5'-CAACCTCATGCTCTCATC-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX4LC-NT fw	5'-TCTATAACCCAATCCAAACCG-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX4LC-NT rev	5'-GCCTCCTAGAAGAAGTACAC-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX5LCfw	5'-GGAAGTATTGCATCTCTCG-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX5LCrev	5'-ATCCATATACCTTATTTCAACAGT-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX6LCfw	5'-GGGATGCTTCTCATCGG-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX6LCrev	5'-CCACCAGTAGCGATCT-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX7LCfw	5'-TCATCTTTGTGCGCAGAGGT-3'	qRT-PCR, cDNA
FAX7LCrev	5'-CTTGAGCGAATGAGGC-3'	qRT-PCR, cDNA
XhoI-FAX4 fw+start	5'-TATACTCGAGATGTGGTCTCTTTCGCTAACGTTACC-3'	Klonierung in Hefevektor pDR195
BamHI-FAX4 rev +stop	5'-ATAGGATCCCTAAGGTAGAGGTAAGGGTCGGGTATGG-3'	Klonierung in Hefevektor pDR195
XhoI SUC2fw	5'-TATACTCGAGATGATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCTTTTGG-3'	Klonierung in Hefevektor pDR195
Xholfax5 fw (+start)	5'-TATACTCGAGATGCACGATTTCTGCTTCACTATCCC-3'	Klonierung in Hefevektor pDR195
NotI fax5 rev (+stop)	5'-CATAACCACCGAAAGCTGAATGAGCGCCGCATA-3'	Klonierung in Hefevektor pDR195
XhoI +start Fax6 fw	5'-TATACTCGAGATGCATGATTTTTGCTTCACTATCCC-3'	Klonierung in Hefevektor pDR195
BamHI Fax6 +stop rev	5'-TATGGATCCTCATTAGCTTTTGTGCGAAATTATTG-3'	Klonierung in Hefevektor pDR195
Xholfax7 fw (+start)	5'-TATACTCGAGATGGACTCATCTTTGTGCGCAGAAGTTCAC-3'	Klonierung in Hefevektor pDR195
BamHIfax7 rev (+stop)	5'-GGCCTCATTGCTCAAGTTGAGGATCCATA-3'	Klonierung in Hefevektor pDR195
At-FAX4 fw (cacc)	5'-CACCATGTGGTCTCTTTCGCTAACGTTAC-3'	Colony-PCR, qRT-PCR
At-FAX4 rev (-stop)	5'-AGGTAGAGGTAAGGGTCGGGTATGG-3'	Colony-PCR, qRT-PCR
At-FAX5 fw (cacc)	5'-CACCATGCACGATTTCTGCTTCACTATCC-3'	Colony-PCR
At-FAX5 rev (-stop)	5'-TTCAGCTTTTCGGTGGTATGTGGTTGCC-3'	Colony-PCR
At-FAX6 fw (cacc)	5'-CACCATGCATGATTTTTGCTTCACTATCC-3'	Colony-PCR
At-FAX6 rev (-stop)	5'-TTCAGCTTTTGTGCGAAATTTATTGCC-3'	Colony-PCR
At-FAX7 fw (caac)	5'-CACCATGGAATACTTTGTGCGCAGAAG-3'	Colony-PCR
At-FAX7 rev (-stop)	5'-ACTTGAGCGAATGAGGCCGTGCAAG-3'	Colony-PCR
attB1	5'-ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'	Sequenzierung
attB2	5'-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'	Sequenzierung
GFP GW fw	5'-TGCTGCTGCCCCGACAACC-3'	Sequenzierung
GFP GW rev	5'-CGGTGGTGCAGATGAACCTCAG-3'	Sequenzierung
oligo dT	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3' [3' WOBBLE: V=G/C/A; N=G/A/T/C]	RT-PCR
AtTPR7 fw	5'-ATGAGGCCTGAAGATTTGAAACAAGC-3'	Colony-PCR
AtTPR7 rev	5'-AACCTTCCTTTATGCACTCTTCATGC-3'	Colony-PCR
AtOM64 fw	5'-GGCCAATATGTCGCTTCAAATGTACC-3'	Colony-PCR
AtOM64 rev	5'-CAACTGTGGGGATTACCAGAATTCC-3'	Colony-PCR
35s fw	5'- GATGTGATATCTCCACTGACGTAAGG-3'	Genotypisierung RNAi Linie
FAX4-RNAi rev	5'- ATATACGCCATGACAAAGAAGGAC-3'	Genotypisierung RNAi Linie

fax5seq fw	5'-ATCGTACTCGCTACTCTTCTCG-3'	Sequenzierung
fax5seq rev	5'-GCTTTCGAGAAGAAGAAGACATC-3'	Sequenzierung
fax7seq fw	5'-TTGTTCTATTATGTATACACGGAGC-3'	Sequenzierung
fax7seq rev	5'-CCAGGAAATCCAGTCTTAGCAT-3'	Sequenzierung
GWGFP fw	5'-TGCTGCTGCCCGACAACC-3'	Sequenzierung
GWGFP rev	5'-CGGTGGTGCAGATGAACCTCAG-3'	Sequenzierung
M13 fw	5'-ACTGGCCGTCGTTTTACA-3'	Sequenzierung
pJET1.2 rev	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'	Sequenzierung
EcoRI +start FAX5 fw	5'-TATAGAATTCATGCACGATTTCTGCTTCACTATCC-3'	Klonierung in PICZA-GFP
XhoI -stop FAX5 rev	5'-TATCTCGAGTTCAGCTTTCCGGTGGTATGTGG-3'	Klonierung in PICZA-GFP
NcoI mAt-FAX1 fw pBad	5'-TATACCATGGCGTCTTTGTAGTTAAAAGTGTGATGG-3'	Klonierung in pBadMycHisA
HindIII -stop FAX1 pBad	5'-TATAAGCTTGTATGAAGGACTAGTCHCAGATGG-3'	Klonierung in pBadMycHisA
NcoI FAX7 fw pBad	5'-TATACCATGGACTCATCTTTGTCGCAGAAGTTC-3'	Klonierung in pBadMycHisA
HindIII -stop FAX7 pBad	5'-TATAAGCTTACTTGAGCGAATGAGGCCGTGC-3'	Klonierung in pBadMycHisA
XmaI-FAX4-for	5'-TATACCCGGGACCATGTGGTCTCTTGCGC-3'	Klonierung in pGEM4
Sall-FAX4-rev	5'-TAT GTCGACCTAAGGTAGAGGTAAGGGTCGG-3'	Klonierung in pGEM4
XmaI-FAX5-for	5'-TATACCCGGGACCATGCACGATTTTC-3'	Klonierung in pGEM4
Sall-FAX5-rev	5'-TATGTCGACTCATTGAGCTTTCCGGTGG-3'	Klonierung in pGEM4
XmaI-FAX6-for	5'-TATACCCGGGACCATGCATGATTTTTGCTTAC-3'	Klonierung in pGEM4
Sall-FAX6-rev	5'-TATGTCGACTCATTGAGCTTTTCTGGAATTTATTG-3'	Klonierung in pGEM4
XmaI-FAX7-for	5'-TATACCCGGGACCATGGACTCATCTTTGTCG-3'	Klonierung in pGEM4
Sall-FAX7-rev	5'-TATGTCGACTCAACTTGAGCGAATGAGG-3'	Klonierung in pGEM4

### 3.8 Größenstandard

Um die ermittelten DNA-Fragmentgrößen bei der Agarose-Gelelektrophorese bestimmen zu können, wurde der EasyLadder I und der 1 kbp Ladder von der Firma Bioline als Größenstandard verwendet. Für die SDS-Page wurde der RotiMark-Tricolor Prestained Protein Ladder Marker oder FroggaBio BLUelf Prestained Protein Ladder Marker verwendet.

### 3.9 Anzuchtbedingungen von *Arabidopsis thaliana*

Alle Versuchspflanzen wuchsen unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht 21 °C/ 8h Dunkelheit 16 °C). Dabei herrschte konsequent eine Luftfeuchtigkeit von 70 % und die Photonenstromdichte lag bei  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 3.10 Sterilisation von *Arabidopsis thaliana* Samen

Zur Sterilisation der Samen wurden diese zunächst in Filterpapier eingefaltet und dieses mit einer Klammer verschlossen. Anschließend wurde das Filterpapier mit den Samen für 1 min in 70 % EtOH, 1 min in 6 % NaClO, 0,005 % Tween 20 und abschließend dreimal 1 min in sterilem Wasser gewaschen. Nachdem das Filterpapier leicht abgetrocknet wurde, wurden die einzelnen Samen mit einem sterilen Holzzahnstocher aufgenommen und auf MS

Nährmedium Platten gelegt. Die steril verschlossene Platte wurde danach über Nacht, unter Ausschluss von Licht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wuchsen die Pflanzen in einem Pflanzenaufzuchtschrank von Percival Scientific unter Langtag-Bedingungen.

### **3.11 Sterile Anzucht auf Nährmedium-Platten**

Die Pflanzensamen wurden steril auf MS-Nährmedium Platten (0,5 % MS, 0,05 % MES, 1 % Saccharose, 0,6 % Agar-Agar bei pH 5,8) ausgesät. Nach der Aussaat wurden die Platten über Nacht bei Dunkelheit und 4 °C inkubiert und danach im Pflanzenaufzuchtschrank (Percival Scientific) bei 16 h Licht/ 8 h Dunkelheit, 76 % Lichtintensität und 21 °C/ 16°C für vier Wochen angezogen. Anschließend erfolgte das Umpikieren auf Erde oder DNA/RNA Analysen der Keimlinge.

### **3.12 Anzucht auf Erde von *Arabidopsis thaliana***

Zunächst wurde ein 1:3 Gemisch aus Vermiculite und Pflanzenerde („Potground H“, Klasmann-Deilmann GmbH) in Plastiktöpfe (ca. 7 x 7 cm) gefüllt, leicht festgedrückt, genässt und anschließend mit je 1-2 Samen in einen Topf gelegt. Danach wurden alle Töpfe mit Frischhaltefolie abgedeckt und über Nacht, bei 4 °C unter Lichtausschluss, gelagert. Anschließend wuchsen die Pflanzen in einem Pflanzenaufzuchtschrank von Percival Scientific unter Langtag-Bedingungen. Die Frischhaltefolie wurde nach ca. 5 Tagen entfernt (nach Entfaltung der Keimblätter). Wurden die Pflanzen nicht für Analysen verwendet, erfolgte nach ca. 5-6 Wochen ein Umzug in einen Abreiferaum mit Dauerlicht. Hier wurden die Pflanzen nach Schotenreife eingetütet und abreifen lassen, um anschließend die Samen zu ernten.

### **3.13 Keimungsanalyse auf MS-Platte**

Nach der sterilen Aussaat wurden die Pflanzen ab dem ersten Lichttag jeden Tag (Montag – Freitag) zur selben Uhrzeit darauf untersucht, ob bereits Entwicklungsstadien, wie die Keimung, Entfaltung der Kotyledonen und der ersten Blätter passiert wurden. Hatte eine Pflanze ein Stadium erreicht, wurde dokumentiert an welchem Lichttag dies der Fall war.

### **3.14 Phänotypisierung auf Erde**

Alle Pflanzen wurden wöchentlich fotografisch dokumentiert. Hierbei wurden beispielsweise der maximale Rosettendurchmesser gemessen (mittels Schieblehre) und die entfalteten Rosettenblätter gezählt. Zusätzlich wurde der Tag der Knospung (= Primärspross > 0.5 cm), der Tag der ersten Blüte und der Tag an dem die Pflanze eine Gesamthöhe von 15 cm erreicht hat notiert. Abschließend wurden die ausgewachsenen Pflanzen noch auf ihre Gesamthöhe, den Durchmesser des Primärtriebes (in ca. 8 cm Höhe) und auf die Anzahl der Sekundärtriebe untersucht. Nicht in allen Fällen wurden alle beschriebenen Daten erhoben.

### **3.15 Kreuzung von *Arabidopsis* Einzelmutanten**

Zur Herstellung von *Arabidopsis*-FAX Doppelmutanten wurden die homozygoten Einzelmutanten, *fax5-1* (*fax5* ho/ho, Linie #4 und #13), *fax6-1* (*fax6* ho/ho, Linie #2) und

*fax7-2* (*fax7 ho/ho*, Linie #4) unter Standardbedingungen auf Erde angezogen. Alle Pflanzen gehörten der T4 Generation an. Nach Ausbildung der Infloreszenzen (nach ca. 5-6 Wochen) und Genotypisierung mittels PCR der Pflanzen, wurden entsprechende Pflanzen zur Kreuzung ausgewählt. Hierzu wurden Blütenstände von bereits geöffneten Blüten befreit. Von ausgewählten, geschlossenen Blüten wurde die Narbe (weiblich) freipräpariert. Alle anderen Blüten wurden ebenso entfernt. Anschließend wurde die Narbe mit Pollen (männlich) der anderen zu kreuzenden Pflanze per Hand bestäubt. Um Fremdbestäubung zu vermeiden, wurden diese Pflanzen separat gelagert. Nach Schotenentwicklung wurden die gekreuzten Schoten einzeln eingetütet und geerntet.

### 3.16 Segregations- und Samenentwicklungsanalysen von *Arabidopsis*-Mutanten

Da innerhalb der F2 Nachkommen von *fax5/fax6* Doppelmutanten wenige homozygote *fax5/6* Mutanten (*fax5/6 dm\_ho/ho*) identifiziert werden konnten, wurden Geschwisterlinien, eine mit *fax5-1* heterozygotem und *fax6-1* homozygotem Genotyp (*fax5/6 dm\_he/ho*, Linie #14\_1A) und eine mit *fax5-1* homozygotem und *fax6-1* heterozygotem Genotyp (*fax5/6 dm\_ho/he*, Linie#14\_13B) für weitere Analysen in F3 verwendet. Ebenso wurden die dazugehörigen heterozygoten Einzelmutanten *fax5-1* (*fax5 he/wt*, *fax6 wt/wt*, Linie #14\_5) und *fax6-1* (*fax5 wt/wt*, *fax6 he/wt*, Linie #14\_13A), sowie die heterozygote *fax4-3* Einzelmutante (*fax4 he/wt*, Linie #3, und Linien #11 und #12) und die heterozygote Einzelmutante *fax7-2* (*fax7 he/wt*, Linie #3 und #5) untersucht. Für Segregationanalysen wurden wiederholt Samen auf Agarplatten (20 Stück) angezogen und nach 3 Wochen die Keimungsrate bestimmt. Weiterhin wurde der Pflanzenphänotyp fotografisch festgehalten und die Keimlinge zur DNA Isolation und anschließender PCR-Genotypisierung verwendet. Daraus erfolgte eine Statistik über Verteilung der Nachkommens-Genotypen innerhalb der Linien.

### 3.17 Lipidextraktion mittels „Boiling-Water Protocol“ zur Massenspektrometrie

Um Unterschiede in Lipidgehalt und –zusammensetzung zu untersuchen, wurde aus den Pflanzen mittels „Boiling-Water Protocol“ (AG Dörmann, Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen (IMBIO), Universität Bonn, Germany) der Gesamtlipidanteil extrahiert. Hierzu wurden 1-2 Rosettenblätter (ca. 100-200mg), im Alter von 4 Wochen (2h Licht am Erntetag), verwendet. Das Frischgewicht wurde nicht bestimmt. Nach dem Abtrennen der Blätter erfolgten die Arbeitsschritte möglichst schnell, um Phospholipase D Aktivität zu minimieren. Das Material wurde in kleinen Erlenmeyerkolben mit kochendem Wasser, mit Alufolie abgedeckt, im Wasserbad für 20 min gekockt (Lipaseaktivität wird inhibiert). Anschließend wurde das Material in Glasröhrchen (12x10mm) überführt. Zum Verschließen wurden hier ausschließlich Deckel mit Teflonbeschichtung verwendet. Zuerst wurden organische Lipide mit 1ml CHCl<sub>3</sub>:MeOH 1:2 extrahiert. Nach vorsichtigem vortexen wurden die Lipidextrakte vollständig in frische Röhrchen überführt (keine Phasenbildung). Die zweite Extraktion erfolgte analog mit 1ml CHCl<sub>3</sub>:MeOH 2:1. Um möglichst alle Lipide (Blatt sollte weiß sein) zu isolieren wurde als letztes ein Schritt mit 1ml CHCl<sub>3</sub> angefügt. Die Extrakte wurden vereinigt. Zu den Extrakten wurde 0,75ml NH<sub>4</sub>OAc (CHCl<sub>3</sub>:MeOH: NH<sub>4</sub>OAc

2:1:0,75) hinzugegeben, gevortext, für 15min zentrifugiert und die untere Phase (Lipidphase) in ein frisches Röhrchen überführt. Die Proben wurden anschließend zur Analyse nach Bonn zur AG Dörmann versendet. Zur späteren Auswertung wurde das Trockengewicht des Blattmaterials nach Trocknung im Trockenschrank (mind. 3 Tage) bestimmt.

### **3.18 Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana***

Zur Isolierung von genomischer DNA wurde Pflanzenmaterial (vier Wochen alte Keimlinge oder ein Rosettenblatt (ca. 50-100 mg) mit 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 0,5 % SDS und H<sub>2</sub>O) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß versetzt und mit Hilfe eines Metallbeads (Tungsten) im Tissuelyser (Qiagen) für insgesamt sechs Minuten bei 30/sec homogenisiert. Anschließend wurde das gewonnene Lysat zentrifugiert (10 min/ 13000 rpm) und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 300 µl Isopropanol (-20 °C), mindestens fünfminütiger Inkubation auf Eis und erneutem zentrifugieren (10 min/13000 rpm) wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet mit 300 µl Ethanol (70 %, -20 °C) gewaschen (10 min/13000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 37 °C (Trockenschrank) getrocknet. Abschließend wurde die isolierte DNA in 50 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **3.19 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)**

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Vervielfältigung eines genau definierten Teils eines DNA-Strangs (*Amplicon*). Dadurch sind der Nachweis und die Amplifikation von DNA-Fragmenten (z. B. Genen) aus genomischer oder auch komplementärer DNA (cDNA) möglich. Pro PCR-Reaktion (25 µl Ansatz) wurden 2,5 µl 10x Standard Taq Reaction Puffer (Mg<sup>2+</sup>-frei), 2,5 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung (25 mM), 0,5 µl dNTP's, jeweils 0,5 µl der spezifischen Primer (*forward/reverse*), 0,2 µl Taq-Polymerase, LC-H<sub>2</sub>O (bis 20 µl) und DNA-Template (0,1 µl – 5 µl) eingesetzt. Als Template dienten dabei sowohl genomische DNA, cDNA als auch Zellen aus einer Bakterienkolonie (Kolonie-PCR). Genutzt wurde das Standard-PCR Programm (Tab. 9). Es änderten sich abhängig vom durchgeführten Experiment die anfängliche Denaturierungszeit, die Annealing-Temperatur (Primer-spezifisch) und die Elongationszeit.

**Tab. 9: Standard-PCR-Programm.**

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Denaturierung	96	180 - 600
Denaturierung	96	45
Annealing	50 – 60	45 - 90
Elongation	72	60 - 90
Elongation	72	180
Ende	4	∞

} x 35

### 3.20 Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden 0,75 %-ige, 1 %-ige, 1,5 %-ige und 2 %-ige Gele in 1x TAE-Puffer (2 M Tris-Acetat, 0,05 M EDTA, pH 8 – 8,5) verwendet und mit je 0,2 µl Roti® GelStrain Red oder Green (Carl Roth GmbH & Co. KG) gefärbt. Die Elektrophorese lief in 1x TAE-Puffer zwischen 80 V und 100 V für 30 min. Anschließend erfolgte die Bildgebung in der Gel-Dokumentation FluorChemQ (Biozym).

### 3.21 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Um die bei einer PCR amplifizierte DNA nach dem Auftragen auf ein 0,75 - 1 %-iges Agarosegel zu isolieren, wurden erst die entsprechenden Banden mit Hilfe eines Skalpell auf einem UV-Tisch ausgeschnitten und anschließend entweder mit dem mi-Gel Extraction-Kit von Metabion international AG oder mit dem NucleoSpin® DNA Gel und PCR Clean-up-Kit von Macherey-Nagel GmbH & Co. KG aufgereinigt. Verwendet wurden die Kits nach den Angaben der Hersteller. Die Quantifizierung erfolgte anschließend mittels NanoDrop (infinite F200 Pro) von Tecan.

### 3.22 Restriktionsverdau und Ligation / Klonierung

Nach der Isolierung aus einem Agarosegel und der Reinigung der PCR-Produkte (mittels Klonierungsprimer wurden Enzymschnittstellen an das Template angefügt) oder nach einer Mini-Prep von Plasmid-DNA wurde die DNA/Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen bei 37 °C nach Zeitangabe des Herstellers verdaut. Alle verwendeten Enzyme waren HF-Enzyme und funktionierten im CutSmart-Puffer. Anschließend erfolgten die Kontrolle der Restriktion auf einem Agarose-Gel und eine Gelextraktion. Nach erfolgreicher Restriktion erfolgte eine Ligation von DNA-Fragment und Plasmid-DNA mit T4-DNA-Ligase (16 °C/ >1h und RT/30 min) oder mit der *Instant sticky-end* Ligase (New England Biolabs GmbH). Insert und Vektorrückgrat wurden in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt.

Im Falle der Sequenz *At-FAX7* erfolgte zur Klonierung in den Hefeexpressionsvektor pDR195 eine Zwischenschritt. Hierzu wurde die Sequenz in den Vektor pJET1.2 gemäß des Kit-Protokolles CloneJET PCR Cloning Kit von Thermo Scientific™ kloniert und dann mittels Restriktion (Xho/BamHI) und anschließender Ligation in pDR195 kloniert.

### 3.23 PCR Klonierung mittels *circular polymerase extension cloning* (CPEC)

Da die Sequenz von *At-FAX5* mittels klassischer Klonierung nicht in den Hefeexpressionsvektor pDR195 zu klonieren werden konnte, wurde ein PCR-vermittelter Klonierungsansatz durchgeführt. Eine Variante der PCR-Klonierung ist das *circular polymerase extension cloning* (CPEC) (Quan und Tian, 2009 und 2011). Hierbei wird die einzufügende DNA-Sequenz (*At-FAX5*) in einer PCR mit Primern vervielfältigt, die jeweils eine mit dem Vektor überlappende Sequenz am 5'-Ende enthalten. Hierzu wurden die Primer Fax5\_mega\_F (5'-CCCCAGCCTCGAGCGGCCATGCACGATTTCTGCTTCAC-3') und Fax5\_mega\_R (5'-GGCGAAGAAGTCCAAAGCTGGATCCGCTCATTAGCTTTCGGTGGTATGA-3') verwendet. Das Zielplasmid pDR195 wurde mittels PCR und den Primern pdr195\_linearCPEC-F (5'-gctgaatgagcggatccagctttggacttcttc-3') und pdr195\_linearCPEC-R (5'-atcgtgcatggccgctcgaggctg-3') linearisiert. Anschließend wurde das gereinigte insert PCR-Produkt als *Megaprimer* verwendet, um das ebenfalls aufgereinigte, linearisierte Plasmid *in vitro* nun mit dem Insert zu synthetisieren. Das Protokoll nach Quan und Tian (2011) wurde befolgt. *At-FAX5* konnte erfolgreich in pDR195 kloniert werden bei einem molaren Verhältnis in der Endreaktion (CPEC Reaktion) von 1:1 oder 2:1 Insert zu Plasmid, ausgehend von 250 ng Vektor. Das hierzu verwendete PCR Programm ist in Tab. 10 dargestellt.

**Tab. 10: Verwendetes PCR-Programm.**

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Denaturierung	98	30
Denaturierung	98	10
Annealing 65	50 – 60	20
Elongation	72	200
Elongation	72	420
Ende	8	∞

} x 10

Die PCR-Reaktion, somit die neu erzeugten Plasmide wurden zur Vermehrung in *E. coli* TOP10 transformiert. Die Ligation erfolgt hierbei *in vitro*. Einzelkolonien wurden gepickt, vermehrt und die Plasmide isoliert. Die Insertion von *At-FAX5* in pDR195 wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

### 3.24 RNA Isolierung

Die Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte nach den Angaben des NucleoSpin RNA Iso Plant and Fungi-Kits oder nach denen des NucleoSpin® RNA Plant-Kits von Macherey-Nagel GmbH & Co KG. Anschließend erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration (ng/μl) durch die Messung der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm im NanoDrop (Tecan).

### 3.25 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) zur cDNA Synthese

Um die isolierte RNA in codierende DNA (Exons) umzuschreiben (Amplifikation), wurde 1 µg RNA (max. 6,7 µl) mit 0,4 µl oligo dT-Primer, 0,5 µl dNTPs und 2 µl RT-Puffer in einem PCR-Tube im PCR-Cycler bei 70 °C für zwei Minuten denaturiert und anschließend auf Eis gestellt und mit 0,4 µl Reverser Transkriptase versetzt. Danach erfolgte die Inkubation und der Umschreibprozess bei 42 °C für 90 Minuten.

### 3.26 qRT-PCR (*quantitative Realtime PCR*)

Die qRT-PCR erfolgte im Lightcycler von Roche. Zur quantitativen Bestimmung von cDNA Kopien in einer Probe wurden 2 µl einer 1:20 Verdünnung der, in der RT-PCR generierten, cDNA mit 14 µl Primermix (LC-H<sub>2</sub>O-Lösung mit je 100 µM der Genspezifischen *forward* und *reverse* Primer) und 4 µl Enzymmix („FastStart DNA Master SYBR-Green Plus“ Kit von Roche) gemischt. 19 µl des Ansatzes wurden anschließend auf eine, der zum LightCycler passenden Kapillare pipettiert und bei 2000 rpm für 1 min in die Kapillare zentrifugiert. Die mit dem Reaktionsansatz beladenen Kapillaren wurden anschließend in ein Karussell geladen, in den LightCycler gestellt und das jeweilige PCR-Programm gestartet (Annealing-Temperatur abhängig von Primerpaaren). Im Anschluss wurde das Produkt aus der Kapillare in ein Reaktionsgefäß zentrifugiert (2000 rpm für 1 min) und 7 µl davon auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. Zur Quantifizierung wurden die genspezifischen Signale auf die Ausgangsmenge an Aktin in der Probe normalisiert. Hierzu wurde zu jeder cDNA Probe eine weitere Reaktion mit Aktin spezifischen Primern durchgeführt. Der relative Gehalt einer bestimmten cDNA in einer Probe wurde anhand folgender Beziehung bestimmt:

$$\text{Relativer Gehalt an cDNA} = 2^{[n(\text{Aktin})-n(\text{Gen})]}$$

wobei n die Zahl der Zyklen bezeichnet, die benötigt wurden um mit der Menge des jeweiligen Amplifikats einen vorher festgelegten Schwellenwert zu überschreiten. Dieser Schwellenwert war für das genspezifische – und das Aktinsignal gleich und wurde in jeder qRT-PCR so bestimmt, dass alle Messpunkte in der exponentiellen Phase der PCR lagen.

Die Detektion der Transkripte erfolgte mittels spezifischer Primerpaare (FAX1 LCfw und FAX1 LCrev, 265bp; FAX2 LC E2 fw und FAX2 LC E5 rev, 388bp; FAX3 LC-CT fw und FAX3 LC-CT, 303bp; At-FAX4 fw (cacc) und At-FAX4 rev (-stop), 531bp; FAX5LCfw und FAX5LCrev, 347bp; FAX6LCfw und FAX6LCrev, 306bp; FAX7LCfw und FAX7LCrev, 317bp und FAX4 LC-CT fw und rev, 342 bp). Die Normierung der Transkripte erfolgte auf Aktin (amplifiziert mittels AtAct2/8fw und AtAct2/8 rev, 435bp).

### 3.27 Anzucht von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in 5 ml LB- (1 % Tryptone, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl) bzw. TB- (1,2 % Peptone, 2,4 % Hefeextrakt, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Flüssigmedium bei 37 °C unter Schütteln. Zur Kultivierung auf Platten wurde dem verwendeten LB-Medium 1,2 % Agar zugesetzt. Zur Positivselektion wurde Antibiotika, je nach passender Resistenz der transformierten Plasmide, zum Medium hinzugegeben. Die verwendeten Antibiotika sind in

Tab. 11 dargestellt. Die Agrobakterien (AGL1) wurden auf LB-Agarplatten bei 28 °C angezogen. Das Medium enthielt 25 µg/ml Rifampicin (Resistenz chromosomal), 50 µg/ml Carbenicillin (Resistenz chromosomal), 50 µg/ml Kanamycin (Resistent Helferplasmid Stamm GV3101) und 100 µg/ml Spectinomycin (Resistenz transformierter Plasmidvektor-Konstrukte).

**Tab. 11: Verwendete Antibiotika und deren Endkonzentration im Medium.**

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Carbenicillin	50 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Rifampicin	25 µg/ml
Spectinomycin	100 µg/ml

### 3.28 Plasmidextraktion

Für die Extraktion der Plasmidvektor-Konstrukte der Bakterien wurden zwei unterschiedliche Kits verwendet. Zum einen das mi-Plasmid Miniprep Kit von Metabion international AG und zum anderen das Nucleo® Spin Plasmid Extraction Kit von der Macherey-Nagel GmbH & Co. KG. Die Durchführung erfolgte jeweils nach den Angaben der Hersteller.

### 3.29 Sequenzierung

Zur Sequenzierung und somit zur genauen Ermittlung der Sequenz einzelner DNA-Fragmente oder ganzer Plasmide (mit Insert) wurde das Mix2Seq Kit von Eurofins Genomics genutzt. Die Sequenzierung wurde extern durch Eurofins NDSC Food Testing Germany GmbH in Hamburg durchgeführt.

### 3.30 Transformation von *Escherichia coli*

Bereits kompetente TOP10-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit <5 µl Plasmid-DNA versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Die Zellen wurden dann bei 42 °C für 30 Sekunden im Heizblock Hitze-geschockt und 250 µl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose) hinzugegeben. Der Transformationsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln (700 rpm) inkubiert, anschließend auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C kultiviert bis Einzelkolonien erkennbar waren.

### 3.31 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Bereits kompetente AGL1-Zellen (50 µl) wurden in einem Reaktionsgefäß mit 1,5-2 µg Plasmid-DNA (*FAX1*, *FAX4*, *FAX7*, *OM64*, *TPR7*) versetzt und vorsichtig gemischt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte jeweils eine fünfminütige Inkubation in flüssigem Stickstoff und bei 37 °C im Heizblock. Nach der Zugabe von 800 µl LB-Medium (ohne

Antibiotika) inkubierten die Transformationsansätze für vier Stunden unter Schütteln (700 rpm) bei 28 °C. Es erfolgte eine Zentrifugation (2 min/ 4000 rpm/ RT), die Abnahme des Überstandes, die Resuspendierung des Pellets in 70 µl LB und der Transfer/das Ausstreichen auf eine LB-Platte (mit 50 µg/ml Carbenicillin und 100 µg/ml Spectinomycin). Die Platten wurden bei 28 °C für drei Tage kultiviert.

### **3.32 Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens* Zellen**

AGL1-Zellen wurden in 500ml LB-Medium (mit Antibiotika) für 30h bei 28°C angezogen und anschließend bei 6000 g, 10 min, bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,4) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml LB-Medium aufgenommen und in 200µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

### **3.33 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana***

Um die Tabakpflanzen transient mit Hilfe von Infiltration zu transformieren wurden am Vorabend in einem 50 ml Falcon 3 ml LB-Medium inklusive aller Antibiotika mit dem Ausstrich einer bereits transformierten AGL1-Kolonie (Konstrukt-tragend) bzw. einer Kolonie des Helferplasmids (#1119, p19) angeimpft und über Nacht bei 28 °C/ 270 rpm inkubiert. Am Tag der Transformation wurde 30 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) zu der AGL1-Kultur hinzugeben und diese für weitere 3-4 Stunden bei 20°C/ 270 rpm inkubiert. Ebenso wurden vier bis fünf Wochen alte Tabakpflanzen mit Wasser besprüht und in eine Plastiktüte (Autoklavierbeutel) gestellt und dieser verschlossen. Nach der Wachstumszeit der Bakterienzellen wurden diese abzentrifugiert (20 min/ 4000 rpm/ RT) und in 30 ml Induktionsmedium (10 mM MES [pH 6,0], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM Acetosyringone) resuspendiert. Anschließend inkubierten die Zellen erneut für zwei Stunden bei 28 °C/ 75 rpm und wurden danach wieder 20 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 % Saccharose und 200 µM Acetosyringone gelöst und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7 eingestellt. Es erfolgte das 1:1 Mischen der AGL1-Zellsuspension (Konstrukt-tragend) mit der Zellsuspension des Helferplasmids. Mit Hilfe einer 2 ml Spritze (ohne Kanüle) wurde die Zellsuspension aufgezogen und die Blattunterseiten der Tabakblätter (mehrere Blätter einer Pflanze) infiltriert. Nach Abschluss der Infiltration wurden die Pflanzen erneut mit Wasser besprüht und in den Autoklavierbeutel zurückgestellt. Nach einem Tag wurde der Beutel entfernt und nach 3-4 Tagen die Epidermis der Pflanzen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Zur weiteren Analyse wurden GFP-Konstrukte verschickt und in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Melanie Krebs, Zellbiologie, Centre of Organismal Studies (COS), Karl-Ruprechts-Universität Heidelberg, untersucht. In Heidelberg wurden ebenso transiente Tabaktransformationen, als auch stabile Transformationen in *Arabidopsis* durchgeführt und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### 3.34 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe einer spitzen Pinzette wurden kleine Stücke der unteren Epidermis der transformierten Tabakblätter abgezogen und auf einen Wassertropfen auf einem Objektträger gegeben. Die Betrachtung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Keyence BZ-9000E) mit Hilfe des Programms BZ-II Viewer und BZ-II Analyzer. Die Epidermiszellen wurden betrachtet und über das verwendete Programm fotografiert (Fluoreszenzbild und Durchlichtbild).

Die Analysen in Heidelberg erfolgten mittels des Fluoreszenzmikroskopes Typ Leica SP5II mit dem Objektiv 63.0 x 1-20 WATER UV. Die Auflösung der Bilder betrug 512 x 512 Pixel.

### 3.35 Anzucht der Hefen

Die transformierten Hefemutanten-Stämme *fat1* (LS2020-YB332) und *faa1/faa4* (LS1849-YB525) wurden auf SC-Ura Agarplatten (0,7 % *yeast nitrogen base* ohne Aminosäuren (Difco), 2 % D(+)-Glucose, 0,2 % Drop-out Mix ohne Uracil, 2 % Agar) bei 30 °C im Brutschrank angezogen. Flüssigkulturen enthielten dieselbe Zusammensetzung ohne Zugabe von Agar. Sie trugen unterschiedliche Protein-Plasmidvektorkonstrukte (Protein/pDR195) oder als Transformationskontrolle den leeren pDR195 Vektor. Der Vektor pDR195 vermittelte Gene zur Uracilsynthese.

### 3.36 Transformation kompetenter Hefezellen

Bereits kompetente Hefezellen eines wildtypischen EUS-Stamms (wt-EUS Y00000-BY4741) wurden mit dem Hefektor pDR195 (leer/ #251) und kompetente Hefezellen des Deletionsstammes  $\Delta fat1$  (LS2020-YB332) wurden mit *FAT1* (#1103, pYCG/YBR041w) transformiert. Transformiert wurden ebenso die cDNA des muren *At-FAX1* Gens, *At-FAX2* Gens, *At-FAX3* Gens, *At-FAX4* Gens, *At-FAX5* Gens, *At-FAX6* Gen und des *At-FAX7* Gens als Fettsäuretransporter und *At-PIC* als Eisentransporter (Kontrolle) (Duy *et al.*, 2007) in Hefemutanten-Stämme *fat1* (LS2020-YB332) und *faa1/faa4* (LS1849-YB525) (Zou *et al.*, 2003).

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 5 µl Plasmid-DNA und 300 µl LiPEG gut gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 35 µl DMSO wurden die Transformationsansätze bei 42 °C (Heizblock) für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation (4000 rpm/ 4 °C), die Zugabe von 150 µl Selektionsmedium und das Ausplattieren auf Selektionsplatten (SC-ura). Kultiviert wurden die Hefen für zwei bis vier Tage bei 30 °C.

### 3.37 Herstellung kompetenter Hefezellen

Ausgehend von einer stationären Vorkultur wurde eine Hauptkultur von 50 ml in YPD (für 1 Liter: 1 % Hefeextrakt (Roth), 2 % Pepton (Gibco BRL), 2 % D(+)-Glukose (Merck)) angeimpft (ca. OD<sub>600</sub> 0,15). Die Zellen wurden bei 30°C, 170 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,5-0,6 angezogen und anschließend für 3 min bei 3000 rpm, 4°C geerntet. Die Zellen wurden mit 50 ml sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und abzentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit ¼ Volumen

LiSorb (100 mM LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH 8, 1M Sorbitol, sterilfiltriert) und erneuter Zentrifugation. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und die Zellen in 300µl LiSorb resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 7µl Carrier-DNA (2 mg/ml, Hitze-denaturiert und abgeschert) auf 50µl Hefesuspension und Durchmischung der Suspension. Die Zellen wurden in 50 µl Aliquots bei -80°C weggefroren.

### 3.38 Drop-Dilution-Test

Vorkulturen der verschiedenen Hefemutanten wurden in 30 ml Selektionsmedium (SC-ura) über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der Bestimmung der OD<sub>600</sub> am nächsten Morgen wurden die Hauptkulturen so verdünnt, dass die OD<sub>600</sub> bei 0,1 in 75 ml Selektionsmedium lag. Danach erfolgte das Wachstum der Kulturen bei 30 °C unter Schütteln bis in die exponentielle Phase (OD<sub>600</sub> ~ 0,6). Die dann gezogene Probe (1 ml) wurde in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) auf SC-ura Platten mit 3,6 mM α-Linolensäure (0,1 %, w/v in Ethanol) und mit 1 % Tergitol (Erhöhung der Löslichkeit der α-Linolensäure) getropft (2 x 2 µl Tropfen). Für die Kontrollplatten wurde anstatt der Säure 0,1 % Ethanol (100 %) hinzugefügt (Li *et al.*, 2015). Zur Kontrolle wurde auf jede Platte noch der passende Hefe-Mutationsstamm mit dem transformierten Leervektor pDR195 aufgetragen. Die Platten wurden für zwei Tage bei 30 °C inkubiert und fotografiert.

### 3.39 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Zur Expression eines Proteins in *E. coli* wurde zunächst eine Vorkultur von Bakterienzellen (BL21 mit mat-FAX1/pBadMycHisA) mit 200 ml LB-Medium und Ampicillin (100 µg/ml) hergestellt und über Nacht bei 37 °C/ 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Danach erfolgte das Animpfen der Hauptkultur mit 25ml Vorkultur pro 1 Liter Hauptkultur (inkl. Ampicillin [100 µg/ml]) und das Inkubieren bei 37 °C/ 180 rpm bis die Kultur eine optische Dichte von 0,6 bei 600 nm Absorption (OD<sub>600</sub>) erreicht hatte. Daraufhin erfolgte die Induktion der Proteinsynthese durch Zugabe von 1 ml 20 %-ige Arabinose pro 1 Liter Kultur und die erneute Inkubation im Schüttelinkubator bei 24 °C (bzw. 37°C) und 180 rpm. Nach mehrstündiger Inkubation (6h, 8h, ü.N.) wurden die Zellen entweder komplett mittels Zentrifugation geerntet oder Proben zum Erstellen eines Zelllysates entnommen. Die geernteten Zellen wurden bei -20 °C gelagert.

**Hinweis:** Festzuhalten war, dass die besten Expressionsbedingungen bei 24 °C für 8 h waren, wobei das Expressionsvolumen pro Erlenmeyerkolben nicht unter 2 Litern liegen sollte.

### 3.40 Herstellung von *E. coli* Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden nach Expression Kulturproben von 30 ml entnommen und bei 3000 rpm / 20min / 4°C geerntet und bei -20°C gelagert oder direkt prozessiert. Die Zellen wurden nach dem Auftauen gewogen und in 5 ml PBS (inkl. 1 mM EDTA, 1mM PMSF, (1x Pic), 10 µg/ml DNase) pro 1 g Zellen gelöst/resuspendiert. Daraus wurden 450 µl in ein Reaktionsgefäß überführt und 50 µl einer 10 %-igen Triton X-100 Lösung zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 4 °C auf einem Rotator. Mittels Zentrifugation bei 13000

rpm / 4 °C wurde die Suspension in Pellet und Überstand getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgte eine SDS-Gel- und Western Blot Analyse.

### 3.41 Isolation der *E. coli* Membranen

Zur Ernte von großen Zellmengen wurden die Kulturen mittels 0,5 Liter Flaschen abzentrifugiert (25 min / 4 °C / Sorvall RC6 Plus / Rotor SLA-3000/ 20000g/ 11000 rpm) und die Pellets bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Pellets in kaltem TBS Puffer + 1 mM PMSF resuspendiert (Je nach Pellet in 100-150 ml TBS). Unter Rühren bei 4 °C für 20 min wurden alle Pelletrückstände gelöst. Die Zellen wurden anschließend mittels mechanischer Kraft aufgeschlossen. Hierzu wurde eine French Press (French Pressure Cell Press, SLM Instruments Inc.) benutzt. Alle Bestandteile waren gekühlt und die *E. coli* Suspension ständig auf Eis gelagert. In der Druckkammer wurde ein Druck von 10000 psi eingestellt. Die Suspension durchlief ca. 3-mal den Aufschluss.

**Hinweis:** Bei erfolgreichem Aufschluss wird die Suspension gräulich, viskos und klarer.

Anschließend wurden mittels Zentrifugation (4 °C/ 25 min / 29000 xg / 15.800 rpm / Rotor Ti45 / Beckmann Coulter Optima XPN-80 UltraZ) für 25 min die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und erneut zentrifugiert (4 °C/ 2 h / 142.400 xg / 35000 rpm / Rotor Ti45 / Beckmann Coulter Optima XPN-80 UltraZ) um die Membranen zu pelletieren. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und die Membranen bei -20°C gelagert.

**Hinweis:** Die Membranen ergaben ein dunkles, fast schwarzes aber transparentes Pellet.

### 3.42 Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Agarosebeads und Imidazol

Zur Aufreinigung des Proteins aus *E. coli* Membranen wurden die isolierten Membranen zunächst auf Eis aufgetaut und in 50 ml kaltem Solubilisierungspuffer (50 mM Tris-HCL pH 8, 200 mM NaCl, 20 % Glycerol) mit 0,5 ml PMSF (100 µM) gelöst und mittels Gewebehomogenisator (Roth, 150ml) vorsichtig gepottert und homogenisiert. Nach Überführung in ein Becherglas wurde unter ständigem Rühren (vorsichtig, es dürfen keine Blasen entstehen) nach und nach DDM (n-Dodecyl-β-D-maltoside) als Detergenz hinzugegeben (pro 10 ml / 0,1 g DDM, 1% Finalkonzentration). Anschließend erfolgte unter weiterhin ständigem Rühren auf Eis eine Inkubation für mindestens 30 min. Mittels Ultrazentrifugation (UZ) (4 °C/ 30 min / 142.400 xg / 35000 rpm / Rotor Ti45 / Beckmann Coulter Optima XPN-80 UltraZ) wurden Rückstände abzentrifugiert, der Überstand in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und 1,5 – 0,75 ml Ni-NTA-Agarosebeads zugesetzt und für 45 min bis 1 h bei 4 °C unter ständiger Rotation (auf einem Rocker) inkubiert.

**Hinweis:** Hier konnten mit 0,75ml Ni-NTA-Agarosebeads pro 50 ml Membransuspension und einer 45-minütigen Inkubation die besten Ergebnisse erzielt werden.

Die Suspension wurde weiterhin auf eine Chromatografie-Säule (Biorad Econo-Column® Chromatographiesäule, 2.5 × 20 cm) geladen, sodass die Ni-NTA-Agarosabeads darin zurückblieben. Die Beads wurden mit 50 ml Waschpuffer A (50mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl, 20 % Glycerol, 0. 1% DDM und Imidazol (10 mM, 20 mM oder 40 mM)) gewaschen.

**Hinweis:** Am besten konnten unspezifische Bindungen mittels Waschpuffer A mit 20 bzw. 40 mM Imidazol ausgewaschen werden, wobei hier 40 mM Imidazol rückwirkend als Standard-Konzentration festgelegt wurde.

Um nun das Zielprotein zu eluieren, welches mittels His-Tag spezifisch mit den Ni-NTA-Agarosebeads interagiert, wurde der Imidazolgehalt deutlich erhöht, um das Protein auszuwaschen. Hierzu wurde Waschpuffer A mit je 100 mM, 250 mM, 500 mM und 1 M Imidazol erstellt und in aufsteigender Konzentration mit den Beads auf der Säule inkubiert. 2 ml Waschpuffer A (100 mM Imidazol) wurde zu den Beads auf die Säule gegeben, mittels Pipette durchmischt und für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Eluat in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Selbiges wurde mit dem Waschpuffer mit 250 mM Imidazol, usw. durchgeführt. Die Eluate wurden bei 4 °C gelagert und Proben mittels SDS-Gel und Western Blot Analyse untersucht. Eluatfraktionen in denen das Zielprotein zu detektieren war, wurden gepoolt und zwecks Entfernung des Imidazols dialysiert. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch (14 kDa) verwendet. Unter ständigem Rühren bei 4 °C für 1 h erfolgte die Dialyse der Eluate im Dialysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % Glycerol). Anschließend wurde das Eluat in Reaktionsgefäße überführt, in Stickstoff eingefroren und für weitere Analysen bei -80 °C gelagert.

### **3.43 Aufreinigung mittels FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*)**

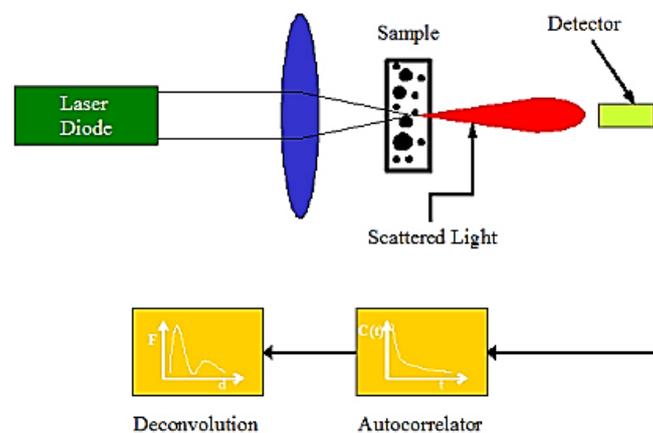
Mittels Gelfiltration über eine Superdex200-Säule (Superdex Increase HiScale, Sigma Aldrich) in einem Proteinaufreinigungssystem (ÄKTA FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*)) wurde ein zweiter Aufreinigungsschritt angeschlossen. Hierzu wurde das Protein aufgetaut und mittels Amicons (Durchfluss < 30kDa) (3000 rpm/ 5 min) zu 2 ml Endvolumen konzentriert.

**Hinweis:** Max. 2,5x konzentrieren, sonst erhöhte Aggregatbildung. Es empfiehlt sich den Konzentrationsfortschritt stetig zu prüfen.

Die Säule wurde mit 30 ml Gelfiltrationspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 5 % Glycerol und 0,05 % DDM) äquilibriert und dann die Probe geladen. Als Druck wurden 0,15 MPa angelegt und im Durchflusskollektor Proben im Volumen von 0,5 ml fraktioniert und bis 30 ml Durchfluss gesammelt. Die Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-Gel und Western Blot Analyse untersucht und die relevanten Fraktionen gepoolt, erneut konzentriert und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt. Nachfolgend konnten Analysen wie Dynamic-Light-Scattering (DLS) oder Size-Exclusion-Chromatography-Multi-Angle-Light-Scattering (SEC-MALS) durchgeführt werden.

### 3.44 Dynamische Lichtstreuung (*Dynamic-Light-Scattering DLS*)

DLS ist eine analytische Methode, um die Größenverteilung von Partikeln innerhalb einer Lösung zu bestimmen. Hierzu wird Licht, ausgehend von einem Laser, mittels einer Linse gebündelt und in ein Glasgefäß gerichtet, welches eine Verdünnung der Partikel enthält. Die Temperatur wird hierbei konstant gehalten. Trifft das Licht nun auf die Partikel, wird es in alle Richtungen gestreut. Die Intensität der Lichtstreuung ist abhängig vom Molekulargewicht, der Größe und Form des Partikels, sowie dem Lichtbrechungsindex der Lösungsflüssigkeit. Die Intensität der Lichtstreuung wird mittels eines Detektors erfasst, anschließend verarbeitet und letztlich über den hydrodynamischen Radius, die Molekularmasse bestimmt (Lomakin *et al.*, 2005; Nicomp 380 Manual; Malvern Instruments DLS Technical Note). Der schematische, oben erklärte Aufbau ist in Abb. 4 dargestellt.



**Abb. 4: Vereinfachte Darstellung des NICOMP DLS Instrumentes.** Dargestellt ist die Laserdiode (grün), deren Licht mittels Linse (blau) auf die Probe (Sample), welche die Partikellösung enthält, gebündelt wird. Die Intensität des gestreuten (scattered) Lichts (rot) wird mittels Detektor gemessen und anschließend mittels Computerprogramm analysiert (Autokorrelator und Deconvolution). (Übernommen aus: Nicomp 380 Manual PSS-380Nicomp-030806 06/06 Page 2 - 1).

Diese Methode wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Joanne Lemieux, University of Alberta, Edmonton, Kanada und Dr. Anne Grethen, AG Biophysik, TU Kaiserslautern, Kaiserslautern, Deutschland durchgeführt.

### 3.45 Size-Exclusion-Chromatography-Multi-Angle-Light-Scattering (SEC-MALS)

SEC-MALS kombiniert die Methode der mehr-winkligen Lichtstreuung mit einer vorausgehenden Größenausschlusschromatographie. So können Moleküle hingehend ihrer Molmasse, Größe und Konformation analysiert werden. Nach Verlassen des HPLC oder FPLC Systems passieren die Moleküle einen MALS Detektor und werden von einem Laser bestrahlt. Die MALS Signale wie UV-Absorption und/oder differentieller Brechungsindex (dRI) können analysiert werden (WYATT Technology, <https://www.wyatt.com/solutions/techniques/sec-mals-molar-mass-size-multi-angle-light-scattering.html#sec-mals-1>). Diese Methode wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Joanne Lemieux, University of Alberta, Edmonton, Kanada und Dr. Anne Grethen, AG Biophysik, TU Kaiserslautern, Kaiserslautern, Deutschland durchgeführt.

### 3.46 SDS-Polyacrylamid Gele

Das Gießen von SDS-PAGE-Gelen wurde in Mini-Gelkammern (8 cm × 8 cm × 0,75 mm) unter Verwendung von 12-15 % Acrylamid-Trenngelen (375 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS; pH 8,8 unter Verwendung von HCl, 12-15 % Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung, 0,05 % Ammoniumpersulfat (APS), 0,05 % Tetramethylethyldiamin (TEMED)) und 5 % Acrylamid Sammelgele (125 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS; pH 6,8 unter Verwendung von HCl, 5 % Acrylamidbisacrylamidlösung, 0,1 % Ammoniumpersulfat (APS), 0,1 % Tetramethylethyldiamin (TEMED)) durchgeführt. Nach dem Gießen wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet und vollständig auspolymerisiert. Nach Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel gegossen und der Vertiefungskamm eingeführt. Zur Lagerung wurden die Gele in feuchte Tücher gewickelt und bei 4 °C gelagert.

### 3.47 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Für die SDS-Page wurden die aufzutragenden Proben mit Solubilisierungspuffer (4x: 250 mM Tris-HCl [pH 6,8], 10 % SDS, 0,008 % Bromphenolblau, 40 % Glycerol, 20 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und nicht aufgekocht. 3-5  $\mu$ l RotiMark Tricolor Marker (Roth) und jeweils 15-20  $\mu$ l einer Probe wurden auf ein denaturierendes Gel (12-15 % Acrylamid-Gel) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer (10x: 1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, 1 % SDS) für 15 Minuten bei 80 V und anschließenden für eine Stunde bei 120 V bei Raumtemperatur (Mighty Small II, Amersham Biosciences).

### 3.48 Kolloidale Coomassie-Blau Färbung

Um Proteine sichtbar zu machen, wurden SDS Gele für 30 min mit einer Coomassie-Färbelösung (600 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3 % (w/v) Phosphorsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie G-250, bis 20 % (v/v) methanol) inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung bis zur gewünschten Stufe (Hintergrund klar) mittels 1 % (v/v) Essigsäurelösung.

### 3.49 Elektrotransfer von Proteinen (Western-Blot)

Die mit Hilfe der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran (Transfer Membrane, Immobilon-P, 0,45  $\mu$ m) unter Zuhilfenahme einer „Semi-Dry-Blot“-Apparatur (Peglab VWR Company) übertragen. Dabei erfolgte der Transfer der Proteine ausgehend von der Anode, über drei in Anodenpuffer I (20 % Methanol, 300 mM Tris, pH 10,4) und zwei in Anodenpuffer II (20 % Methanol, 30 mM Tris, pH 10,4) getränkte Whatman-Filterpapiere. Danach wurde die vorher mit Methanol aktivierte PVDF-Membran und das mit Anodenpuffer II befeuchtete Acrylamid-Gel auf die Apparatur gelegt. Darauf folgten drei in Kathodenpuffer (20 % Methanol, 25 mM Tris, 40 mM Aminocapronsäure, pH 9,4) getränkte Whatman-Filterpapiere. Mittels der Kathodenplatte wurde alles fixiert. Das „Blotten“ (Transfer) erfolgte innerhalb einer Stunde bei X mA. X errechnet sich aus Länge x Breite ( $\text{cm}^2$ ) der PVDF Membran x einem empirischen Faktor von 0,8 bis 1,2.

### 3.50 Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper

Die Detektion der transferierten Proteine basierte auf der Bindung primärer Antikörper (polyklonal) an die Proteine und anschließender Bindung des sekundären Antikörpers (mit gekoppelter HRP (Meerrettichperoxidase) an die primären Antikörper. Dazu wurde die PVDF-Membran nach dem Proteintransfer ü.N. in 1x TTBS (1x TN-Puffer, 0,2 % Tween-20, 0,1 % BSA) + 5 % BSA bei 4°C blockiert/gesättigt. Nach Entfernen der Blocking-Lösung, erfolgten die Zugabe des primären Antikörpers und eine Inkubation bei RT für 1 h. Es wurden dann drei Waschschrte für je 10 Minuten in TTBS durchgeführt und die Membran mit dem sekundären Antikörper 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter 30-minütiger (3x 10 Minuten) Waschung in TTBS, wurde die Membran mittels ECL Western Blot Reagenzien (Cytiva Amersham, GE Healthcare) gemäß Herstellerprotokoll entwickelt und mittels Gel-Doku FluorChemQ (Biozym) dokumentiert. Marker wurden unter Durchlichtbedingungen fotografiert. Folgende Antikörperpaare wurden verwendet: (1) spezifische Fax1 Antikörper: primär At-FAX1NT 180d Tier 1 Li270513 (rabbit) (1:1000 in TTBS) und sekundär mouse anti-rabbit HRP (scbt sc2357, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (1: 5000 in TTBS). (2) spezifische His-Tag Antikörper: primär His-Tag IgG1k mouse (sc-8036, His-tag Antikörper H-3, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (1:2000 in TTBS) und sekundär anti mouse-IgGk BP-HRP: sc-516102, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)(1:5000 in TTBS)

### 3.51 Mitochondrien und Mikrosomen Importassay – *in vitro*

Die cDNA der jeweiligen Proteine wurde mittels spezifischer Primer und mit PCR-Amplifikation zwischen einer XmaI-Restriktionsstelle, gefolgt von der Kozak-Sequenz "ACC" und einem Startcodon "ATG" und dem nativen Stopcodon, gefolgt von einer Sall-Restriktionsstelle amplifiziert. Zunächst wurden diese Konstrukte dann in das Expressionsplasmid pGEM4 (XmaI / Sall) subkloniert, das einen induzierbaren SP6-Promotor enthielt. Die Konstrukte wurden zur Replikation in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert. Die radioaktiven Proteine FAX4, FAX5, FAX6 und FAX7 oder Oxa1 und Erv2 wurde gemäß dem Kit-Protokoll des TNT SP6 Quick Coupled Transcription / Translation System (Promega) hergestellt. Oxa1 wurde als mitochondriales Importprotein und Erv2 als ER-Importprotein verwendet. Sowohl Proteine als auch Material und Methoden wurden von AG Herrmann, Zellbiologie, TU Kaiserslautern zur Verfügung gestellt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis, sofern nicht anders beschrieben, und mit geschnittenen Spitzen durchgeführt.

Für den *in vitro*-Import von Mitochondrien wurden isolierte Mitochondrien von YPH499 / WT-Zellen verwendet, konzentriert 10 mg / ml (bereitgestellt). Zuerst wurden 50 µl 2 × Importpuffer (1 M Sorbit, 100 mM Hepes, pH 7,2, 160 mM KCl, 20 mM MgAcetat, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), je 1 µl 200 mM NADH und 200 mM ATP, 40 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl Mitochondrien gemischt und 10 min bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 3 µl des jeweiligen radioaktiven Lysats zugegeben und somit der Import gestartet. Proben von 30 µl wurden nach 5 min und 20 min entnommen und direkt in 270 µl kalten SH-Puffer (0,6 M Sorbit, 20 mM Hepes, pH 7,4) auf Eis gegeben. Unmittelbar nach der 20. Minute wurde die Proben mit 3 µl Proteinase K (10 mg / ml) behandelt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von

3  $\mu$ l PMSF (200 mM) und 10-minütiger Zentrifugation bei 16000 rpm (25000 rcf bei 4 °C) wurde der Überstand verworfen. Als nächstes wurden 500  $\mu$ l kaltes SH KCL (0,6 M Sorbit; 20 mM Hepes, pH 7,4; 150 mM KCl) zugegeben, erneut zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 25  $\mu$ l Lämmli (2x : 4% SDS; 10% 2-Mercaptoethanol; 20% Glycerol; 0.004% Bromophenolblau; 0.125 M Tris-HCl; pH 6.8) + 50 mM DTT gelöst (50  $\mu$ l DTT (1 M), 500 $\mu$ l 2x Lämmli, 450  $\mu$ l Wasser).

Für den mikrosomalen *in vitro*-Import wurden isolierte Mikrosomen (6,3 mg/ml) von YPH499 / WT-Zellen verwendet (bereitgestellt). Für die Behandlung von Mikrosomen wurde 86  $\mu$ l B88 (20 mM Hepes, pH 6,8, 250 mM Sorbit; 150 mM KoAc, 5 mM Mg (OAc) 2), 1  $\mu$ l NADH, 1  $\mu$ l ATP, 1  $\mu$ l CCCP, zu 8  $\mu$ l Mikrosomen gegeben. Von hier aus wurde das oben beschriebene Protokoll befolgt. Nach dem Auflösen in Lämmli wurden die Proben 3 Minuten bei 96 °C gekocht und auf SDS-Gel geladen. Auch eine 20%-ige Verdünnung des Lysats wurde als Kontrolle hergestellt. Als mitochondriale Importkontrolle wurde das mitochondriale Membranpotential mit 200  $\mu$ M / ml CCCP (Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon) in der Ausgangsmischung blockiert. Das obige Protokoll wurde gleichermaßen befolgt, mit Ausnahme der Zugabe von NADH und ATP, und erst nach 20 Minuten Import wurden Proben entnommen. Als mikrosomale Importkontrolle wurden die Mikrosomen vor Versuchsbeginn 3 min bei 96 °C gekocht.

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf mittels Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Zur Kontrolle wurde eine Ponceau-Färbung der Proteine durchgeführt. Ein BIOMAX MR-Film (Carestream Health) wurde der getrockneten Membran 4 Tage im Dunkeln ausgesetzt und die radioaktiven Signale wurden anschließend detektiert.

### 3.52 Digitale Sequenzanalysen

Um weitere FAX-Proteine in anderen Pflanzenspezies zu finden wurde mit den *Arabidopsis*-sequenzen der FAX Proteine Datenbankanalysen, z.B. ein NCBI Protein Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) durchgeführt. Die Sequenzen wurden heruntergeladen und mittels Alignments (SnapGene (GSL Biotech LLC), CloneManager (Sci-Ed) oder VektorNTI (ThermoFischer Scientific)) und GeneDoc (Genedoc Software)) vorsortiert. Anschließend wurden durch den Vergleich konservierter Regionen oder Motive die Proteine manuell den At-FAX-Proteinen zugeordnet und weiterführend untersucht. Strukturelle *in silico* Analysen und Vorhersagen der FAX-Proteine wurden mittels Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) durchgeführt. Die Längen der maturen Proteine wurden durch ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) and TargetP 2.0 (Almagro Armenteros *et al.*, 2019) ermittelt. Die  $\alpha$ -Helices der Tmemb\_14 Domäne wurden nach der Aramemnon Konsensus Vorhersage AramTmCon (Schwacke *et al.*, 2003) notiert. *Helical Wheel* Analysen wurden mit den Programmen Heliquist (Gautier *et al.*, 2008) and NetWheels (Mól *et al.*, 2018) durchgeführt.

### **3.53 Statistische Analysen**

Statistische Unterschiede der Daten wurden mit einem ungepaarten Student's two tailed t-Test überprüft und die Signifikanzniveaus sind wie folgt gekennzeichnet: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . In den Graphen sind ebenso die Standardabweichungen dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Rekombinante Expression der FAX-Proteine

Da das Membranprotein FAX1 bereits 2015 von Li *et al.*, bezüglich seiner Rolle in der pflanzlichen Entwicklung und seiner Funktion als Fettsäuretransporter untersucht wurde, sollte nun auch die Strukturaufklärung des Proteins für weiterführende Analysen angegangen werden. Hierzu sollte ein geeignetes Expressionssystem identifiziert werden. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte bereits die rekombinante Expression der Membranproteine FAX1 und FAX2 in *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) innerhalb der Arbeitsgruppe etabliert werden. Allerdings erwies sich das System als sehr limitierend, hingehend der zu erreichenden Zelldichte der Bakterien und somit dem resultierenden Proteingehalt an FAX1. Aus diesen Gründen sollten weitere Expressionssysteme getestet werden. Während eines Forschungsaufenthaltes an der Universität von Alberta, Edmonton, Kanada in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joanne Lemieux, Fakultät für Medizin und Zahnmedizin, Biochemie, die rekombinante Proteinexpression in *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) angegangen werden. Ziel war es, die Methodik zu erlernen und davon ausgehend ein Protokoll zur Expression und Isolation von FAX Proteinen zu erstellen. Ein langfristiges Ziel hierbei stellte die Strukturaufklärung der FAX Proteine dar.

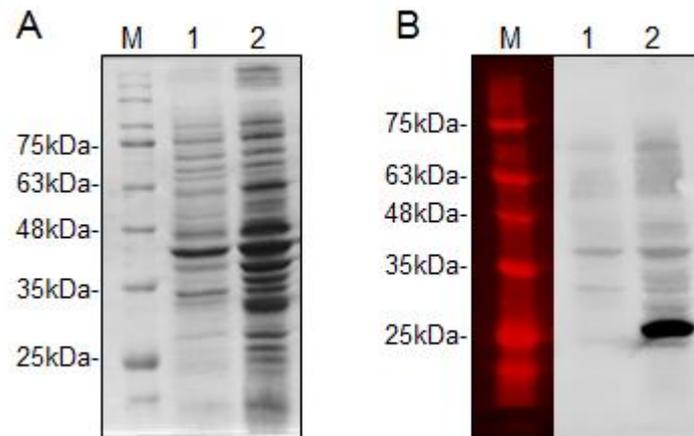
Zur Expression in *P. pastoris* wurde die cDNA-Sequenz des Proteins FAX5 in den Vektor pPICZA-GFP (Anhang Abb. 43, Invitrogen, modifiziert, zur Verfügung gestellt von AG Lemieux) kloniert und in den wildtypischen Hefestamm GS115 transformiert. Analog zu Brooks *et al.* (2013) erfolgte die Induktion der Expression und die Durchführung einer GFP-basierten Klassifizierung der Expressionskolonien. So sollten stark exprimierende Kolonien identifiziert werden. Als positive Kontrolle wurde hierbei ein stark exprimierender Klon einer Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase (PEMT) verwendet (Brooks *et al.*, 2013; zur Verfügung gestellt von AG Lemieux). Es konnten keine Kolonien identifiziert werden, die das FAX-Protein deutlich exprimierten (Daten nicht gezeigt), weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt und die Expression in *E. coli* betrachtet wurde.

#### 4.1.1 Rekombinante Proteinexpression von FAX1 in *E. coli*

Zunächst wurde die mature *Arabidopsis* cDNA Sequenz des Proteins FAX1 mittels NcoI/HindIII Enzymschnittstellen, in den Arabinose-induzierbaren Expressionsvektor pBadMycHisA (Anhang Abb. 44) kloniert. So sollte durch die Vektorexpression zur späteren Aufreinigung und Analyse des Proteins ein Myc-Tag, gefolgt von einem Polyhistidin-Tag (6xHis) hinter den C-Terminus von FAX1 fusioniert werden. Für das exprimierte Protein mAt-FAX1-Myc-6xHis ergab sich eine Größe von 23,4 kDa. Das Konstrukt mAt-FAX1/pBadMycHisA wurde anschließend in den *E. coli* Expressionsstamm BL21 transformiert.

#### 4.1.1.1 Identifizierung vorläufiger Expressionsbedingungen

Um zuerst zu prüfen, ob die Expression des Konstrukts mAt-FAX1/pBadMycHisA erfolgreich war, wurden ausgehend von einer Expression im *E. coli* Stamm BL21 nach 6h Expression bei 24°C die Zellen geerntet und ein Zelllysate der Proben erstellt, welches in Überstand und Pellet getrennt wurde. Eine uninduzierte Kontrollkultur wurde ebenfalls mitgeführt. Anschließend wurden die Überstände mittels SDS-Gelen, Westernblotanalysen und Antikörperdetektion genauer betrachtet (Abb. 5).

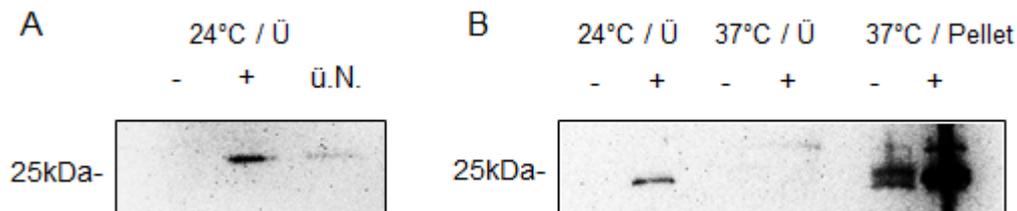


**Abb. 5: Coomassie gefärbtes SDS-Gel (A) und Westernblot/Antikörperdetektion (B) der Zelllysateüberstände der Proteinexpression von mAt-FAX1/pBadMycHisA in BL21. (A+B) 1: mAt-FAX1/pBadMycHisA in BL21 uninduziert bei  $OD_{600}=0,6$ . 2: mAt-FAX1/pBadMycHisA in BL21 induziert nach 6h Expression bei 24°C. Geladen wurden je 10µl Probe. Marker: FroggaBio BLUelf Prestained Proteinladder, 5µl geladen. (B) Detektion erfolgte mittels Primärantikörper anti-His (*mouse*) und Sekundärantikörper anti-mouse IgG HRP.**

Abb. 5, A zeigt, dass in allen Proben Proteine isoliert werden konnten und dient somit als Ladekontrolle. Vergleicht man die uninduzierte Probe mit der induzierten für mAt-FAX1/pBadMycHisA (Spur 1+2, A), so sind deutliche Unterschiede im Proteinhinweis erkennbar. Alle bereits in der uninduzierten Probe vorhandenen Banden erscheinen in der induzierten Probe in stärkerer Intensität. Im Bereich um 25kDa waren in der induzierten Probe neue Banden erkennbar. Mittels Immunofärbung wurden die geblotteten Proteine, welche einen Polyhistidin-Tag aufwiesen, über His-Antikörper detektiert (Abb. 5, B). Allein die induzierte mAt-FAX1/pBadMycHisA Probe im Expressionsstamm BL21 nach 6h Expression wies bei ca. 25kDa ein deutliches Signal auf (Spur 2, B). Da dies etwa der errechneten Größe des zu exprimierenden Konstrukts mAt-FAX1-Myc-6xHis entsprach, wurde die Expression des Proteins hier als erfolgreich betrachtet und dieser Ansatz weiter verfolgt.

#### 4.1.1.2 Verbesserte Expressionsbedingungen und Nachweis von FAX1 in *E. coli*

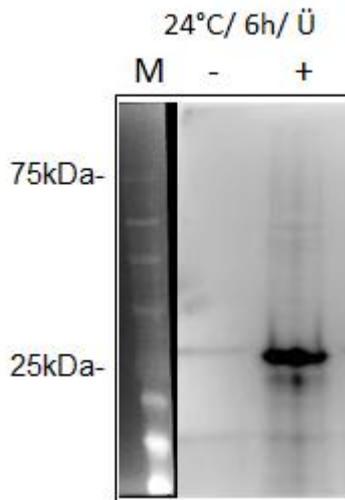
Um die Expressionsbedingungen hinsichtlich Expressionszeit und –temperatur weiter zu optimieren, wurde sowohl die Expression nach Induktion bei 24°C vergleichend nach 6h und über Nacht, als auch bei 24°C und 37°C für 6h betrachtet. Die Aufbereitung der Proben erfolgte analog zur bereits dargelegten Methode. Anschließend wurden die Überstände und Pelletfraktionen mittels SDS-Gel, Westernblotanalysen genauer betrachtet. Die ECL-Aufnahmen der Westernblots sind in Abb. 6 dargestellt.



**Abb. 6: Immunoblots der Zelllysate verschiedener Expressionsbedingungen von mAt-FAX1/pBadMycHisA in *E. coli* BL21.** (A) Expression bei 24°C, uninduziert (-), 6h (+) und über Nacht (ü.N.) nach Induktion. Aufgetragen wurden die Überstandsfraktionen (Ü) mit je 20µl. (B) Expression bei 24°C und 37°C, uninduziert (-), 6h (+) nach Induktion. Aufgetragen wurden die Überstandsfraktionen (Ü) mit je 20µl, sowie die zugehörigen 37°C Pelletfraktionen (Pellet). Detektion erfolgte mittels Primärantikörper anti-His (*mouse*) und Sekundärantikörper anti-mouse IgG HRP.

Wiederum zeigten die uninduzierten Kontrollen der Überstandsfraktionen kein Signal mittels der His-Antikörperdetektion. Die ersten Ergebnisse bestätigend, konnte nach 6h Expression bei 24°C im Überstand ein Signal bei ca. 25kDa detektiert werden, welches sich allerdings bei einer Verlängerung der Expressionszeit über Nacht bei ebenfalls 24°C stark abschwächte (Abb. 6, A). Bei einer Expressionstemperatur von 37°C für 6h war im Überstand der induzierten Fraktion kein Signal erkennbar, während die Pelletfraktion (uninduziert und induziert) Signale mit der stärksten Intensität um 25kDa aufwies (Abb. 6, B). Die Signalstärke nahm nach Induktion der Probe zu. Da, davon ausgegangen werden konnte, dass die Pelletfraktionen aggregierte Proteine in Form von *Inclusion Bodies* enthielten und im Gegensatz dazu möglicherweise richtig gefaltete Proteine im Überstand enthalten waren, wurde die Expressionstemperatur für weitere Versuche auf 24°C festgelegt. Eine Expression über Nacht verringerte den Gehalt des zu exprimierenden Proteins. Um trotzdem die Ausbeute zu erhöhen wurde in nachfolgenden Versuchen zur Proteinaufreinigung die Expressionszeit von 6h auf 8h erhöht und das Expressionsvolumen nie kleiner als in 2 Litern Medium durchgeführt (Empfehlung von Prof. Dr. Joanne Lemieux, siehe unten Abb. 8).

Um zu bestätigen, dass es sich bei dem mittels His-Antikörpern detektierten Signal bei ca. 25 kDa, nicht nur um ein Protein mit His-Tag handelt, sondern auch um das Membranprotein FAX1, wurden Immunoblotanalysen mit spezifischen FAX1-Antikörpern durchgeführt (Abb. 7) und mit den bereits detektierten Signalen verglichen.

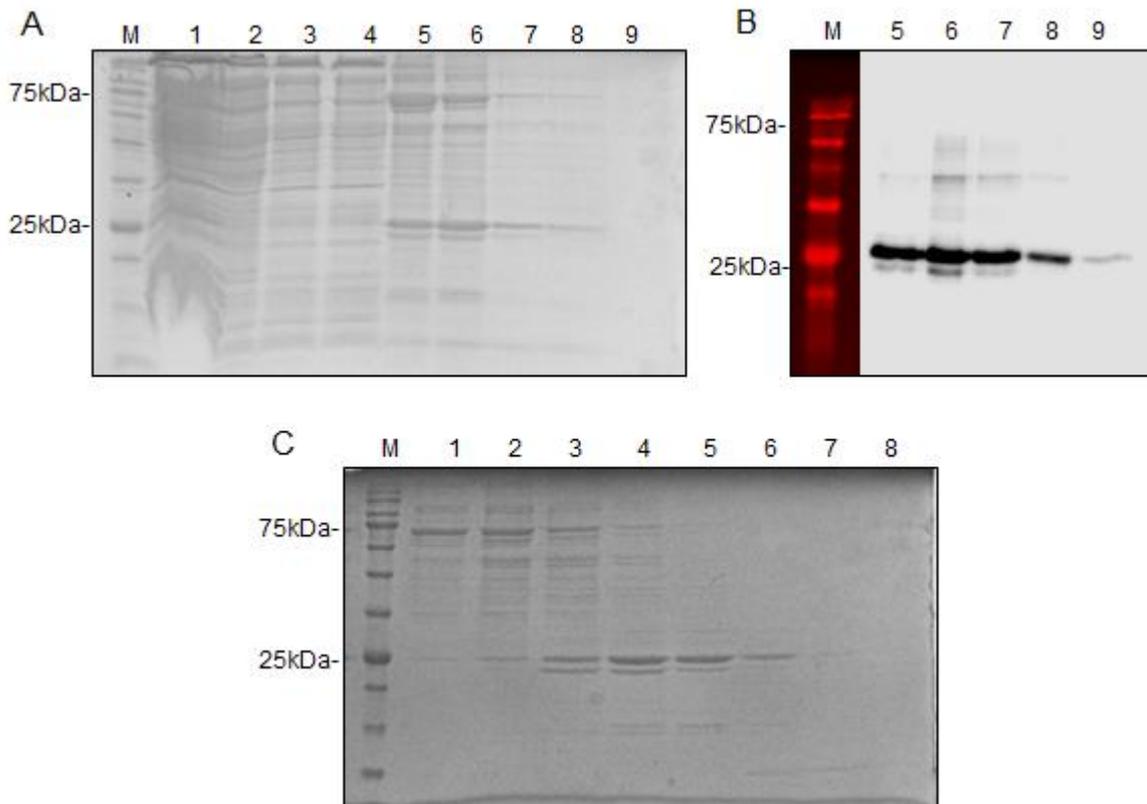


**Abb. 7: Immunoblot der Zelllysate mAt-FAX1/pBadMycHisA in *E. coli* BL21 bei 24°C uninduziert und induziert nach 6h.** (-) uninduzierte Überstandsfraktion (Ü) des Zelllysates. (+) induzierte Überstandsfraktion (Ü) des Zelllysates. Geladen wurden 20µl Probe. Marker: ROTI Mark Triocolor prestained, 5µl geladen. Detektion erfolgte mittels Primärantikörper anti-His (mouse) und Sekundärantikörper anti-mouse IgG HRP.

Auch die spezifischen FAX1 Antikörper ergaben ein deutliches Signal bei ca. 25 kDa, was der ungefähr errechneten Proteingröße des zu exprimierenden mAt-FAX1-Myc-6xHis entsprach. Im Folgenden wurde also davon ausgegangen, dass es sich bei diesem Signal um mAt-FAX1 handelt (ab hier als FAX1 bezeichnet).

#### 4.1.1.3 Etablierung der Aufreinigung von FAX1 aus *E. coli* Membranen

Um die erfolgreiche Insertion von FAX1 in die *E. coli* Membran nachzuweisen und letztlich Protein aufzureinigen, wurden nach Expression *E. coli* Membranen isoliert, aufgeschlossen und mittels Solubilisierungspuffer mit DDM als Detergenz, welches Mizellen mit Proteinen bildet und so Aggregate und Ausfällung des Membranproteins FAX1 vermeiden soll, aufgenommen. Die Aufreinigung von FAX1 erfolgte mittels des fusionierten 6xHis-Tags über eine Inkubation mit *Beads* aus Ni-NTA-Agarose, die mit dem His-tag interagieren und mit mikromolarer Affinität daran binden. Auf eine Chromatografie-Säule (Biorad Econo-Column, 2.5 × 20 cm) geladen, wurde dann FAX1 mit Imidazolkonzentrationen von 100 mM, 250 mM, 500 mM und 1M Imidazol ausgewaschen und die Fraktionen gesammelt und anschließend mittels SDS-Gelen und Westernblot analysiert (Abb. 8, A und B). Um die Reinheit des isolierten FAX1 Proteins für nachfolgende Analysen zu erhöhen wurde ein zweiter Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie durchgeführt (Abb. 8, C).



**Abb. 8: Coomassie gefärbte SDS-Gele, Immunoblot und Bestimmung der Proteinkonzentration nach Proteinaufreinigung von FAX1 aus *E. coli* Membranen.** (A) Coomassiegel der Proteinaufreinigung. 1+2: homogenisierte Membranen nach 1,5 h Inkubation mit Ni-NTA-Agarosebeads. 3: Eluat nach einem Säulenvolumen Waschpuffer mit 10 mM Imidazol. 4: Eluat nach dem zweiten Säulenvolumen Waschpuffer mit 10 mM Imidazol. Die weitere Elution der Fraktionen erfolgte mit je 2 ml Volumen. 5: Eluat mit 100 mM Imidazol. 6: Eluat mit 250 mM Imidazol. 7: Eluat mit 500 mM Imidazol. 8: Eluat mit 1 M Imidazol. 9: Eluat mit 1 M Imidazol zum zweiten Mal. (B) Immunoblot der Proteineluate 5-9 aus A. Aufgetragen wurden je 20µl Probe. Detektion erfolgte mittels Primärantikörper anti-His (mouse) und Sekundärantikörper anti-mouse IgG HRP. (C) Coomassiegel der Fraktionen der Gelfiltration nach Größenausschluss von 2,5 x konzentriertem aufgereinigtem Protein, bei 4 °C gelagert. 1: Fraktion A1; 2:A3; 3:A5; 4:A7; 5:A9; 6:A11; 7:B12; 8: B10. Bezeichnungen entsprechen den Fraktionen des Elutionsprofils (Anhang Abb. 46). Aufgetragen wurden je 20 µl Probe. Marker in A-C: FroggaBio BLUelf Prestained Proteinladder, 5 µl geladen.

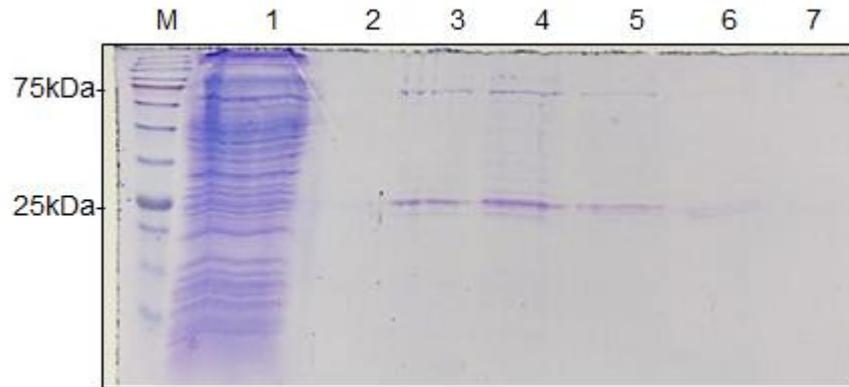
In Abb. 8, A wird gezeigt, dass auch nach zweimaligem Waschen mit 10 mM Imidazol der Durchfluss der Chromatographiesäule reich an Protein war (Spur 3 und 4). Des Weiteren zeigten auch die ersten Eluate mit 100 mM und 250 mM Imidazol der FAX1-Fraktionen eine hohe Kontamination an anderen Proteinen (Abb. 8 A, 5-6), obwohl eine Proteinanreicherung, manchmal in Form einer Doppelbande, um 25 kDa zu erkennen war, die FAX1 repräsentierte. In den folgenden Waschsritten (A, 7-9) nahm sowohl die Verunreinigung durch andere Proteine also auch die Anreicherung von FAX1 ab. Diese Anreicherung in den Fraktionen 5-9 bei ca. 25 kDa konnte mittels spezifischer His-Antikörper detektiert werden, wobei diese mit steigender Imidazolkonzentration abnahm (Abb. 8, B; Ladekontrolle Anhang Abb. 45). Es wurde folglich von einer erfolgreichen Isolation des Proteines FAX1 aus *E. coli* Membranen ausgegangen und weitere Reinigungsschritte mittels Größenausschlusschromatografie für die Fraktionen 5-9 angeschlossen.

Während der Gelfiltration wurden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt und eluiert. Abhängig vom Elutionszeitpunkt (ml), wurde die Absorption der Proteine bei 280nm in mAU (milli-Absorption-Unit)(Anhang Abb. 46). Im Elutionsprofil der Gelfiltrationen war ab einem Pufferdurchfluss von 7 ml bis zu etwa 16 ml ein Ausschlag erkennbar, mit einem Peak um 10 ml bis 500 mAU. Bei einer Durchflussrate von 16 ml bis 20 ml war ebenso ein weiterer deutlich geringer Ausschlag zu beobachten, der mit -200 mAU deutlich unter 0 blieb. Zur Analyse in welchen der zu betrachtenden Ausschläge im relativen Proteinquantifikationsprofil nun das Zielprotein vorhanden war, wurden Stichproben untersucht. Es konnte eine Anreicherung von FAX1 in den Fraktionen A3 bis A11 beobachtet werden. In den Fraktionen A5 – A9 trat FAX1 in einer Doppelbande auf. Da in den Fraktionen A7 bis A11 (Spur 4-6, Abb. 8, C) FAX1 im Vergleich zu Verunreinigungen im Überschuss vorlag, wurden diese Fraktionen zusammengeführt und erneut mittels Amicon-Zentrifugation konzentriert und die Proteinkonzentration photometrisch mittels BCA-Assay bestimmt. Es konnten so 450 µl aufgereinigtes FAX1 mit einer Konzentration von 1 mg/ml gewonnen werden.

Zusammengefasst konnte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Joanne Lemieux eine Integration von FAX1 in *E. coli* Membranen bestätigt und eine Methode zur Aufreinigung etabliert werden. Das Protokoll konnte in der AG Philippar reproduziert werden und sollte nun optimiert werden.

#### **4.1.1.4 Optimierung der FAX1 Proteinaufreinigung**

Um neben der Ausbeute auch die Reinheit des isolierten FAX1 Proteines zu optimieren, wurden in der Folge im Labor in Saarbrücken (AG Philippar), Universität des Saarlandes einige Bedingungen während der Aufreinigung variiert. Wie bereits in Abb. 8 A gezeigt werden konnte, war die Fremdproteinverunreinigung im Vergleich zur Anreicherung von FAX1 sehr hoch. Deshalb wurde zunächst zum einen die Menge an eingesetzten Beads aus Ni-NTA-Agarose auf 0,75 ml Beads pro 50 ml Membransuspension reduziert, sowie zum anderen deren Inkubationszeit mit den solubilisierten Membranen auf 45 min verringert. Weiterhin wurde der Waschpuffer zur Lösung unspezifischer Bindung vor Elution des FAX1 Proteins mit einer höheren Imidazolkonzentration versehen. Getestet wurden hier 20 mM Imidazol und 40 mM Imidazol. Erst folgende Kombination aller veränderten Bedingungen: 0,75 ml / 50 ml solubilisierter Membranen, Inkubation für 45 min und Waschpuffer mit 40mM Imidazol, konnten die Reinheit des isolierten FAX1 verbessern. Ein Coomassiegel der Aufreinigung unter den genannten Bedingungen ist in Abb. 9 dargestellt.



**Abb. 9: Coomassie gefärbtes SDS-Gel der optimierten Proteinaufreinigungsschritte von FAX1.** Aufgetragen wurden Eluate (Säulendurchfluss) je 20 µl Probenvolumen. Der Proteingehalt wurde nicht quantifiziert. 1 : homogenisierte Membranen nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarosebeads (pro 50 ml 0,75 ml Beads). 2 : Eluate nach zwei Säulenvolumen Waschpuffer mit 40 mM Imidazol. 3: Eluate mit 100 mM Imidazol. 4: Eluate mit 250 mM Imidazol. 5: Eluate mit 500 mM Imidazol. 6: Eluate mit 1 M Imidazol. 7: Eluate mit 1 M Imidazol zum zweiten Mal. Marker: ROTI Mark Triocolor prestained, 5 µl geladen.

Vergleichend zu der vorherigen Proteinaufreinigung von FAX1 (siehe Abb. 8), konnte diesmal, nach Erhöhung der Imidazolkonzentration im Waschpuffer, keine Verunreinigung durch Proteine nach den Waschrufen festgestellt werden (Abb. 9, Spur 2). Ebenso waren die Eluate des aufgereinigten FAX1 (Spur 3-7) deutlich weniger mit anderen Proteinen kontaminiert. Neben der Anreicherung von FAX1 um ca. 25 kDa in Spur 3-5, war ebenso eine, wenn auch geringere, Proteinanreicherung um 75 kDa zu erkennen. Eine Antikörperdetektion (Anhang Abb. 47) konnte zeigen, dass durch den Einsatz reduzierter Nickelbead-Mengen kein oder kaum ungebundenes FAX1 verloren ging. Es war im Durchfluss des Ladegemisches der Chromatographiesäule kein vermehrtes Signal der Antikörper zu erkennen (Anhang Abb. 47 Spur 1). Weiterhin schien der höhere Imidazolgehalt im Waschpuffer nur bedingt FAX1 spezifisch auszuwaschen (leichtes Hintergrundsignal auf FAX1 Höhe, Anhang Abb. 47 . Spur 4). Hingegen waren in den FAX1 Eluaten (Spur 5-7) deutliche Signale der Antikörper mittels ECL zu detektieren. Generell führte eine verringerte Menge der eingesetzten Nickelbeads, eine Reduktion der Inkubationszeit und eine höhere Imidazolkonzentration im Waschpuffer zu einer besseren Aufreinigung.

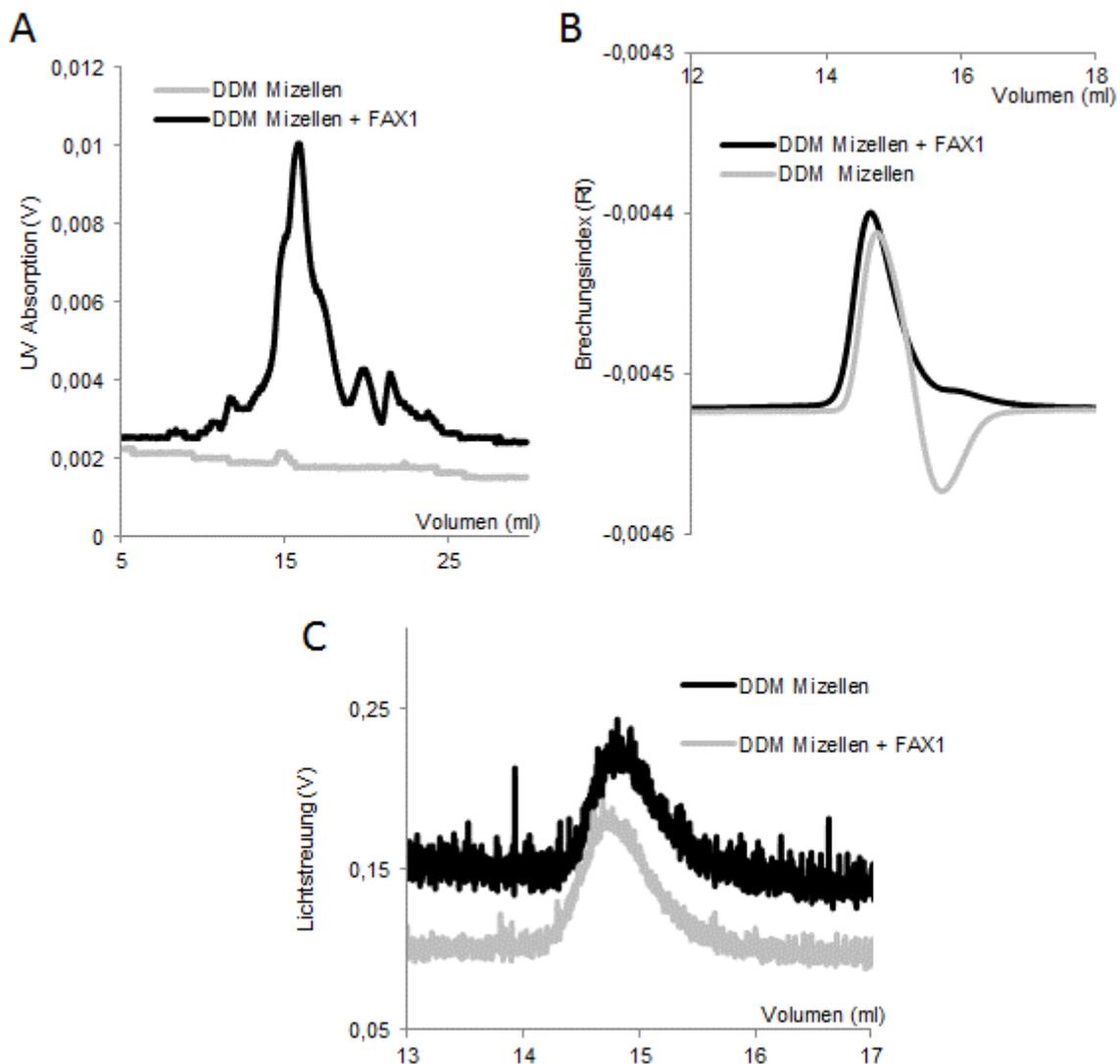
Abschließend kann also festgehalten werden, dass die Expression des Membranproteins FAX1 in *E. coli* und dessen Aufreinigung aus *E. coli* Membranen etabliert und optimiert werden konnte. Eine detaillierte und finale Version des optimierten Expressions- und Aufreinigungsprotokolles ist in Material und Methoden beschrieben.

#### 4.1.1.5 Analysen mittels *Size-Exclusion-Chromatography-Multi-Angle-Light-Scattering* (SECMALS) und Dynamischer Lichtstreuung (DLS)

Während des Forschungsaufenthaltes in Kanada konnten mit Hilfe der AG Lemieux ausgehend von einer Konzentration von 1mg/ml des Proteins FAX1 bereits Analysen mittels *Size-Exclusion-Chromatography-Multi-Angle-Light-Scattering* (SECMALS) und dynamischer Lichtstreuung (DLS, *Dynamic Light Scattering*) durchgeführt werden. So sollten Hinweise auf

Mizellgrößenverteilung und Molekulargewicht der Mizellen erlangt werden, welche das Detergenz DDM zusammen mit FAX1 bildet, um die Integration des Proteins in die Mizellen nachzuweisen. Weiterführend sollte so analysiert werden, ob FAX1 in den Mizellen als Mono- oder Oligomer vorlag.

Mittels einer SEC-MALS-Analyse wurden zum einen zum Proteinnachweis in der Probe die UV-Absorption bei 280nm gemessen und zum anderen der Brechungsindex und die statische Lichtstreuung der Mizellen untersucht, um später das Molekulargewicht zu kalkulieren. Vergleichend wurden hier DDM-Mizellen (negative Kontrolle) und DDM-Mizellen mit FAX1 betrachtet (Abb. 10).

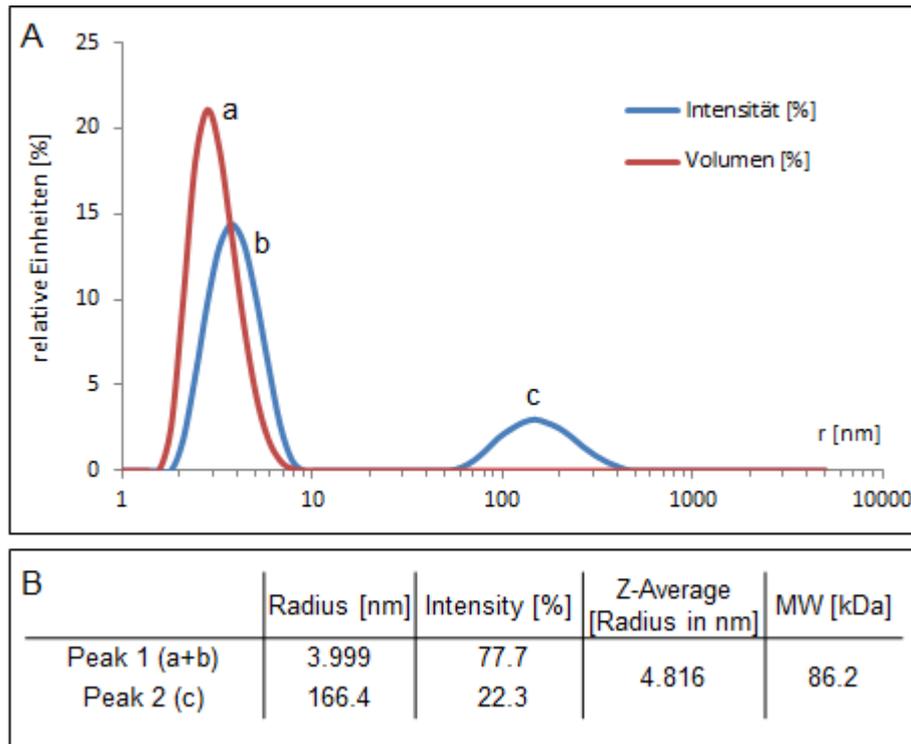


**Abb. 10: SEC-MALS Analyse von DDM-FAX1-Mizellen.** (A) Gemessene UV-Absorption in Volt [V] bei 280nm, (B) Brechungsindex (RI) und (C) statische Lichtstreuung in Volt [V] der DDM-Mizellen (negative Kontrolle) und DDM-FAX1-Mizellen mittels SEC-MALS-Analyse. Negativkontrolle: DDM-Mizellen in hellgrau. DDM-Mizellen mit FAX1 in schwarz. (A) UV-Absorption bei 280 nm in Volt. (B) Brechungsindex (RI). (C) statische Lichtstreuung in Volt. X-Achse entspricht dem jeweiligen Durchflussvolumen in ml der Chromatographiesäule Superdex 200 increase.

In Abb. 10, A ist erkennbar, dass DDM-Mizellen alleine keinen Peak im Absorptionsspektrum bei 280 nm aufwiesen, während DDM-Mizellen mit FAX1 einen deutlichen Peak mit einem Maximum um 16 ml Durchfluss zeigten, gefolgt von zwei weiteren deutlich kleineren Ausschlägen. Die Messung der verursachten Lichtbrechung (Brechungsindex) der Mizellen ergab für beide Proben einen vergleichbaren Peak mit einem Maximum bei ca. 14,5 ml Durchfluss der Säule. Das Minimum der DDM-Mizellen ohne FAX1 bei ca. 15,5 ml ist untypisch für solche Messungen (Rücksprache mit Dr. Anne Grethen, AG von Prof. Dr. Sandro Keller, TU Kaiserslautern) und war deshalb als Artefakt zu werten (Abb. 10, B). Auch für die Betrachtung der statischen Lichtstreuung konnten für DDM-Mizellen ohne und mit FAX1 ähnliche Resultate beobachtet werden. Beide Proben zeigten einen Peak um 15 ml, wobei das Maximum der Mizellen mit FAX1 hier geringfügig nach links verschoben war. Der Basislevel der Mizellen ohne FAX1 war mit 0,15 V höher als bei Mizellen mit FAX1 (ca. 0,1 V) (Abb. 10, C). Anhand dieser Daten konnten sowohl für Mizellen ohne als auch mit FAX1 ein Molekulargewicht um ca. 90 kDa ermittelt werden (Anhang Abb. 48).

Fraktionen der Mizellen mit FAX1 wurden entsprechend der Durchflussvolumina 14 ml bis 20 ml (Peaks in der UV-Absorption bei 280 nm) zum Nachweis von FAX1 auf einem Coomassiegel (Anhang, Abb. 49) betrachtet. Hier konnte vor allem in den Proben von ca. 15 ml bis 17 ml (Fraktionen C8-D1) eine Proteinanreicherung um 25 kDa beobachtet werden, was in etwa der Größe von FAX1 entsprach. Ebenfalls war hier wieder eine zweite, in der Intensität geringere, Proteinbande erkennbar.

Um die Mizellen mittels einer weiteren Methode zu untersuchen wurden ergänzend DLS - Messungen durchgeführt. In Abb. 11, A ist die Verteilung der Mizellgrößen nach hydrodynamischem Radius in nm einmal anhängig von der Intensität der Lichtstreuung [%] und einmal vom Anteil des Volumens [%], also der Massenverteilung der Gesamtpartikel dargestellt. Die Intensitätenverteilung, sowie die gemittelten Radien der verschiedenen Peaks und ebenfalls der mittlere Radius bezogen auf alle Partikel in der gemessenen Probe (Z-Average) und die daraus resultierende Molekularmasse konnten daraufhin berechnet werden (Abb. 11, B und C).



**Abb. 11: DLS-Analysen der DDM-FAX1-Mizellen.** Grafische Darstellung der DLS-Messung und der daraus hervorgehenden Messwerte für Partikelradius [nm] bezogen auf Intensität der Lichtstreuung (blau) [%] und auf den Volumenanteil innerhalb der Probe (rot) [%], sowie Kalkulation der mittleren Radiusgröße innerhalb der Probe (Z-Average), Intensität [%] und Molekularmasse [kDa]. (A) Blau: Radius [nm] bezogen auf die relativ gemessene Intensität der Lichtstreuung [%]. Rot: Radius [nm] bezogen auf den relativ gemessenen Volumenanteil der gesamten Probe [%]. (B) Kalkulation/Output des DLS-Computerprogrammes. Z-Average (Radius in nm): mittlerer Radius innerhalb der Probe. Radius in nm: gemittelter Radius innerhalb der Partikel des jeweiligen Peaks. Intensität [%] : Prozentualer Anteil an der gemessenen Lichtstreuung. (C) kalkuliertes Molekulargewicht (MW) [kDa]: mittlere Molekulare Masse der detektierten Partikel.

Deutlich erkennbar ist, dass sich die grafischen Darstellungen der kalkulierten Partikelradien bezogen auf die Intensität (blau) und das Volumen (rot) unterscheiden. Wird der Bezug zur Intensität hergestellt, was Rückschlüsse darauf zulässt, wie hoch die gemessene Intensität der Lichtstreuung ist, sind zwei Peaks zu erkennen. Der erste Peak bei ca. 3,7 nm Radius mit einer Intensität von 14 % und der zweite bei ca. 148 nm mit einer Streuintensität von 3 %. Wird hingegen der Volumenanteil der Partikel mit dem jeweiligen Radius betrachtet, also der Anteil der Massenverteilung innerhalb der Probe, so konnte nur ein Peak bei einem Radius von ca. 3,2 nm Volumenanteil von knapp 19 % beobachtet werden (Abb. 11, A). In der Kalkulation wurden alle Werte mitberücksichtigt, woraus sich aus allen Partikeln ein mittlerer Radius von 4,8 nm ergab (Z-Average). Die mittleren Radien der errechneten Peaks (Peak 1) lagen bei ca. 4 nm und 166 nm (Peak 2), wobei von Peak 1 77,7 % der insgesamt gemessenen Streuintensität ausgingen, während Peak 2 etwa ein Fünftel aufwies. Für die Mehrheit der Partikel resultierte daraus eine mittlere Partikelmasse von 86,2 kDa (Abb. 11, B). In beiden Versuchsansätzen (SEC-MALS und DLS) konnten Molekulargewichte um 90 kDa für DDM-Mizellen mit FAX1 ermittelt werden.

## 4.2 Charakterisierung der Proteine FAX4, FAX5, FAX6 und FAX7

Die Rolle der FAX-Proteine, genauer FAX4, FAX5, FAX6 und FAX7, im Fettsäure- und Lipid Haushalt der Pflanze sollte mittels Sequenzanalysen, Identifizierung und Charakterisierung von *Arabidopsis*-Mutanten, Lokalisationsstudien und funktionellen Transportassays genauer betrachtet werden, um Rückschlüsse über deren Funktion und Lokalisation zu erlangen.

### 4.2.1 Sequenzanalysen der FAX-Proteine

Ziel war es mittels Sequenzanalysen die Familie der FAX-Proteine letztlich zu definieren und die Ähnlichkeiten der Proteine untereinander zu bestimmen. Weiterführend sollten konservierte Domänen und Motive der einzelnen FAX Proteine identifiziert werden, um Rückschlüsse auf deren Bedeutung und Funktion, vergleichend mit der Literatur ziehen zu können. Außerdem sollte die Verbreitung der FAX-Proteine in Vertretern des ganzen Pflanzenreiches untersucht werden, um so deren Rolle bei der Entwicklung verschiedener Arten einzugrenzen. Im Rahmen dieser Arbeit generierte Daten sind in den Publikationen Könnel *et al.* (2019) und Bugaeva *et al.* (2021) enthalten, weshalb im Folgenden eine Zusammenfassung der Ergebnisse gezeigt wird.

#### 4.2.1.1 Definition und Analysen der FAX-Proteinfamilie

Wie bereits Li *et al.* (2015), postulierte, konnten in *Arabidopsis* sieben Proteine der FAX-Familie zugeordnet werden, die alle zur Klasse der TMEM14 Proteine gehören (Bugaeva *et al.*, 2021). Um die FAX-Proteine genauer bezüglich ihrer Verwandtschaftsverhältnisse zu untersuchen, wurden zunächst alle Sequenzen der FAX-Proteine in *Arabidopsis* hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit mittels Sequenzvergleiche und Identitätsberechnungen betrachtet und ebenso mit Programmen zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation analysiert. Die wichtigsten Erkenntnisse sind in Tab. 12 aufgeführt.

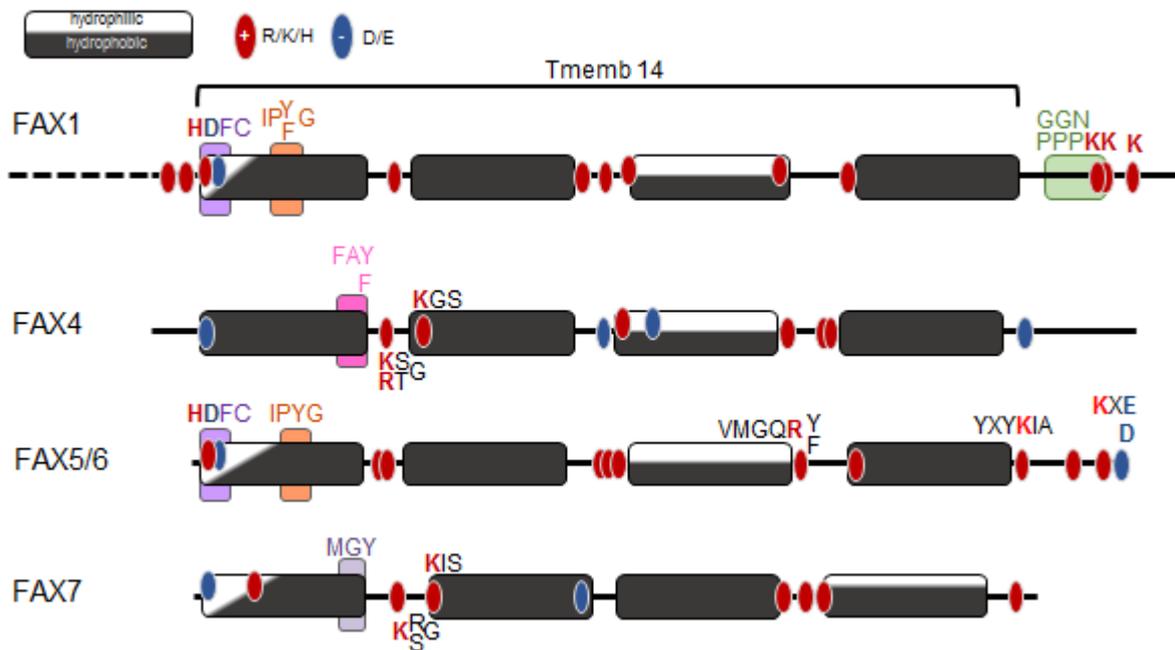
**Tab. 12: Zusammenfassende Tabelle der FAX-Proteinfamilie in *Arabidopsis*.** Proteinname, *Arabidopsis Genome Initiative* (AGI) codes, die Länge der Aminosäuresequenz des Preproteins (pre), Länge des N-terminal vorhergesagten Chloroplast targeting Peptides (cTP) und Molekulargewicht des maturen Proteines in kDa. Außerdem die die vorhergesagte Lokalisation (loc score) und deren experimenteller Nachweis (exp). Plastidäre Hüllmembranlokalisierung von At-FAX4 (4: (Li *et al.*, 2020)). cTPs wurden mit ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999) vorhergesagt. Im Falle von FAX4 alternatives cTP (nur Tmemb\_14 Domäne berücksichtigt). Die Lokalisationsvorhersage (loc score) in *Arabidopsis* erfolgte aus Aramemnon (AramLocCon; (Schwacke *et al.*, 2003)). C: Chloroplast; m: Mitochondrium; sp: sekretorischer Syntheseweg. Tabelle aus Bugaeva *et al.* (2021), verändert.

name	AGI code	pre [aa]	cTP [aa]	mat [kDa]	loc score	exp
<i>Arabidopsis</i>						
FAX4	At1g33265	177	63/37	18.4/21.2	20.6 (c)	env <sup>4</sup>
FAX5	At1g50740	119		12.5	25.7 (sp)	-
FAX6	At3g20510	119		12.5	25.7 (sp)	-
FAX7	At2g26240	108		11.1	8.6 (sp)/7.3 (m)	-

Die vorhergesagte Lokalisation in chloroplastidären Hüllmembranen, konnte für FAX1, FAX2, FAX3 und FAX4 bereits bestätigt werden (Li *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Bugaeva *et al.*, 2021). Anhand der Sequenzen konnte für FAX5, FAX6 und FAX7 eine Lokalisation in Membranen des sekretorischen Syntheseweges vorhergesagt werden, wobei FAX7 zusätzlich dual in Mitochondrien lokalisiert sein könnte. Im Falle von FAX4 wurden zwei Vorhersagen ermittelt. Wurde die gesamte codierende Sequenz betrachtet, konnte ein cTP (*chloroplast targeting peptid*) in der Länge von 63 Aminosäuren errechnet werden (ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999). Bei der gesonderten Betrachtung der N-terminalen Region ergab sich ein kürzeres cTP mit 37 Aminosäuren (Tab. 12), welches in dieser Arbeit als wahrscheinlicher angenommen wurde, da es nicht bis innerhalb der ersten Transmembrandomäne reichte. Insgesamt besitzen alle FAX-Proteine vier konservierte  $\alpha$ -Helices, welche eine Tmemb\_14 Domäne (Pfam PF03647) bilden. Während mature, plastidäre FAX-Proteine (FAX1-4) einen verlängerten und unterschiedlichen N-Terminus aufweisen (siehe Bugaeva *et al.*, 2021), bestehen FAX5-FAX7 weitestgehend aus der Tmemb\_14 Domäne (Abb. 12). Innerhalb dieser Domäne konnte eine hohe Ähnlichkeit zwischen FAX1 und FAX5/6 (Könnel *et al.*, 2019), sowie FAX3 und FAX7 (Bugaeva *et al.*, 2021) gezeigt werden. Für FAX5 und FAX6 konnte eine Identität auf Aminosäuresequenz von 81% beschrieben werden (Könnel *et al.*, 2019).

#### 4.2.1.2 Identifizierung konservierter Domänen und Motive

Anschließend wurden mittels Datenbanksuche, Verwandte der At-FAX-Proteine in anderen Pflanzenarten identifiziert, um so die Verteilung der FAX-Proteine im gesamten Pflanzenreich zu bestimmen. Mittels Sequenzvergleich erfolgte die Charakterisierung konservierter Domänen und Motive innerhalb der jeweiligen FAX-Sequenzen, um Rückschlüsse auf die Funktion und Topologie der FAX-Proteine zu ziehen (detaillierte Information in Könnel *et al.*, 2019; Bugaeva *et al.*, 2021). Ebenso sollten *Helical Wheel*-Analysen (Bugaeva *et al.*, 2021, für FAX4-FAX7 Anhang Abb. 50) Aufschluss über die Ladungsverteilung innerhalb der Transmembrandomänen und den daraus möglich resultierenden amphiphilen Charakter der Helices geben. Eine Übersicht der Ergebnisse dieser Analysen bezüglich der Tmemb14 Domäne von FAX4-7 ist schematisch in Abb. 12 dargestellt.



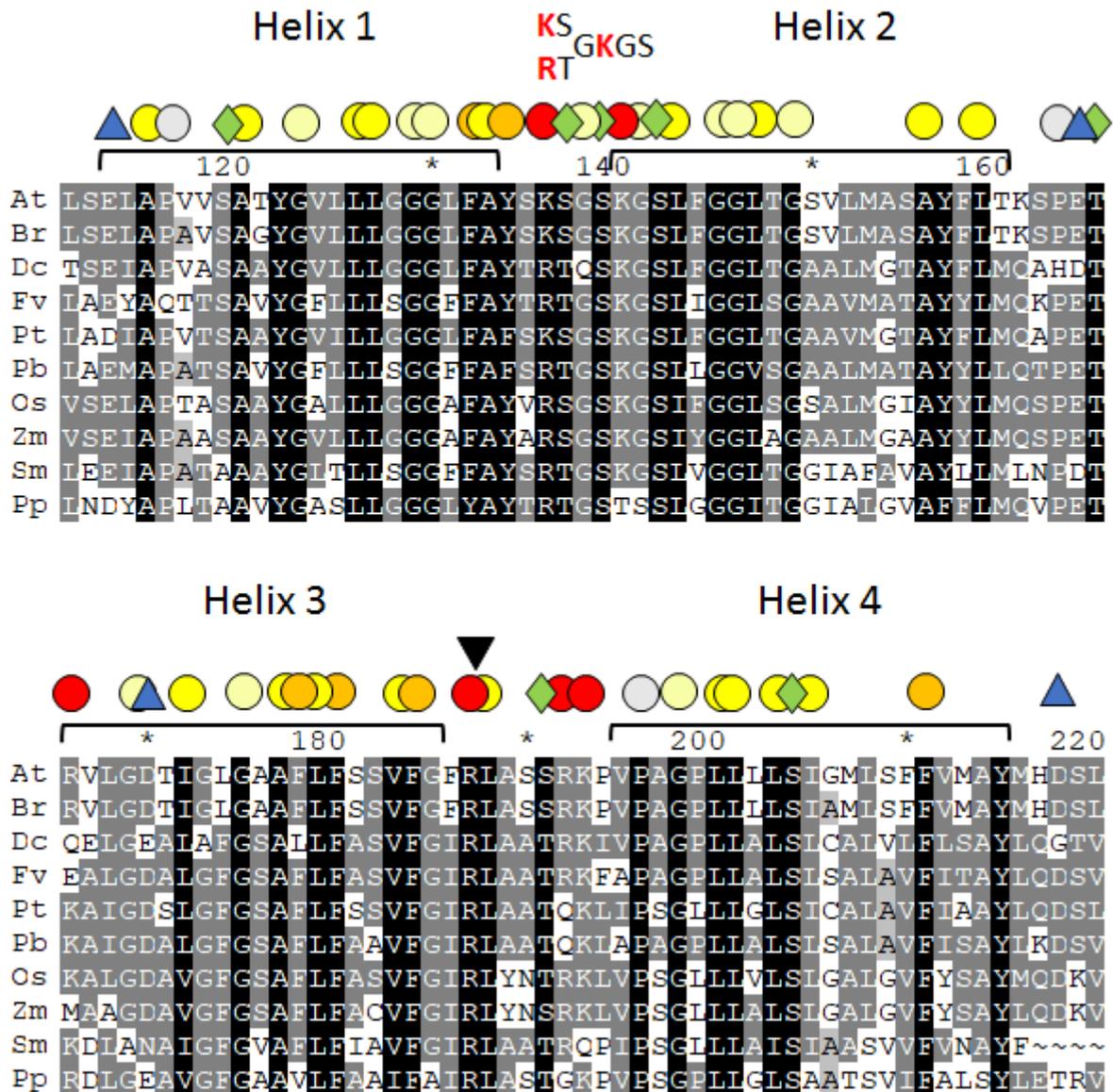
**Abb. 12: Schematische Darstellung der konservierten Motive innerhalb der Tmemb\_14 Domäne der FAX-Proteine.** Gezeigt sind FAX1 und FAX4 bis FAX7, inklusive der konservierten Tmemb\_14 Domäne (pfam PF03647), und Termini. Die Tmemb\_14 Domäne besteht aus vier  $\alpha$ -Helices (Rechtecke) mit hydrophilen (weiß) und/oder hydrophoben (schwarz) Seiten. Die konservierte Verteilung positiv (R, K, H; rote Punkte) und negativ (D, E; blaue Punkte) geladener Aminosäuren. Konservierte Sequenzmotive werden durch farbige Boxen und der Konsensussequenz repräsentiert. FAX5 und FAX6 sind aufgrund gleicher konservierter Motive und Domänen zusammengefasst. Die Polypeptidketten (schwarze Linien) sind maßstabsgetreu wiedergegeben. C-Terminus von FAX1 wird nur durch ein Viertel der eigentlichen Gesamtlänge repräsentiert (gestrichelte Linie). Aminosäuren im Einbuchstabencode. Aus Bugaeva *et al.* (2021).

Generell konnte gezeigt werden, dass alle FAX-Proteine innerhalb der Tmemb\_14 Domäne mindestens eine amphiphile und mindestens zwei hydrophobe  $\alpha$ -Helices besitzen. Außerdem konnten allen FAX-Proteinen, konservierte Motive oder Ladungsverteilungen zugeordnet werden (Abb. 12). FAX1, FAX2, FAX3 und FAX5/6 sind im gesamten Pflanzenreich konserviert und konnten in Di- und Monokotyledonen, aber auch in Moosen und Grünalgen gefunden werden. FAX2 schien spezifisch für Samenpflanzen. FAX7 war weniger konserviert und nur in einigen Pflanzenspezies zu finden (Anhang Abb. 51 für FAX7, für FAX1 und FAX5/6 siehe Könnel *et al.*, 2019; Bugaeva *et al.*, 2021). Für FAX4 konnte vor und innerhalb der zweiten Helix ein konserviertes Motiv mit positiven Ladungen („KS/RTGKGS“) in den untersuchten Pflanzensequenzen identifiziert werden. Mittels *Helical Wheel*-Analysen konnte ein amphiphiler Charakter der dritten Helix in FAX4 beschrieben werden. Auffällig war auch die Anhäufung konservierter Ladungen um diese Helix (Abb. 12, Anhang Abb. 52). Für FAX5/6 konnte in *Helical Wheel*-Analysen vergleichend zu FAX1 gezeigt werden, dass sowohl in beiden Proteinen Helix 1 als auch Helix 3 amphiphil waren. Gerade in der ersten  $\alpha$ -Helix waren konservierte Bereiche und Motive („HDFC“ und „IPY/FG“) nahezu identisch. Während die geladenen und polaren Reste in beiden Proteinen in Helix 1 eher N-terminal gehäuft auftraten verteilten sie sich in Helix 3 jeweils gleichmäßiger. Hier konnte in FAX5/6 zusätzlich ein konserviertes „VMGQRY/F“ Motiv bestimmt werden. Sowohl in FAX1, als auch in FAX5/6 häufte sich die Konservierung von geladenen Aminosäureresten am C-Terminus

des Proteins (Abb. 12, siehe Könnel *et al.*, 2019). In FAX5/6 zeichneten sich C-terminal daraus die Motive „YXYKIA“ und „KXE/D“ ab. Bei FAX7 ergab sich ein amphiphiler Charakter der ersten und vierten Helix (Anhang Abb. 50). Am C-Terminus von FAX5/6 konnte zusätzlich ein konserviertes „KXE/D“ Motive identifiziert werden. Die angehäuften Abfolge, konservierter positiver Ladungen („KR/SG“ und „KSL/KIS“) und Motive („MGY“), welche innerhalb der ersten und zweiten Helix von FAX7 identifiziert wurden, war sehr ähnlich zu FAX3 (Abb. 12).

#### **4.2.1.3 Identifizierung konservierter Domänen und Motive des Proteins FAX4**

Da die Sequenzanalysen des Proteins FAX4 bislang nur auf wenigen Sequenzen basierten und innerhalb der Tmemb\_14 Domäne wenig Ähnlichkeiten in konservierten Motiven oder Ladungen zu anderen FAX-Proteinen beobachtet werden konnten, wurde hier eine erneute, ausführliche Datenbankanalyse nach At-FAX4 ähnlichen Sequenzen durchgeführt. So sollte die Verteilung des Proteins FAX4 im Pflanzenreich noch einmal vertieft betrachtet werden. Hier konnten anders als bisher doch Vertreter von FAX4 im gesamten Pflanzenreich, also Landpflanzen bis hin zu Moosen, ebenso einigen wenigen Cyanobakterien und Bakterien identifiziert werden (Dr. Alexander Banguela-Castillo, Prof. Dr. Katrin Philipp, unveröffentlicht). Anhand dieser Sequenzen sollten die bereits identifizierten konservierten Domänen und Motive innerhalb der FAX4 Proteine (vgl. Abb. 12) bestätigt, sowie neue charakterisiert werden. Hierzu wurden die FAX4 Präproteine repräsentativer Landpflanzen verglichen (Anhang Abb. 52) und die Konservierung der Aminosäuren betrachtet. Weitergehend wurden innerhalb der Tmemb\_14 Domänen konservierte Domänen und Motive untersucht und entsprechend markiert (Abb. 13).



**Abb. 13: Sequenzen der Temb<sub>14</sub> Domänen von FAX4 Proteinen in unterschiedlichen Landpflanzen.** Aminosäuren sind entsprechend ihrer Position im Präprotein nummeriert. Vorhergesagte Helices (nach Aramemnon database "TM alpha helix prediction consensus" für At-FAX4 (AramTmCon, <http://aramemnon.uni-koeln.de>; Schwacke *et al.*, 2003) sind durch schwarze Klammer markiert. Konservierte Aminosäurereste in schwarz (100%), dunkelgrau (50%) und hellgrau (25%). Konservierte Motive, positiv geladen (roter Kreis), negativ geladen (blaues Dreieck), ungeladen (grüner Diamant), hydrophob (gelber Kreis), amphiphil (orangener Kreis). „Positiv-hydrophobe“ Motive sind durch Pfeile, Prolin durch graue Kreise, Glycin hellgelb markiert. Das konservierte Motiv „KS/RTGKGS“ ist angegeben. At, *Arabidopsis thaliana*; Br, *Brassica rapa*; Dc, *Dacus carota*; Fv, *Fragaria vesca*; Pt, *Populus trichocarpa*; Pb, *Pyrus bretschneideri*; Os, *Oryza sativa*; Zm, *Zea mays*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Pp, *Physcomitrium patens*. Aminosäuren im Einbuchstabencode.

Der Vergleich der Präproteine (Anhang Abb. 52) zeigte, dass im Gegensatz zur Tmemb<sub>14</sub> Domäne mit ihren vier Helices, sowohl N- und C-Terminus der FAX4 Proteine innerhalb des Pflanzenreiches wenig konserviert und sehr variabel vorliegen. Innerhalb der Tmemb<sub>14</sub> Domäne war die Konservierung der Aminosäuresequenzen recht hoch. Besonders die Bereiche ab Mitte Helix 1 bis Mitte Helix 2 und Mitte Helix 3 bis Mitte Helix 4 weisen

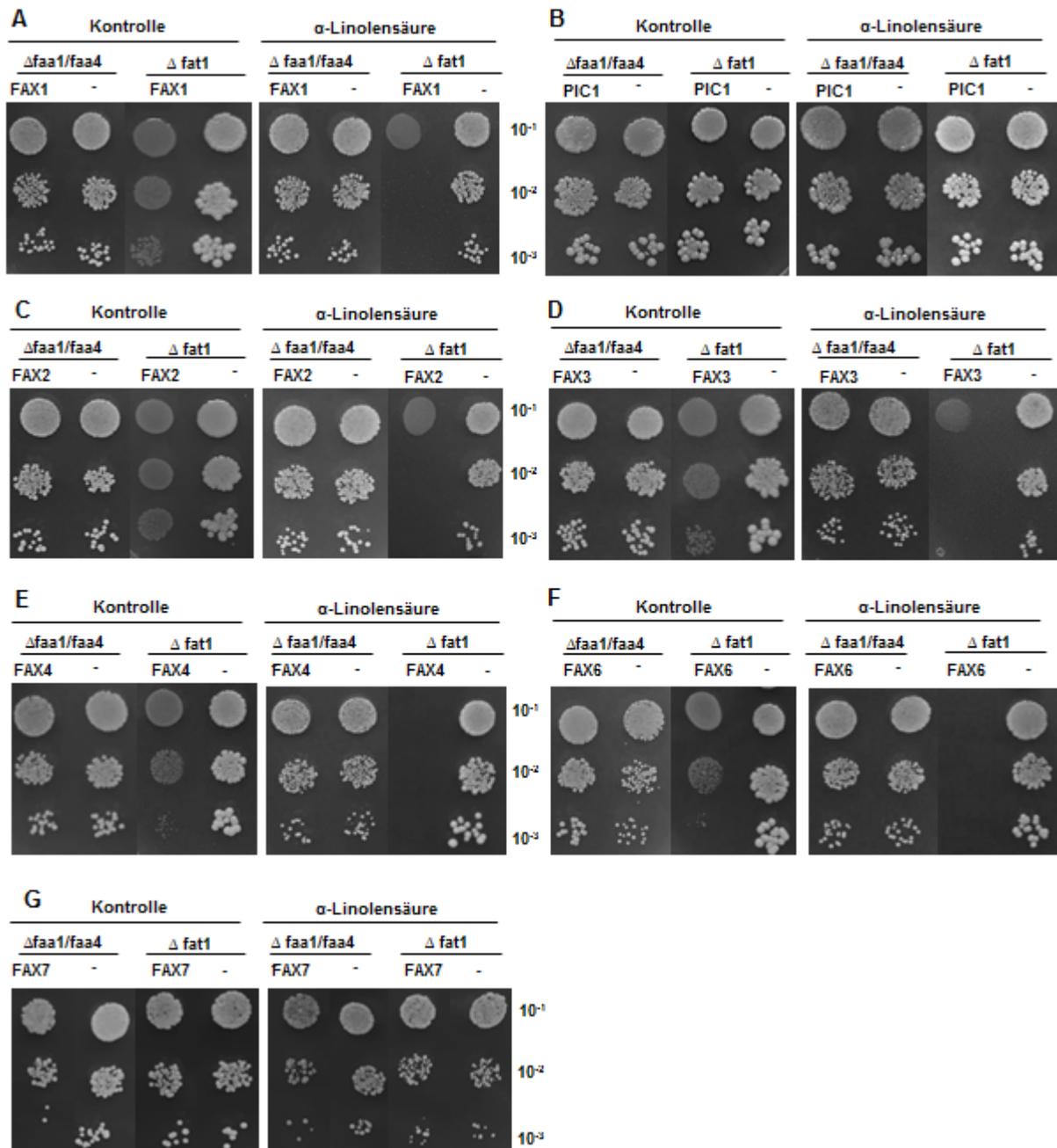
vermehrt zu 100% konservierte Aminosäuren auf. Am Ende der ersten Helix ist die Aminosäureabfolge „FAY/F“, bestehend aus drei Aminosäuren mit hydrophoben Resten in allen gezeigten Organismen zu finden. Weiterhin konnte direkt folgend zwischen erster und zweiter Helix ein stark konserviertes Motiv „KS/RTGKGS“ mit zwei positiv geladenen Aminosäureresten identifiziert werden. Zu Beginn der dritten Helix, welche als amphiphil charakterisiert wurde (siehe oben) wechseln sich konservierte negative und positive Ladungen ab. Im hinteren Bereich der Helix treten in allen Pflanzen vermehrt hydrophobe Aminosäuren auf, gefolgt von einem „positiv-hydrophoben“ Motiv „RL“ (schwarzer Pfeil). Zwischen dritter und vierter Helix konnten zwei weitere konservierte, positiv geladene Aminosäurereste identifiziert werden (Abb. 13).

#### 4.2.2 Funktionelle Analysen der FAX-Proteine in Hefezellen

Li *et al.* (2015) konnten bereits für das Protein FAX1 mittels eines Komplementationsassays in Hefe die Funktion als Transporter für Fettsäuren bestätigen. Im Folgenden sollten deshalb auch weitere Mitglieder der FAX-Familie hingehend ihrer Rolle im Fettsäuretransport analysiert werden.

##### 4.2.2.1 Funktioneller Transportassay in *Saccharomyces cerevisiae*

Um die Funktion der FAX-Proteine als Fettsäuretransporter zu untersuchen, wurde der Komplementationsassay (Drop-Dilution-Test) in *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) analog zu Li *et al.* (2015) durchgeführt. Dieser basiert auf der Toxizität von  $\alpha$ -Linolensäure in hohen Konzentrationen, die bei Zugabe zum Medium, dazu führen, dass Hefezellen mit einem intakten FA Import und Aktivierungssystem absterben (Li *et al.*, 2015; von Berlepsch *et al.*, 2012). In Hefe ist der FA Import abhängig vom Prozess der vektorialen Acylierung und wird über einen Proteinkomplex vermittelt. Fat1p stellt hierbei ein membranständiges Transportprotein und Faa1p oder Faa4p, beides Acyl-CoA Synthetasen, koppeln die zu transportierenden FAs intrazellulär an Acyl-CoA (Black and DiRusso, 2003). Für die Analysen wurden die Hefe-Deletionsstämme  $\Delta fat1$  und  $\Delta faa1/faa4$  genutzt, in denen jeweils das wildtypische *Fat1* Gen oder die *Faa1/Faa4* Gene mittels Disruption über spezifische Gen-Kassetten entweder ausgeschaltet oder unterbrochen sind. Diese Hefestämme wurden mit den kodierenden Sequenzen der murenen At-FAX-Proteine (*FAX1*, *FAX2*, *FAX3*, *FAX4*, *FAX6* und *FAX7*) und der Sequenz für das Eisentransportprotein PIC1 (*permease in chloroplasts 1*) im Hefevektor pDR195 (Anhang Abb. 53) transformiert. PIC1 diente in diesem Versuch als Kontrollprotein, da er durch vier  $\alpha$ -Helices und der Lokalisation in der inneren Hüllmembran (IE) von Chloroplasten eine strukturelle Ähnlichkeit zu den FAX-Proteinen besitzt (Duy *et al.*, 2007). Zusätzlich dienten transformierte Hefezellen mit dem Leervektor pDR195 als Kontrolle. Das Wachstum der Hefezellen auf Kontroll- und  $\alpha$ -Linolensäurehaltigen Agarplatten wurde nach zwei Tagen Inkubation fotografisch dokumentiert (Abb. 14). Zusätzlich wurden Wachstumskurven in Flüssigmedium ohne  $\alpha$ -Linolensäure erstellt, um die generelle Fitness der Hefezellen zu überprüfen (Anhang Abb. 54).



**Abb. 14: Funktioneller Transportassay der FAX-Proteine in *S. cerevisiae*.** Die Hefemutanten *fat1* und *faa1/faa4* wurden jeweils mit einem Protein-Vektorkonstrukt und dem leeren Plasmid pDR195(-) transformiert. At-FAX1/pDR195 (A) diente hierbei als Positivkontrolle (Li *et al.*, 2015); AtPIC1/pDR195 (B) als Negativkontrolle. At-FAX2/pDR195 (C), At-FAX3/pDR195 (D), At-FAX4/pDR195 (E), At-FAX6/pDR195 (F) und At-FAX7/pDR195 (G). Der Drop-Dilution-Test erfolgte mit 2  $\mu$ l Flüssigkulturen der Hefen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 in 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> und 10<sup>-3</sup> Verdünnungen auf SC-ura-Platten (0,1 % Glucose, 1 % Tergitol). Die Kontrollplatten (links) im Vergleich zu den Platten mit 3,6 mM  $\alpha$ -Linolensäure (rechts). Probe und zugehörige Kontrolle (-) wurden immer auf einer Platte und doppelt getropft. Gezeigt sind repräsentative Fotos von mind. n=3 unabhängigen Versuchen (für FAX7 n=1). Teile dieser Abbildung erschienen in der Bachelorarbeit von Julia Mees (2019) und sind Teil von Bugaeva *et al.* (2021).

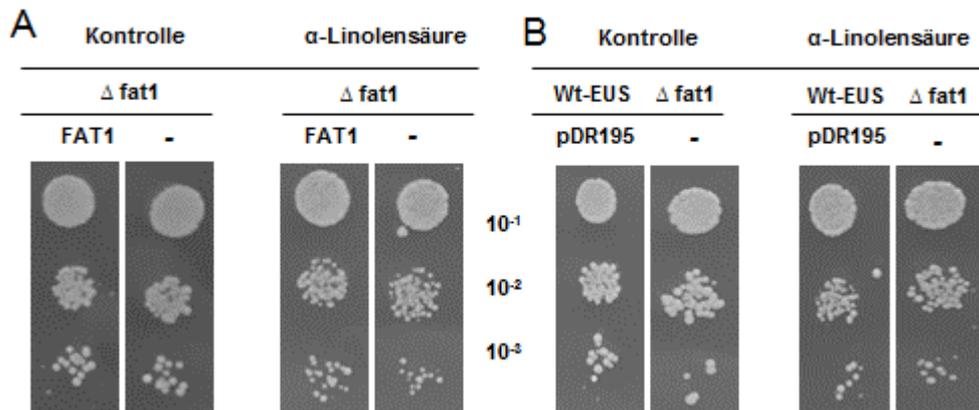
Abb. 14 zeigt, dass  $\Delta fat1$  Hefezellen, die ein FAX-Protein (FAX1, FAX2, FAX3, FAX4 oder FAX6) exprimieren, abstarben, wenn sie Medium mit 3.6 mM  $\alpha$ -Linolensäure ausgesetzt waren (Abb. 14, C-G). Für die Konstrukte FAX1/pDR195, FAX2/pDR195 und FAX3/pDR195 konnte bei der geringsten Verdünnungsstufe noch Zellwachstum beobachtet werden (Abb. 14 A, C und D), während für FAX4/pDR195 in keiner Verdünnungsstufe Zellen wuchsen (Abb. 14, E). Im Gegensatz dazu überlebten  $\Delta fat1$  Hefezellen, welche FAX7/pDR195, pDR195 Leervektor oder AtPIC/pDR195 trugen (Abb. 14, B und G) unabhängig der Verdünnungsstufe. Die Hefemutanten der Acyl-CoA Synthetasen für intrazelluläre FA Aktivierung ( $\Delta faa1/faa4$ ) wurden in allen Fällen (Abb. 14, A-G) nicht durch die Anwesenheit von 3.6mM  $\alpha$ -Linolensäure im Wachstum gehemmt.

Generell zeigte sich beim Wachstumsverlauf in Flüssigmedium ohne  $\alpha$ -Linolensäure transformierter  $\Delta fat1$  Hefezellen keine Beeinträchtigung im Wachstum durch das Einbringen der Konstrukte. Hier erreichten lediglich Hefezellen mit FAX1, FAX2 und FAX3 etwas früher die exponentielle Wachstumsphase (Anhang Abb. 54). Betrachtet man die Wachstumskurven für  $\Delta faa1/faa4$ , wird deutlich, dass Hefezellen, die mit FAX4, FAX6 oder FAX7 transformiert wurden im Wachstum in Flüssigmedium gehemmt oder verlangsamt sind (Abb. 54). Nichtsdestotrotz zeigten alle  $\Delta fat1$  und  $\Delta faa1/faa4$  Mutanten einen Hefetypischen Wachstumsverlauf.

Anzumerken ist hier, dass auch FAX5 in den Hefeexpressionsvektor pDR195 kloniert wurde. Allerdings war FAX5/pDR195 nicht klassisch zu klonieren, weshalb hier die Methode der CPEC-Klonierung (*Circular Polymerase Extension Cloning*) verwendet werden musste. Für FAX5/pDR195 und FAX7/pDR195 sollten die ausstehenden Replikate bezüglich des funktionalen Transportassays in Hefe noch durchgeführt werden. Eine irreversible Kontamination der Hefestammkulturen ließ hier keine aussagekräftigen Experimente mehr zu.

#### 4.2.2.2 Etablierung einer Wildtypkontrolle

Da bislang Kontrollen für den funktionellen Transportassay in Hefe ausschließlich in den Deletionsstämmen  $\Delta fat1$  und  $\Delta faa1/faa4$  verwendet wurden, sollten die Analysen nun mit einer Wildtypbasierenden-Kontrolle durchgeführt werden. Hierfür wurde der wildtypische *S. cerevisiae* EUS-Stamm (Y00000/BY4741) mit dem leeren pDR195 Hefevektor transformiert. Eine FAT1-Komplementationslinie wurde konstruiert, indem der  $\Delta fat1$  Mutationsstamm (LS2020/YB332) mit der Fat1 Gensequenz (cDNA) im Plasmid pRS416 transformiert und somit komplementiert wurde. Diese Hefelinien wurden analog zum obigen Versuchsaufbau auf  $\alpha$ -Linolensäure-haltige (3,6 mM) und auf  $\alpha$ -Linolensäure-freie SC-ura-Platten getropft. Als Kontrolle diente der leere pDR195 Vektor im  $\Delta fat1$  Stamm (Abb. 15).



**Abb. 15: Funktioneller Transportassay in Hefe zur Etablierung einer Wildtyp-Kontrolle.** Die *Fat1* Gensequenz (cDNA) im pRS416 wurde in den *fat1* Deletionsstamm (konstruierter Wildtyp) (A), der leere pDR195 Vektor wurde in den wildtypischen *S. cerevisiae* Stamm Wt-EUS (Y00000/BY4741) (B) transformiert. Als Kontrolle diente der Leervektor pDR195 im *fat1* Deletionsstamm (-). Der Drop-Dilution-Test erfolgte mit 2  $\mu$ l Flüssigkulturen der Mutanten einer  $OD_{600}$  von 0,6 in  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  Verdünnungen auf SC-ura-Platten (0,1 % Glucose, 1 % Tergitol). Die Kontrollplatten (links) im Vergleich zu den Platten mit 3,6 mM  $\alpha$ -Linolensäure (rechts). Probe und zugehörige Kontrolle (-) befanden sich stets auf einer Platte und wurden doppelt getropft. Gezeigt sind repräsentative Fotos von n=2 unabhängigen Versuchen. Abbildung aus Bachelorarbeit Julia Mees (2019, verändert).

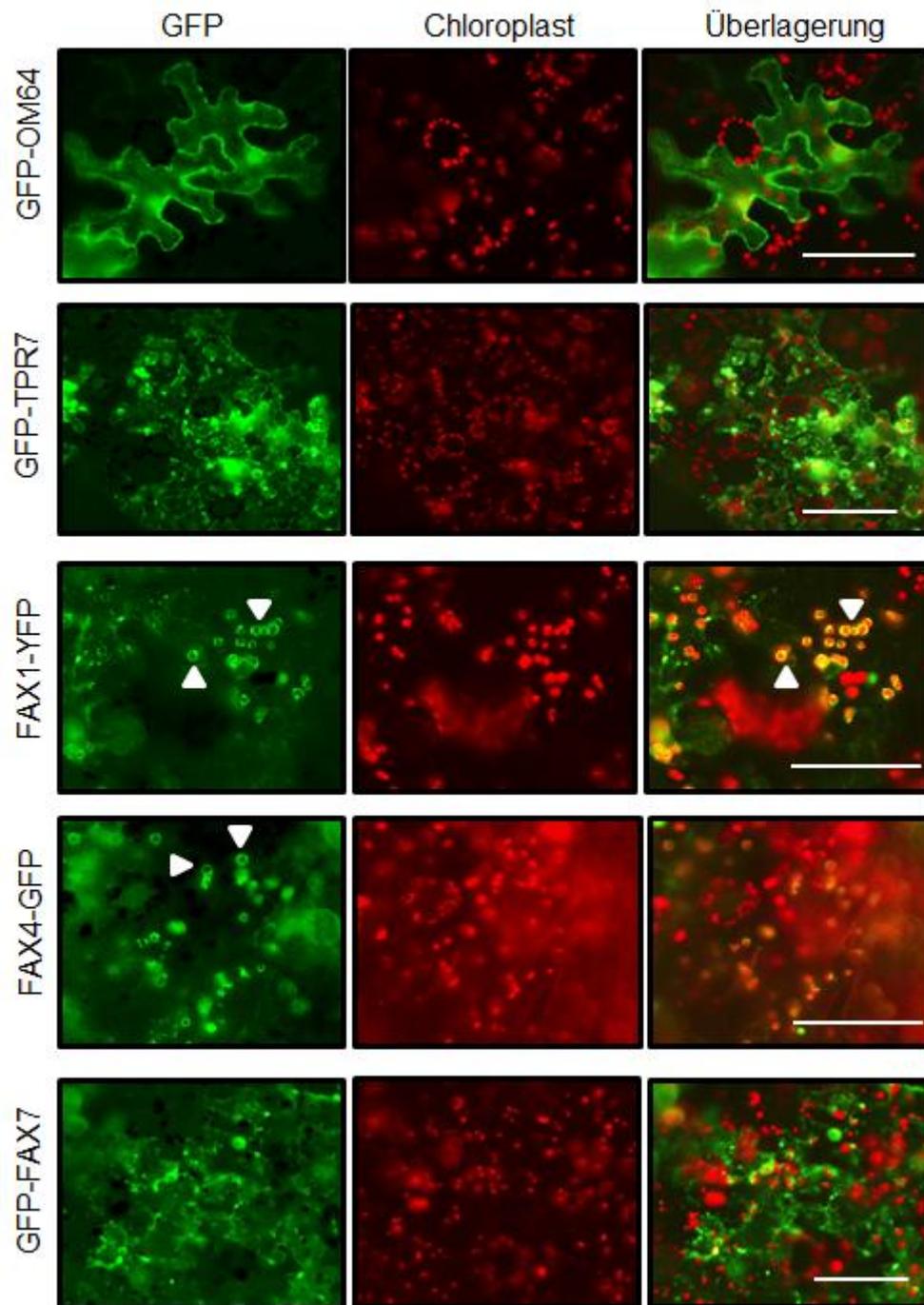
Alle Hefelinien wuchsen sowohl auf den Kontroll-, als auch auf den  $\alpha$ -Linolensäurehaltigen Platten in jeder Verdünnungsstufe (Abb. 15). Es war kein Unterschied zwischen den Wildtypkonstrukten und der als Kontrolle dienenden ( $\Delta fat1$ /pDR195) Linien zu sehen. Bei Betrachtung der Wachstumskurven (Anhang Abb. 55) ist erkennbar, dass die  $\Delta fat1$  Mutante mit dem transformierten leeren Vektor langsamer wuchs als die beiden anderen Wildtypkonstrukte. Dennoch zeigten alle einen Hefe-typischen Wachstumsverlauf.

### 4.2.3 Lokalisationsstudien der *Arabidopsis* Proteine FAX5, FAX6 und FAX7

Um die Lokalisation der Proteine At-FAX4, At-FAX5, At-FAX6 und At-FAX7 subzellulär zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen sollte die Lokalisation in Pflanzen mittels *GFP-Targeting* durch transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* (Tabak) und stabile Transformation in *Arabidopsis thaliana* Wildtypen (Col-0) untersucht werden. Zum anderen sollten posttranslationale Importstudien radioaktiv markierter FAX-Proteine in Hefemitochondrien und –mikrosomen mögliche Organellen der FAX-Lokalisation eingrenzen.

#### 4.2.3.1 Subzelluläre Lokalisation mittels *GFP-Targeting* - transiente Expression in Tabak

Um mittels transienter Transformation von Tabakblättern die subzelluläre Lokalisation der FAX-Proteine vergleichend zum ER-Markerprotein TPR7 (Schweiger *et al.*, 2012) und dem mitochondriellen Protein OM64 (Lister *et al.*, 2007) zu adressieren, sollte zunächst die Methode etabliert werden. At-FAX1 wurde hierbei als chloroplastidäres Protein mitgeführt. Die Konstrukte, FAX1/pB7YWG2 (YFP C-terminal), FAX4/pK7FWG2 (GFP C-terminal), FAX7/pK7WGF2 (GFP N-terminal), TPR7/pK7WGF2 (GFP N-terminal) und OM64/pK7WGF2 (GFP N-terminal), wurden in kompetente AGL1-Zellen (*Agrobacterium tumefaciens*) transformiert. Anschließend wurde eine transiente Tabak-Transformation durch Infiltration der AGL1-Kulturen ins Blatt durchgeführt. Nach Inkubation von 48 h – 96 h wurde die Blattunterseite transformierter Blätter präpariert und unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 16).



**Abb. 16: GFP-Targeting von OM64, TPR7, FAX1, FAX4 und FAX7 in der Blattepidermis von *N. benthamiana*.** Blätter von *N. benthamiana* wurden transient mit OM64/pK7WGF2, TPR7/pK7WGF2, FAX1/pB7YWG2, FAX4/pK7FWG2 oder FAX7/pK7WGF2 transformiert. Nach zwei bis drei Tagen wurde die untere Blattepidermis unter einem Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ 9000E betrachtet. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. A: GFP-Fluoreszenz des Genkonstruktes (Extinktion bei 470/40 nm, Emission bei 525/50 nm) B: Chlorophyllautofluoreszenz (chloroplast). C: Überlagerung. Der Maßstab entspricht 100  $\mu$ m in der jeweiligen Vergrößerung. Weiße Pfeile markieren ringförmige Fluoreszenzsignale.

Hinsichtlich der Kontrollproteine OM64 (Mitochondrien), TPR7 (ER) und FAX1 (Chloroplast) konnte die Lokalisation durch spezifische Signale bestätigt werden. Während bei OM64 und TPR7 die jeweils netzwerkähnliche Struktur von Mitochondrien (fadenähnlich) und ER (körnig) zu beobachten war, zeigten sich für FAX1 ringförmige Fluoreszenzsignale um einzelne Plastiden/Chloroplasten, die mit deren Autofluoreszenz kolokalisierten (Abb. 16, weiße Pfeile). Für FAX4 konnten ähnliche ringförmige Signale (weiße Pfeile), wie im Falle von FAX1 detektiert werden. In Blättern, die mit FAX7 transformiert wurden, konnten Fluoreszenzsignale aufgezeichnet werden, die eine leicht gekörnte netzwerkartige Struktur im Zytosol der Zelle bildeten. Eine Kolokalisation mit Chloroplasten konnte für FAX7 nicht gezeigt werden (Abb. 16). Grundsätzlich konnte so die Methode etabliert werden.

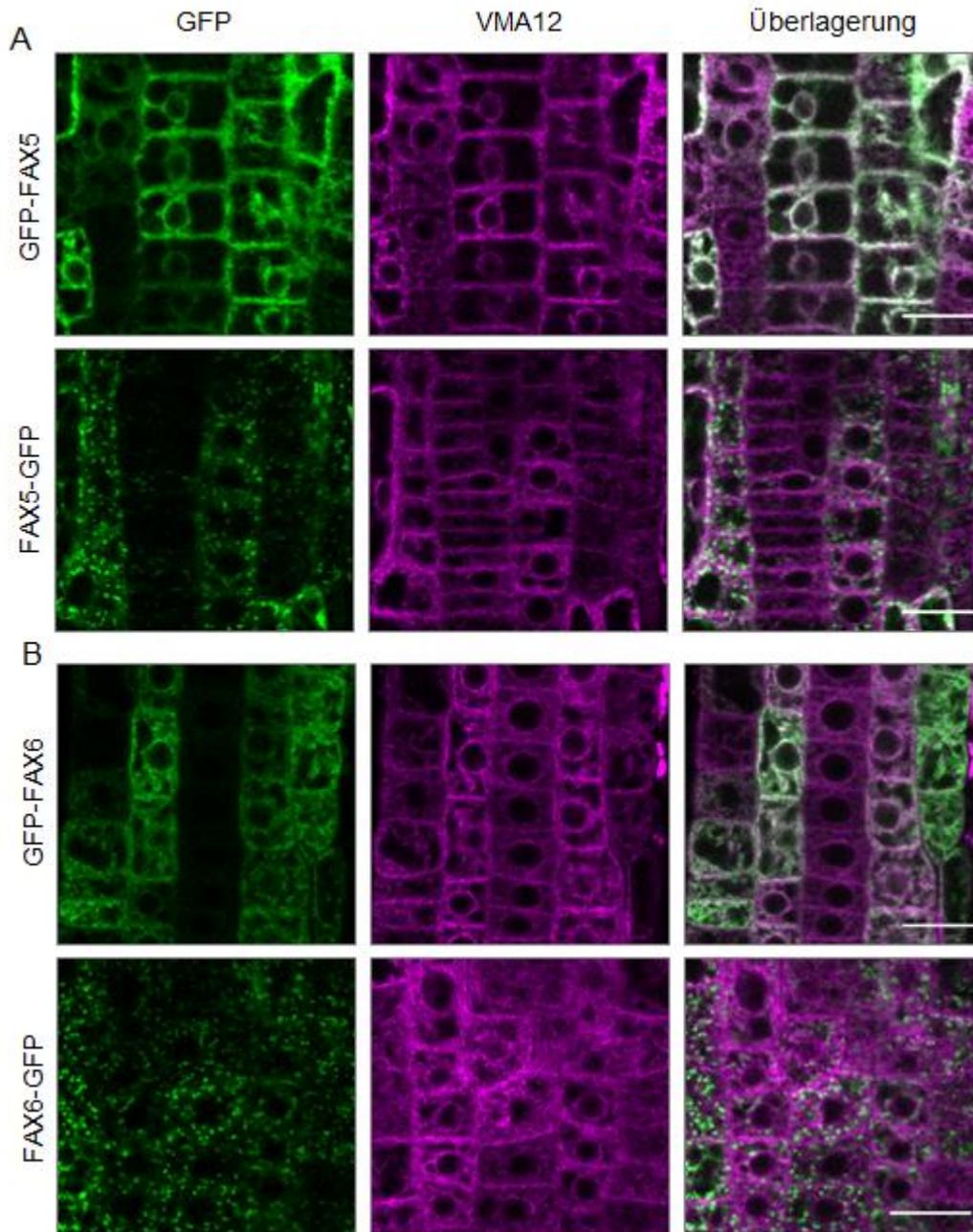
Weiterführende, detaillierte Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Melanie Krebs und Dr. Upendo Lupanga, COS, Universität Heidelberg, Heidelberg, Deutschland, durchgeführt. Um es veränderte Lokalisation durch das fusionierte Protein GFP oder eventuelle Überlagerung einer Targetingsequenz zu verhindern, wurden sowohl N- als auch C-terminal fusionierte GFP-Konstrukte untersucht. Hierzu wurden mittels *GFP-Targeting* in Tabak für FAX5-7, sowohl N- als auch C-terminal GFP markiert, ein netzwerkartiges, teilweise körniges Signal innerhalb der Zelle beobachtet. Die Signale der GFP-FAX Konstrukte waren für FAX5, FAX6 und FAX7 in Erscheinung und Intensität ähnlich. Hinsichtlich GFP-FAX7 und FAX7-GFP konnten subzellulär ähnliche Signale beobachtet werden. Für FAX5 und FAX6 unterschieden sich die Signale des FAX-GFP Konstrukts deutlich zum N-terminal markierten Protein (Anhang Abb. 56).

Alle Ergebnisse deuteten, wie Vorhersagen (*Aramemnon plant membrane protein database*, Schwacke *et al.*, 2003) auf eine Lokalisation der FAX Proteine FAX5, FAX6 und FAX7 im sekretorischen Weg hin. Im Folgenden sollte dies in *Arabidopsis* weiter untersucht werden.

#### **4.2.3.2 Subzelluläre Lokalisation mittels *GFP-Targeting* – *Arabidopsis***

Mit Hilfe von Dr. Melanie Krebs und Dr. Upendo Lupanga, Universität Heidelberg, sollte nun vor allem die subzelluläre Lokalisation von At-FAX5, At-FAX6 und At-FAX7 nach stabiler Transformation in *Arabidopsis* untersucht werden. Hierzu wurden jeweils N- und C-Terminal mit GFP fusionierte Konstrukte, FAX5/pK7WGF2, FAX5/pK7FWG2, FAX6/pK7WGF2, FAX6/pK7FWG2, FAX7/pK7WGF2, FAX7/pK7FWG2 vergleichend zu verschiedenen Markerproteinen in T1 und T2 Generationen untersucht.

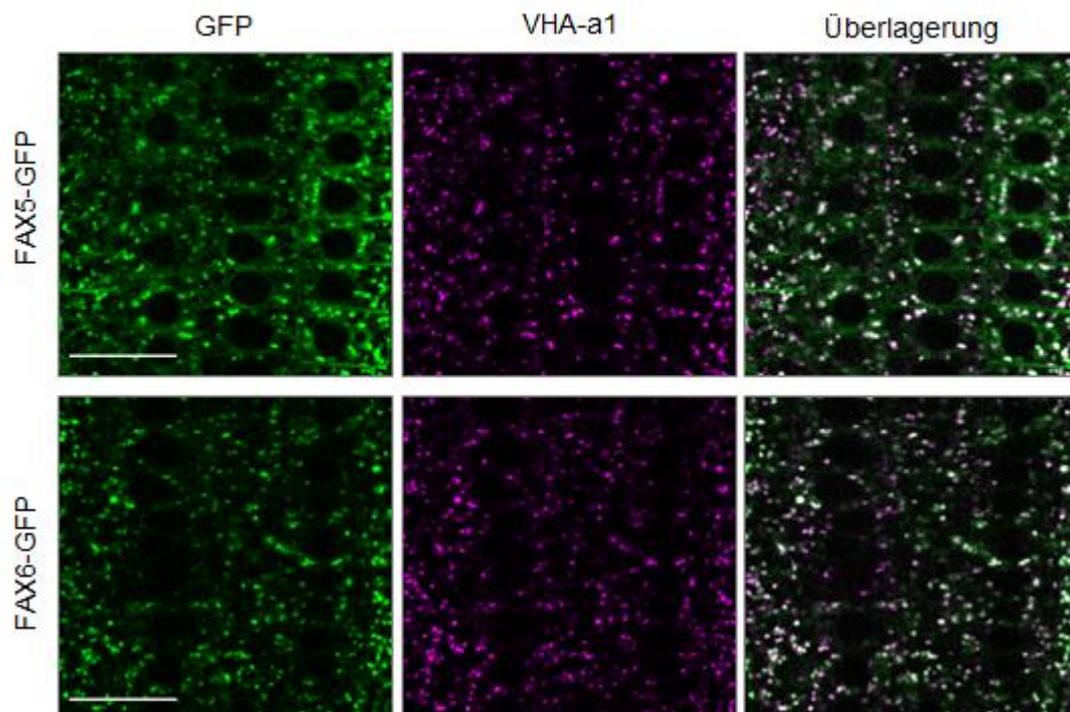
Um eine mögliche ER Lokalisation zu untersuchen wurden die Konstrukte mit dem ER-Marker VMA12 (Viotti *et al.*, 2013; Jackson und Stevens, 1997), N-Terminal mRFP (*monomeric red fluorescent protein*) fusioniert, stabil in *Arabidopsis* kotransformiert. Um die Lokalisation, auch abhängig von Lokus des GFP-Konstrukts, genauer subzellulär einzugrenzen wurden sowohl N-, als auch C-terminale Konstrukte betrachtet. Im Folgenden sind zunächst repräsentative Ergebnisse für FAX5 und FAX6 gezeigt (Abb. 17).



**Abb. 17: GFP-Targeting von At-FAX5 und At-FAX6 in Wurzelgewebe stabil transformierter *Arabidopsis*keimlinge (T1).** Transformiert wurden jeweils die N- (GFP-FAX) und C-Terminal (FAX-GFP) fusionierte GFP-Konstrukte, FAX5/pK7WGF2, FAX5/pK7FWG2, FAX6/pK7WGF2 und FAX6/pK7FWG2. Die Kotransformation erfolgte mit dem Konstrukt mRFP-VMA12 als ER-Kontrollprotein. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen in Keimlingswurzeln (7 Tage alt). 1. Spalte (FAX5/FAX6): Fluoreszenz GFP (Extinktion 488 nm / Emission 500-540 nm). 2. Spalte (VMA12): Fluoreszenz (Extinktion 561 nm / Emission 500-540 nm). 3. Spalte: Überlagerung. Der Maßstab repräsentiert 20µm. Verwendetes Fluoreszenzmikroskop Leica SP5II. Daten und Abbildung Dr. Melanie Krebs und Dr. Upendo Lupanga (2021).

Hinsichtlich der Lokalisation von FAX5 (Abb. 17, A) und FAX6 (Abb. 17, B) zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Ein N-Terminal fusioniertes GFP ergab sehr ähnliche Signale wie das ER-Markerprotein VMA12. Hier konnte eine deutliche Kolokalisation der Signale gezeigt werden. Die Konstrukte FAX5-GFP und FAX6-GFP hingegen ergaben punktartige Signale innerhalb der Zelle, welche überwiegend nicht mit dem Signal von VMA12 kolokalisierten.

Da die Lokalisation der FAX-Proteine FAX5 und FAX6 abhängig vom Lokus des GFP-Proteins schien, sollten vor allem die FAX-GFP Konstrukte (GFP C-terminal) hinsichtlich ihrer Lokalisation nochmals genauer untersucht werden, da hier keine eindeutige Lokalisation im ER zu beobachten war. Um die Lokalisation im sekretorischen Weg zu analysieren, wurde die Kolokalisation mit der V-ATPase Untereinheit VHA-a1 untersucht, die in *Arabidopsis* in TGN/EE lokalisiert und somit für das Targeting der V-ATPase verantwortlich ist (Lupanga *et al.*, 2020). FAX5-GFP oder FAX6-GFP wurden daher jeweils mit VHA-a1-mCherry (C-terminales mCherry) kotransformiert (Abb. 18).

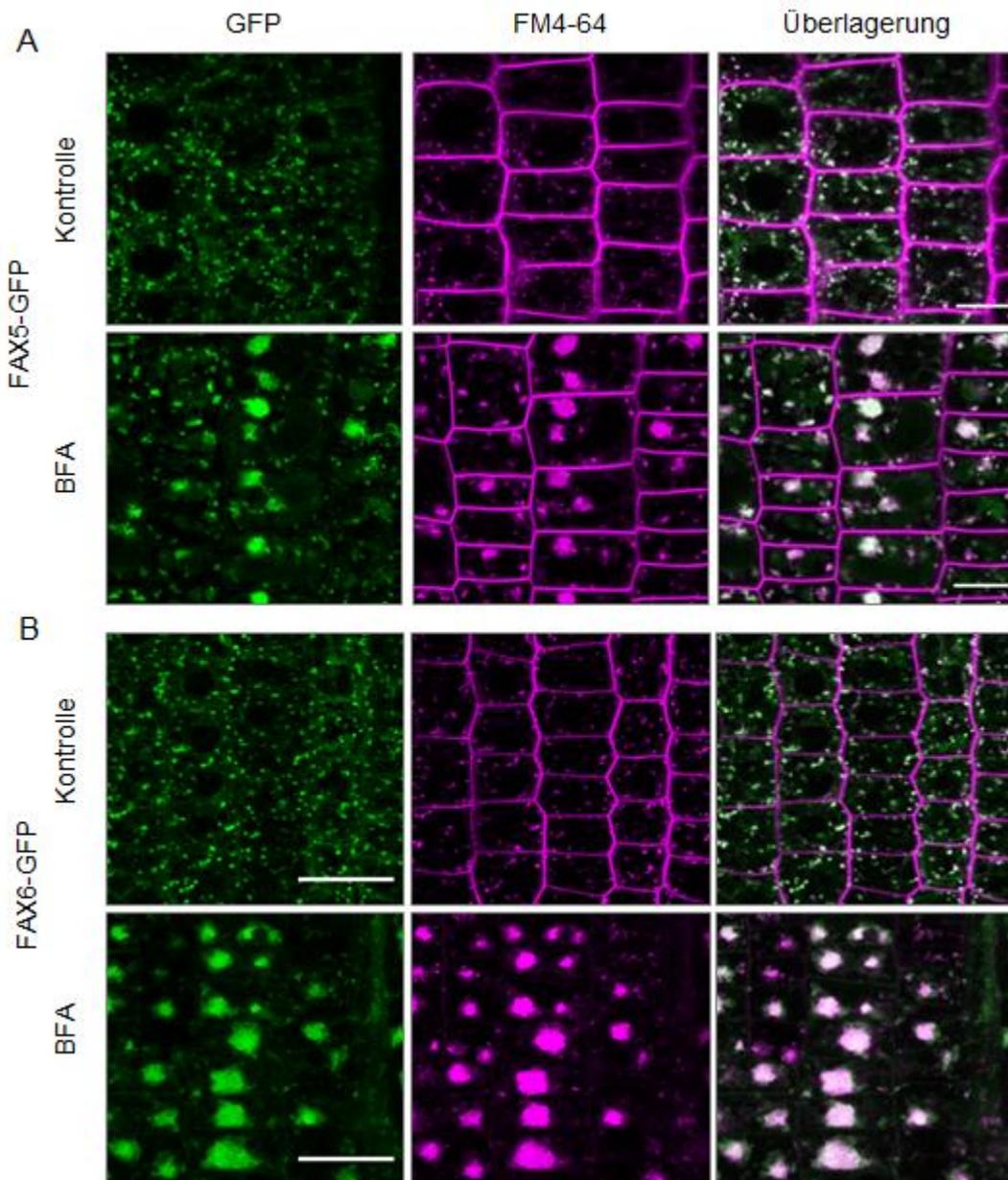


**Abb. 18: GFP-Targeting von At-FAX5 und At-FAX6 in Wurzelgewebe stabil transformierter *Arabidopsis*keimlinge (T1).** Transformiert wurden jeweils FAX5/pK7FWG2 oder FAX6/pK7FWG2 und VHA-a1-mCherry (Kontrolle). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen in Keimlingswurzeln (5 Tage alt). 1. Spalte: Fluoreszenz GFP (Extinktion 488 nm / Emission 500-540 nm). 2. Spalte (VHA-a1): Fluoreszenz (Extinktion 561 nm/ Emission 600-650 nm). 3. Spalte: Überlagerung. Der Maßstab repräsentiert 20  $\mu$ m. Verwendetes Fluoreszenzmikroskop Leica SP5II. Daten und Abbildung Dr. Melanie Krebs und Dr. Upendo Lupanga (2021).

Sowohl für FAX5-GFP, als auch für FAX6-GFP waren erneut punktförmige Signale detektierbar, die mit den punktförmigen Signalen von VHA1-a1 kolokalisierten (Abb. 18).

Um weiterhin eine Lokalisation im sekretorischen Weg zu untersuchen, wurden die Konstrukte FAX5-GFP und FAX6-GFP zusammen mit dem Endozytose-Marker FM4-64 (van

Gisbergen *et al.*, 2008) betrachtet, sowie eine Sensitivität gegenüber Brefeldin A (BFA, Endozytoseinhibitor, Wang *et al.*, 2002b) analysiert (Abb. 19).

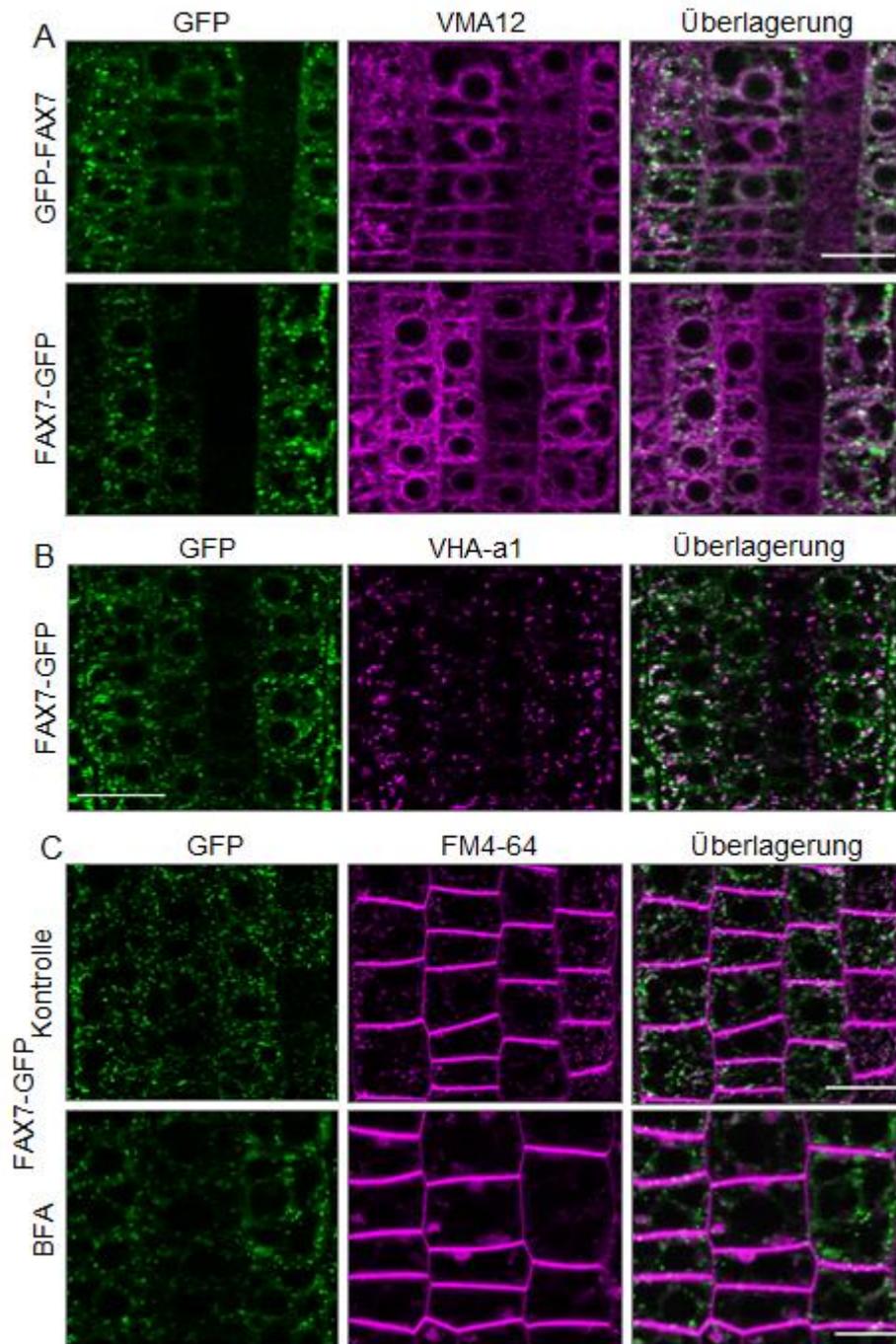


**Abb. 19: GFP-Targeting von At-FAX5 (A) und At-FAX6 (B) in Wurzelgewebe stabil transformierter *Arabidopsis*-Keimlinge (T1) in Anwesenheit von Brefeldin A.** Transformiert wurden jeweils FAX5/pK7FWG2 oder FAX6/pK7FWG2 und das Wurzelgewebe mit dem Endozytosemarker FM4-64 [1  $\mu$ M] für 30 min gefärbt (Kontrolle). Es folgte eine Inkubation des Wurzelgewebes mit 50  $\mu$ M Brefeldin A für 3h zur Inhibition der Endozytose (BFA). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen in Keimlingswurzeln (7 Tage alt). 1. Spalte: Fluoreszenz GFP (Extinktion 488 nm / Emission 500-540 nm). 2. Spalte (FM4-64): Fluoreszenz (Extinktion 561 nm/ Emission 683-750 nm). 3. Spalte: Überlagerung. Der Maßstab repräsentiert 10  $\mu$ m (FAX5), 20 $\mu$ m (FAX6). Verwendetes Fluoreszenzmikroskop Leica SP5II. Daten und Abbildung Dr. Melanie Krebs und Dr. Upendo Lupanga (2021).

In Abb. 19 wird gezeigt, dass die punktförmigen FAX5-GFP und FAX6-GFP-Signale mit den ähnlichen Signalen des Endozytosemarkers kolokalisieren. Mit der Zugabe des Endozytoseinhibitors BFA vergrößern sich die punktförmigen Signale in ihrem Volumen stark.

Auch hier verhalten sich sowohl FAX5-GFP als auch FAX6-GFP und der Endozytosemarker ähnlich. In der Überlagerung der Aufnahmen ist eine Kollokalisierung der vesikelartigen Signale erkennbar.

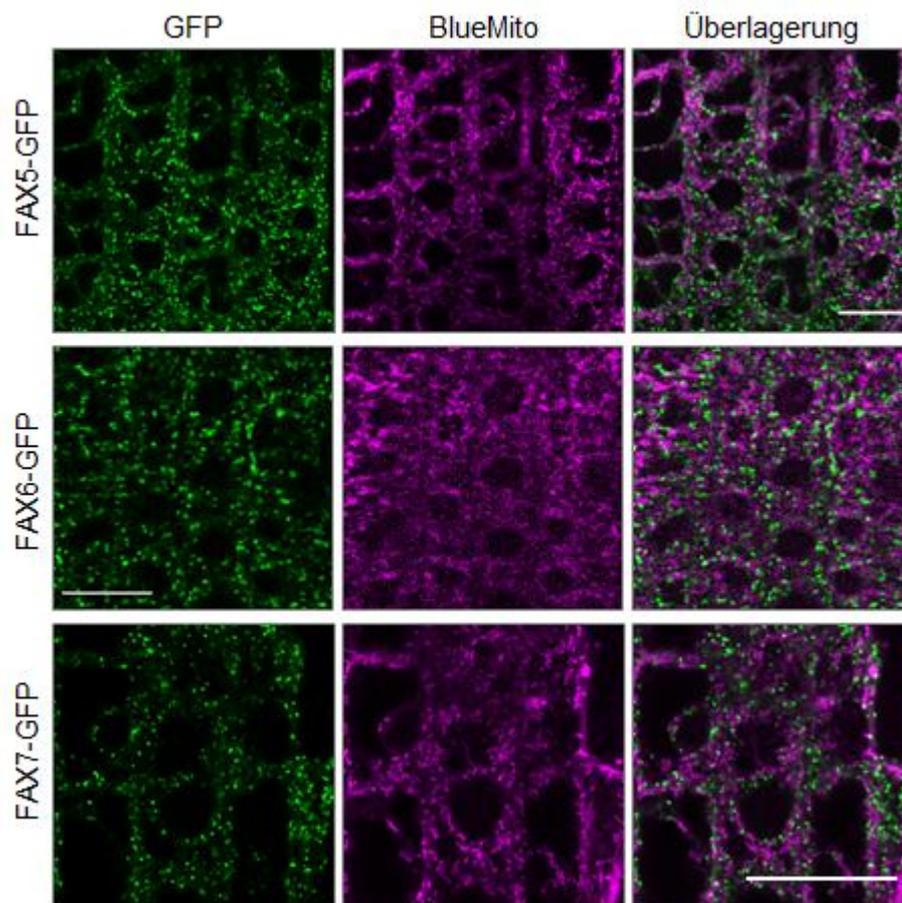
Um auch die Lokalisation von At-FAX7 subzellulär genauer zu betrachten (Abb. 20), wurde analog zu At-FAX5 und At-FAX6 vorgegangen. Es wurde zunächst die Lokalisation im ER vergleichend zum ER-Marker VMA12 betrachtet (Abb. 20, A). Anschließend wurde ebenfalls die Kollokalisierung zum Endozytosemarker FM4-64 und die Sensitivität gegenüber Brefeldin A überprüft (Abb. 20, B) und zu letzt die Lokalisation vergleichend zum Protein VHA-a1, das in TGN/EE lokalisiert, untersucht (Abb. 20, C).



**Abb. 20: GFP-Targeting von At-FAX7 in Wurzelgewebe stabil transformierter *Arabidopsis*-Keimlinge (T1).** Transformiert wurden jeweils die N- (GFP-FAX) und C-Terminal (FAX-GFP) fusionierte GFP-Konstrukte, FAX7/pK7WGF2 und FAX7/pK7FWG2. (A) Kotransformation mit dem Konstrukt mRFP-VMA12 als ER-Kontrollprotein. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen in Keimlingswurzeln (7 Tage alt). Der Maßstab repräsentiert 20µm. (B) Kotransformation mit VHA-a1-mCherry. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen in Keimlingswurzeln (5 Tage alt). Der Maßstab repräsentiert 20 µm. (C) Das transformierte Wurzelgewebe wurde mit dem Endozytosemarker FM4-64 [1 µM] für 30 min gefärbt (Kontrolle). Es folgte eine Inkubation des Wurzelgewebes mit 50 µM Brefeldin A für 3h zur Inhibition der Endozytose (BFA). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen in Keimlingswurzeln (7 Tage alt). Der Maßstab repräsentiert 10 µm. 1. Spalte (FAX7): Fluoreszenz GFP (Extinktion 488 nm / Emission 500-540 nm). 2. Spalte VMA12: Fluoreszenz (Extinktion 561 nm / Emission 500-540 nm); FM6-64: Extinktion 561 nm/ Emission 683-750 nm, VHA-a1: Extinktion 561 nm/ Emission 600-650 nm. 3. Spalte: Überlagerung. Verwendetes Fluoreszenzmikroskop Leica SP5II. Daten und Abbildung Dr. Melanie Krebs und Dr. Upendo Lupanga (2021).

Während GFP-FAX7 punktförmige Signale und auch ER-typische Signale, ähnlich VMA12, zeigte, konnte für FAX7-GFP ein definiertes punktartiges Signal detektiert werden. Hier konnte in beiden Fällen eine geringe Kolo­kalisation mit dem ER gezeigt werden (Abb. 20, A). Ebenso kolo­kalisierten die für FAX7-GFP detektierten punktförmigen Strukturen partiell mit den Signalen von VHA-a1-mCherry als TGN/EE Marker (Abb. 20, B). Eine Kolo­kalisation mit den Signalen des Endozytosemarkers FM4-64 konnte nicht festgestellt werden. Während sich mit der Zugabe von BFA im Fall des Endozytosemarkers FM6-64 wieder vesikelartige Signale erkennen ließen, blieb das GFP-Signal von FAX7 nahezu gleich. FAX7-GFP war also nicht sensitiv gegenüber Brefeldin A (Abb. 20, B).

Um letztlich ebenfalls eine mögliche Lokalisation in Mitochondrien zu untersuchen wurden FAX5-GFP, FAX6-GFP und FAX7-GFP mit dem Mitochondrienmarker BlueMito (Sánchez *et al.*, 2014) verglichen und die Lokalisation subzellulär betrachtet (Abb. 21).



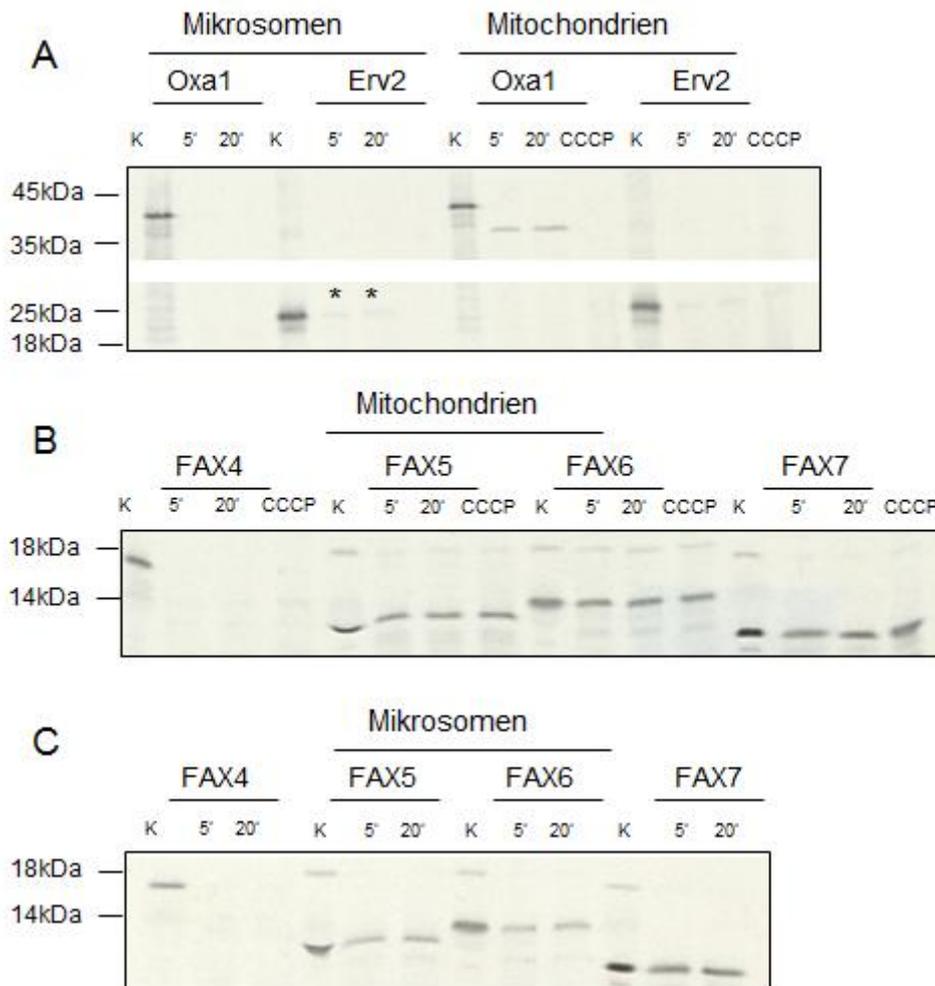
**Abb. 21: GFP-Targeting von At-FAX5, At-FAX6 und At-FAX7 in Wurzelgewebe stabil transformierter *Arabidopsis*keimlinge (T1).** Transformiert wurden jeweils FAX5/pK7FWG2, FAX6/pK7FWG2 oder FAX7/pK7FWG2 und für 30 min dem Mitochondrienmarker Biotracker Blue Mito (200 nM) gefärbt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen in Keimlingswurzeln (7 Tage alt). 1. Spalte: Fluoreszenz des Genkonstruktes mit GFP (Extinktion 488 nm / Emission 500-540 nm). 2. Spalte (Biotracker Blue Mito): Fluoreszenz (Extinktion 405 nm / Emission 415-460 nm). 3. Spalte: Überlagerung. Der Maßstab repräsentiert 20 µm. Daten und Abbildung Dr. Melanie Krebs und Dr. Upendo Lupanga (2021).

Die Daten zeigen hier, dass die punktförmigen Signale von FAX5-GFP, FAX6-GFP noch FAX7-GFP in einem Co-Staining mit einem mitochondrialen Marker MitoBlue nicht kolokalisieren (Abb. 21).

Zusammenfassend kolokalisierten die Proteine FAX5-FAX7 mit Markerproteinen entlang des sekretorischen Syntheseweges. Während sich die Proteine FAX5 und FAX6 in allen Experimenten bezüglich ihrer Lokalisation identisch verhielten, zeigte FAX7 eine differenzierte Lokalisation. FAX5 und FAX6 mit einem N-terminal fusionierten GFP waren im ER lokalisiert, während die Proteine mit einem C-terminalen GFP mit Markerproteinen für TGN/EE und Endozytose kolokalisierten und eine Sensitivität gegenüber Brefeldin A zeigten. Die subzelluläre Lokalisation von FAX7 war weniger klar abgegrenzt. Hier konnten sowohl GFP-FAX7, als auch FAX7-GFP partiell im ER lokalisiert werden. Des Weiteren kolokalisierte FAX7-GFP auch partiell mit Markerprotein für das TGN und EEs, nicht aber dem Endozytose Marker und war ebenfalls nicht sensitiv gegenüber Brefeldin A. Die gezeigten Lokalisationen konnten bereits in der T2 Generation und durch Quantifizierung von Dr. Melanie Krebs und Dr. Upendo Lupanga bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2.3.3 Posttranslationale mitochondrielle und mikrosomale Importstudien – *in vitro***

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Johannes Herrmann, TU Kaiserslautern, sollte mittels Importstudien in isolierte, wildtypische Mitochondrien und Mikrosomen aus Hefe mit radioaktiv markierten FAX-Proteinen der posttranslationale Import in diese Organellen untersucht werden. So sollten Rückschlüsse über eine mögliche Lokalisation innerhalb der Zelle erlangt werden. Hierzu wurden die cDNA Sequenzen von At-FAX4, At-FAX5, At-FAX6 und At-FAX7 in den Vektor pGEM4 kloniert. Errechnete Proteingrößen waren für FAX4 ca. 18,4 kDa, für FAX5 und FAX6 je 12,5 kDa und FAX7 11 kDa. Nach *in vitro* Transkription und Translation wurden sowohl mitochondrielle, als auch mikrosomale posttranslationale Imports durchgeführt. Nach 5 bzw. 20 min wurden Importproben entnommen und mit Proteinase K (PK) enzymatisch verdaut, um alle nicht importierten Proteine abzubauen. Zusätzlich wurde als negative Kontrolle das Membranpotenzial der Mitochondrien mit CCCP (Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon) blockiert, um einen Import zu verhindern. Als positive Importkontrolle diente für Mitochondrien das Protein Oxa1 (mit MTS 41 kDa, ohne MTS 37 kDa) (*Mitochondrial Targeting Sequence*) (Krüger *et al.*, 2012) und für Mikrosomen das Protein Erv2 (25 kDa) (Gerber *et al.*, 2001) (von AG Herrmann zur Verfügung gestellt). Die Proteine wurden nach Auftrennung über SDS-Gele auf eine PVDF-Membran übertragen und mittels Autoradiografie die radioaktiven Signale anschließend detektiert (Abb. 22).

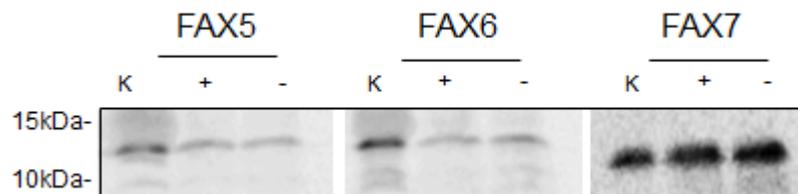


**Abb. 22: Autoradiografie posttranslationaler *in vitro* Importstudien von radioaktiv markierten FAX-Proteinen in isolierten Hefemitochondrien und -mikrosomen.** Detektion der radioaktiven Signale nach Auftrennung mittels SDS-Gel und Proteintransfer auf eine PVDF-Membran. (A) Kontrollimport mit Oxa1 (41 kDa mit MTS, 37 kDa ohne MTS, Mito-Kontrolle) und Erv2 (25 kDa) in Mikrosomen und Mitochondrien. (B) Import der FAX-Proteine in Mitochondrien. (C) Import der FAX-Proteine in Mikrosomen. Es wurden 25  $\mu$ l einer 20 % Verdünnung der *in vitro* Translationen der jeweiligen Proteine als positive Kontrolle (K) bezüglich der Radioaktivität. Nach 5' und 20' Minuten der Importzeit wurden Proben entnommen, Proteinase K verdaut und aufgetrennt. CCCP diente als Inhibitor des mitochondrialen Membranpotenzials, somit als negative Kontrolle für den mitochondrialen Import. (\*) markiert Signale.

Im Kontrollimport (Abb. 22, A) ist erkennbar das Oxa1 nicht in Mikrosomen importiert wurde, hingegen aber in Mitochondrien. Hier ist ein deutliches, gleichbleibendes Signal der maturen Form um 37 kDa nach 5 und 20 minütigem Import erkennbar. Aufgrund der N-terminalen *Targetingsequenz*, welche beim Import abgespalten wird, ist das Signal des Präproteines höher, bei etwa 42 kDa. Erv2 zeigte beim Import in ER-Membranen der Mikrosomen nur schwache Signale (bei ca. 25 kDa), die auch beim mitochondrialen Import erkennbar waren. Wird durch CCCP der Import in Mitochondrien inhibiert, kann Oxa1 nicht importiert werden. Deshalb ist hier kein Signal zu detektieren. Die Hintergrundbande bei Erv2 ist vermutlich auf einen Restanteil an mikrosomalen Membranen in der Mitochondrienisolation zurückzuführen. In Abbildung, B wird der Import der FAX-Proteine in

Mitochondrien betrachtet. Während für FAX4 zu keinem Importzeitpunkt ein Signal zu detektieren war, konnten für FAX5, FAX6 und FAX7 unabhängig von der Importdauer und dem Inhibieren des Membranpotenzials der Mitochondrien durch CCCP gleichbleibende Signale festgestellt werden. Ein ähnliches Bild ergab sich für den Import in Mikrosomen (Abb. 22, C). Auch hier konnte für FAX4 kein Signal nach Import detektiert werden. Das Protein wurde also vollständig durch die Proteinase K abgebaut. Den anderen FAX-Proteinen ließ sich ein durchgehend gleiches Signal zuordnen. Alle markierten Präproteine entsprachen den vorhergesagten Größen. Lediglich FAX6 lief etwas höher als erwartet.

Da FAX5, FAX6 und FAX7 unter allen Testbedingungen radioaktive Signale nach Import und PK Abbau zeigten, sollte dies in einem Folgeversuch genauer betrachtet werden. Hierbei wurde sich allerdings resultierend auf den Ergebnissen der subzellulären Lokalisation in Pflanzen (Hinweise auf ER/sek. Weg Lokalisation) auf den Import in Mikrosomen beschränkt. Es sollte geklärt werden, ob die Proteine unspezifisch in die Membranen integriert, unspezifisch importiert wurden oder gar Aggregate bildeten, welche für den PK Abbau unzugänglich waren. Zusätzlich zu den Standard-Imports der Proteine in Mikrosomen, wurde diesmal auch ein Import, zur Denaturierung der Organellmembranen, in zuvor gekochte Mikrosomen analog zum bereits beschriebenen Versuchsaufbau durchgeführt (Abb. 23).



**Abb. 23: Autoradiografie posttranslationaler *in vitro* Importstudien von radioaktiv markierten FAX-Proteinen in isolierten Hefemikrosomen, unbehandelt (-) und gekocht (+).** Detektion der radioaktiven Signale nach Auftrennung mittels SDS-Gel und Proteintransfer auf eine PVDF-Membran. Aufgetrennt wurden 25  $\mu$ l einer 20 % Verdünnung der *in vitro* Translationen der jeweiligen Proteine als positive Kontrolle (K) bezüglich der Radioaktivität. (+) Import mit denaturierten, für 3 min bei 96 °C gekochten, Mikrosomen. (-) Kontrollimport mit intakten Mikrosomen. Die Imports wurden nach 20 min gestoppt und mit PK behandelt. Es wurden At-FAX5 (12,5 kDa), At-FAX6 (12,5 kDa) und At-FAX7(11 kDa) untersucht.

In Abb. 23 zeigten alle *in vitro* Translationen der zu untersuchenden FAX-Proteine radioaktive Signale. Sowohl bei FAX5 und FAX6 also auch bei FAX7 waren nach Import und PK Behandlung in den intakten Mikrosomen Signale in Höhe der errechneten Proteingrößen zu detektieren. Allerdings zeigte dies auch der Import in gekochte Mikrosomen. Ein Unterschied in der Intensität der Signalstärke beider Importbedingungen war für kein FAX-Protein zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass die Proteine nicht oder unvollständig durch PK abgebaut werden und möglicherweise für das Enzym unzugängliche Aggregate bilden. Ein Import in denaturierte Mikrosomen sollte aufgrund zerstörter Membranen, nicht möglich sein.

#### 4.2.4 Analysen von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten

Um die Rolle der FAX-Proteine FAX4, FAX5, FAX6 und FAX7 im pflanzlichen Organismus, genauer im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*, zu untersuchen sollten verschiedene Mutationslinien erstellt, identifiziert und charakterisiert werden. Mittels dieses Ansatzes sollten Rückschlüsse auf die Funktion der Proteine im Entwicklungsprozess der Pflanze, ihre Bedeutung im Fettsäure-/Lipidmetabolismus, sowie mögliche Komplementationen innerhalb der FAX-Familie erlangt werden. Hierzu wurden RNAi-Linien, T-DNA-Insertionslinien, sowie durch Kreuzung generierte Doppelmutanten der T-DNA-Linien verwendet.

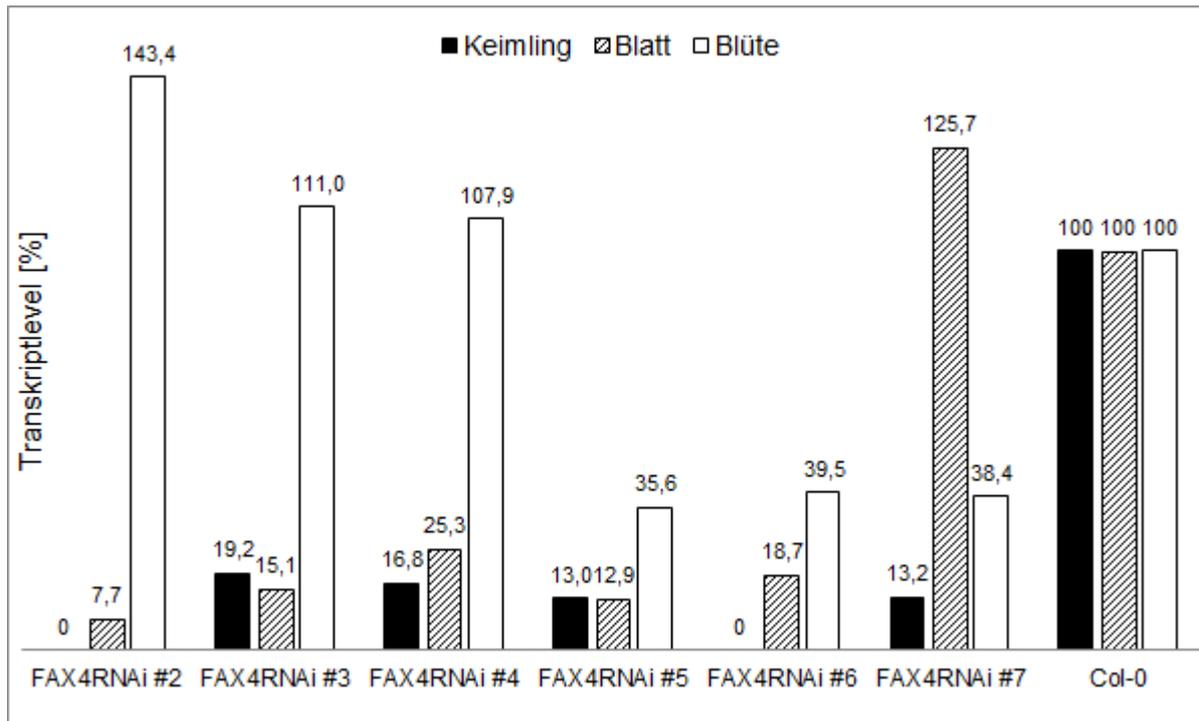
Um Mutationslinien in *Arabidopsis* zu charakterisieren wurden aus dem *European Arabidopsis Stock Centre* (NASC) in Nottingham T-DNA-Insertionslinien geordert. Zur späteren Phänotypisierung, Segregations- und Expressionsanalysen mussten die T-DNA Insertionslinien von FAX4, FAX5, FAX6 und FAX7 zunächst einmal hinsichtlich ihrer Insertion in das Zielgen bestätigt werden. Dies erfolgte mittels spezifischer Primer und PCR Amplifikation isolierter DNA. Daraus folgend konnten so homozygote Linien identifiziert werden, die weiterhin auf einen potenziellen *Knockout* des Genes durch Analysen der Transkriptebene untersucht wurden.

Eine wichtige Rolle des Fettsäuretransporters FAX1 in der Entwicklung von *Arabidopsis* konnte bereits durch den resultierenden Phänotyp einer *fax1* Mutante gezeigt werden. FAX1 konnte eine Funktion im Aufbau von Biomasse, männlicher Fertilität und Synthese von FA-Derivaten, wie Lipiden, Wachsen oder Pollenzellwandbestandteilen nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2015). Um auch anderen FAX-Proteinen in diesen Prozessen eine mögliche Rolle zuzuordnen, sollten die *Arabidopsis*mutanten *FAX4*-RNAi, *fax4-3*, *fax5-1*, *fax6-1* und *fax7-2* während der Pflanzenentwicklung untersucht und ein möglicher Phänotyp analysiert werden.

##### 4.2.4.1 Charakterisierung von *FAX4*-RNAi und *FAX4* T-DNA-Insertionslinien

Um die Rolle von FAX4 in der Pflanze genauer zu untersuchen sollten zunächst *FAX4*-RNAi Linien analysiert werden. Zur Erstellung der *FAX4*-RNAi-Linien wurde in Wildtyppflanzen (Col-0) ein FAX4 cDNA Fragment (294 bp) im RNAi Vektor pH7GWIWG2 (Abb. 57) eingebracht (Vorarbeit durch Wassilina Bugaeva, AG Philippar, UdS Saarbrücken). Die generierten Samen (T1) der Pflanzen wurden in dieser Arbeit selektiert und genotypisiert, um das transformierte RNAi-Konstrukt nachzuweisen (Anhang Abb. 58). Die bestätigten Pflanzen wurden nun als einzelne Linien *FAX4*-RNAi #1 - #7 betrachtet.

Außerdem sollte der Einfluss des RNAi-Konstruktes auf den Transkriptgehalt des Genes *FAX4* in verschiedenen Geweben untersucht werden, um so später Rückschlüsse zu einem möglichen Phänotyp ziehen zu können. Des Weiteren sollten so Linien identifiziert werden, in denen das Expressionslevel von *FAX4* im Vergleich zum Wildtyp reduziert war. Hierzu wurde aus Keimlingen, Rosettenblätter und Blüten RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR und cDNA spezifischer Primer mögliche Transkripte amplifiziert (Abb. 24). Verwendet wurden die *FAX4*-RNAi-Linien #2 - #7 und Col-0 als Wildtypkontrolle.



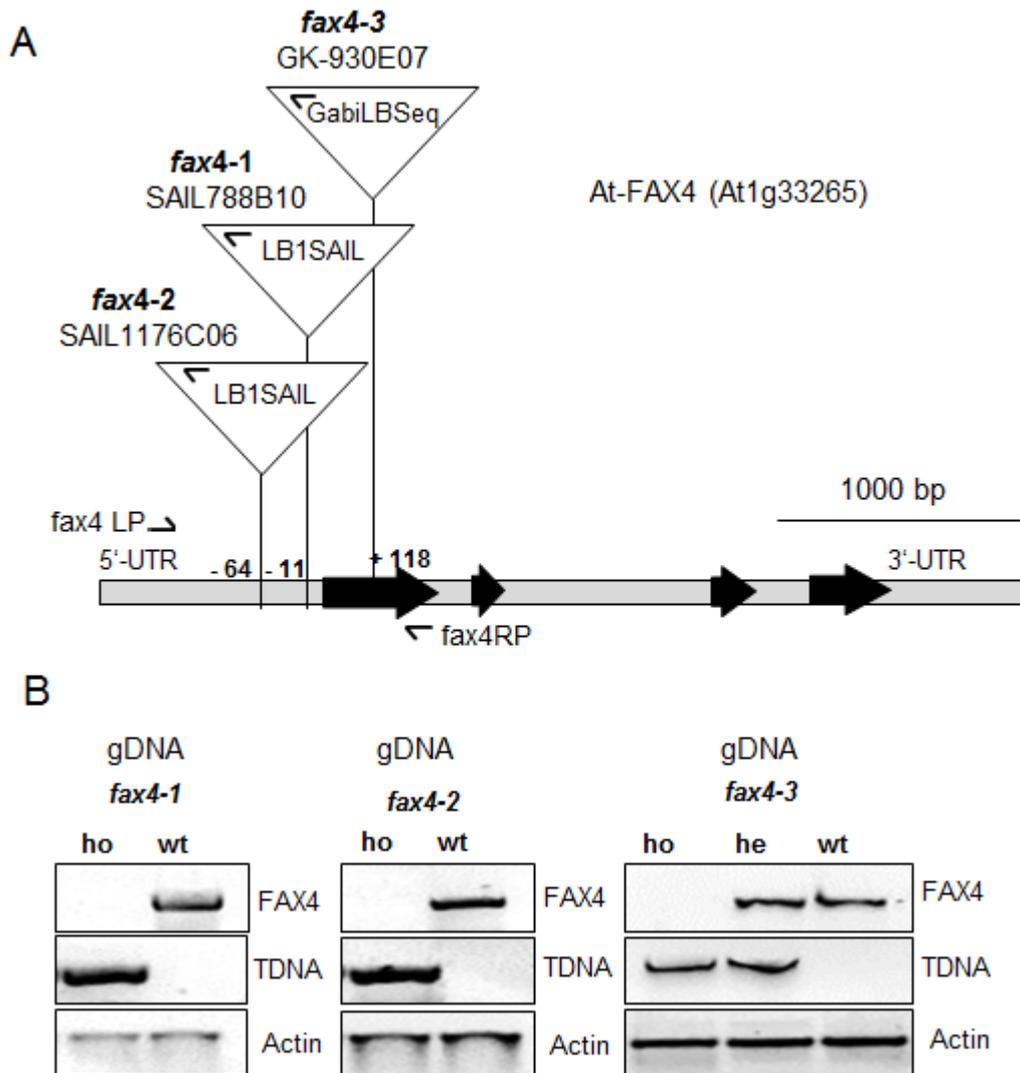
**Abb. 24: Relativer Transkriptgehalt von FAX4 in verschiedenen Entwicklungsstadien/Geweben der FAX4-RNAi Linien.** Bestimmung der relativen Transkriptmenge mittels qRT PCR von FAX4 in Keimlingen (schwarz), Rosettenblättern (gestreift) und Blüte (weiß) der FAX4-RNAi Linien. Die cDNA aus Keimlingen (2 Wochen alt) sowie Rosettenblättern und Blüten (5 Wochen alt). n=1, Batch aus je zehn Pflanzen. Normiert wurde auf die gemessene Transkriptmenge von Aktin, der Transkriptgehalt in Col-0 wurde jeweils auf 100 % gesetzt.

Die Keimlinge der Linien FAX4-RNAi #2 bis #7 wiesen einen deutlich geringeren (unter 20 %) Transkriptgehalt von FAX4 auf als Col-0 (Abb. 24). In den Linien #2 und #6 war der RNAi Effekt am stärksten, hier konnte kein Transkript im Keimlingsstadium nachgewiesen werden. In den Rosettenblättern war ebenfalls ein Effekt in den Linien #2 bis #6 zu beobachten, dort konnten nur noch Transkriptgehalte von FAX4 von knapp 25 % und weniger im Vergleich zu Col-0 gezeigt werden. Wohingegen Linie #7 ein wildtypisches Expressionslevel von FAX4 in den Rosettenblättern zeigte. In den Blüten der Pflanzen war für die Linien #2, #3 und #4 kein verringerter Transkriptgehalt nachgewiesen worden, während Linie #5, #6 und #7 hier weniger als 40 % des für Col-0 Transkriptgehaltes von FAX4 zeigten. Generell konnte ein Effekt des RNAi-Konstruktes bezüglich des Transkriptgehaltes beobachtet werden.

Um die Auswirkung des bereits gezeigten, verringerten Transkriptlevels von FAX4 durch Einbringen des FAX4-RNAi-Konstruktes in Wildtyppflanzen und somit die Bedeutung von FAX4 in der Entwicklung von *Arabidopsis* zu untersuchen, wurden die verifizierten FAX4-RNAi-Mutanten phänotypisiert. Eine ausführliche Phänotypisierung der RNAi-Linien #2-#7 mit Col-0 als Wildtypkontrolle erfolgte in der Bachelorarbeit von Simon Both (2018). Es wurde Keimungsanalyse auf Platte (Anhang Abb. 59) und eine Phänotypisierung auf Erde durchgeführt, wobei der Rosettendurchmesser, die Gesamtlänge der Pflanze, sowie die Tage bis zur Knospung und Blüte betrachtet wurden (Anhang Abb. 60, Anhang Abb. 61). Weiterhin wurden ebenso die Schoten und Samenentwicklung mikroskopisch betrachtet. (Anhang Abb. 61).

In den phänotypischen Analysen der *FAX4*-RNAi Linien war allgemein auffällig, dass sich die Ausprägung des identifizierten Phänotyps innerhalb der Linien variabel war. Den signifikant häufigsten Unterschied zum Wildtyp zeigten die Linien #4 und #7. Alle RNAi-Linien waren im Zeitpunkt der Keimung unauffällig, allerdings dauerte es länger bis die Kotyledonen entfaltet waren (Anhang Abb. 59). Während nach zwei Wochen einige Linien signifikant im Wachstum reduziert waren, waren Linie #4 und #7 durchweg kleiner als der Wildtyp (Abb. 61, A und B, Anhang Abb. 60 A-C). In Bezug auf die Entwicklung der ersten Knospen und Blüten konnte eine signifikante Verzögerung der Linien #1, #4, #5 und #7 gezeigt werden (Abb. 61; E und F). Weiterhin waren die Schoten der *FAX4*-RNAi #4 im Vergleich zum Wildtyp deutlich kleiner und verkümmert. Im Falle der *FAX4*-RNAi #4 konnte gezeigt werden, dass sich die Haarstrukturen der Narbe im Vergleich zum Wildtyp während der Befruchtung/Schotenentwicklung nicht zurückbildeten (Abb. 61, C und D). Eine Entfärbung der Schoten zeigte, dass im Vergleich zum Wildtyp in den Mutanten Samenanlagen fehlten und innerhalb der Schoten Lücken erkennbar waren (Abb. 61, E).

Um den beschriebenen Phänotyp der *FAX4*-RNAi Mutanten zu bestätigen, sollten *FAX4*-T-DNA-Insertionslinien charakterisiert, *Knockout*-Mutanten identifiziert und analysiert werden. Zum Nachweis einer möglichen T-DNA-Insertion in *FAX4*, wurden die T-DNA-Insertionslinien *fax4-1*, *fax4-2* und *fax4-3* betrachtet. Hierzu wurden Geschwisterlinien in T3 genotypisiert. Mittels Sequenzierung wurde gezeigt, dass die T-DNA-Insertion sowohl in der Mutationslinie *fax4-1* als auch der Mutationslinie *fax4-2* im untranslatierten Bereich am 5'-Ende der mRNA (5'-UTR) liegt. Die Insertion der *fax4-1* Linie liegt an Position -11 bp gezählt vom Startcodon (+1 ATG) und die Insertion der *fax4-2* Linie an Position -64 bp. Für die Linie *fax4-3* wurde die Insertion der T-DNA im ersten Exon des *FAX4* Gens an Position +118 bp festgestellt (Abb. 25).

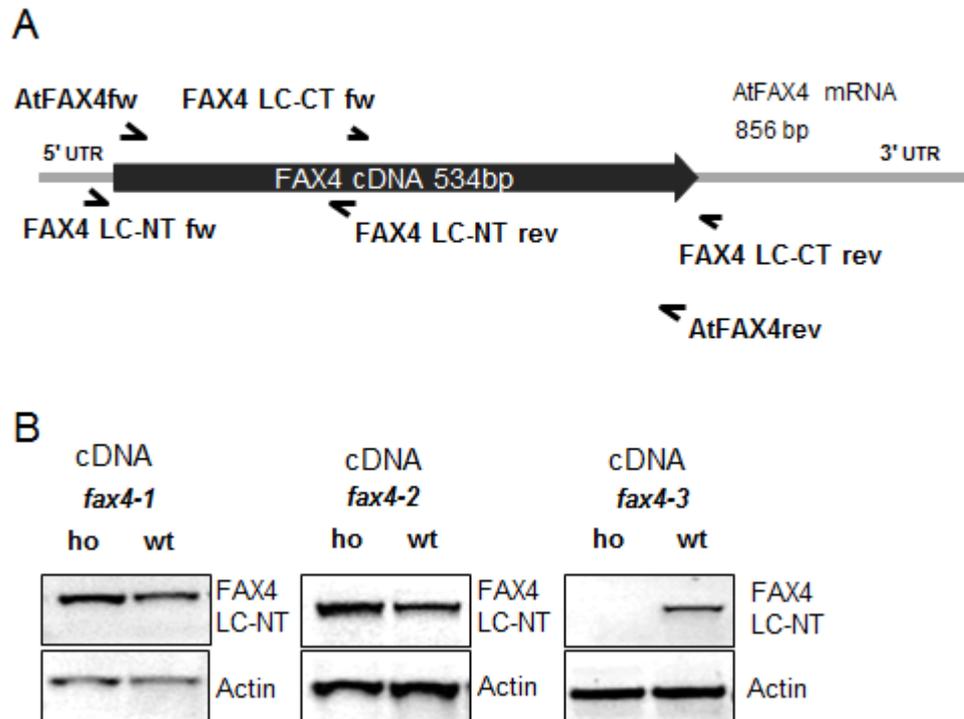


**Abb. 25: Charakterisierung von T-DNA-Insertionslinien in *At-FAX4* (At1g33265).** (A) Schematische Darstellung der genomischen DNA von *FAX4*. Die Gesamtlänge des *FAX4* Gens beträgt 3520 bp. Die T-DNA Insertionen der *fax4-1* und *fax4-2* Mutationslinien liegen im 5'-UTR, ausgehend vom Translationsstart +1 an Position -64 bp und -11 bp. Die Insertion der *fax4-3* Linie liegt im ersten Exon, ausgehend vom Translationsstart +1 an Position +118 bp. Dargestellt sind die für die Genotypisierung genutzten Primer Fax4LP und Fax4RP. Die T-DNA-Insertion ist als Dreieck und die Exons sind als schwarze Pfeile dargestellt. Maßstabsgetreu wiedergeben. (B) PCR-Genotypisierung (gDNA) der T-DNA-Mutationslinien *fax4-1*, *fax4-2*, *fax4-3*. Actin-PCR-Produkt (435 bp) als Kontrolle. FAX4: Amplifikation der genomischen Sequenz mit *At-FAX4* genspezifischem Primerpaar (601bp, *At-FAX4LP* und *At-FAX4RP*). T-DNA: Amplifikation der T-DNA-Insertion durch spezifische Primer (*At-FAX4LP* und *GabiLBSeq* / *LB1SAIL*, Produktgröße 365 bp (*fax4-1*), 664 bp (*fax4-2*), 567 bp (*fax4-3*)). Verwendet wurden heterozygote (he), homozygote (ho) und wildtyp (wt) Pflanzen. Zur Verifikation der in (A) gezeigten T-DNA-Insertionsstellen wurde die PCR-Produkte sequenziert. Bugaeva *et al.* (2021).

Die PCR Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien *fax4-1*, *fax4-2* und *fax4-3* ist in Abb. 25 beispielhaft und repräsentativ dargestellt. Zur Überprüfung der Isolation genomischer DNA diente eine Amplifikation eines Aktinfragmentes. In allen drei Linien zeigten homozygote (ho) Linien ein T-DNA-spezifisches PCR-Produkt 365bp (*fax4-1*), 664bp (*fax4-2*) und 567bp (*fax4-3*) und kein Amplifikat für die genomische *FAX4* Sequenz. Die Linien *fax4-1* #1, #3, *fax4-2* #6, #18 und *fax4-3* #2 konnten als homozygot für die Insertion der T-DNA in das Gen

*FAX4* bestätigt werden. Kein T-DNA-spezifisches Produkt zeigte sich bei den Wildtyplinien. Heterozygote Linien (he, *fax4-3* #3, #11, #12) wiesen beide PCR-Produkte auf.

Weiterhin sollten nun die, als homozygot bestätigten, T-DNA-Insertionslinien *fax4-1*, *fax4-2* und *fax4-3*, sowie Wildtyppflanzen als Kontrolle hinsichtlich des Transkriptgehaltes von *FAX4* mittels RT-PCR untersucht werden (Abb. 26).

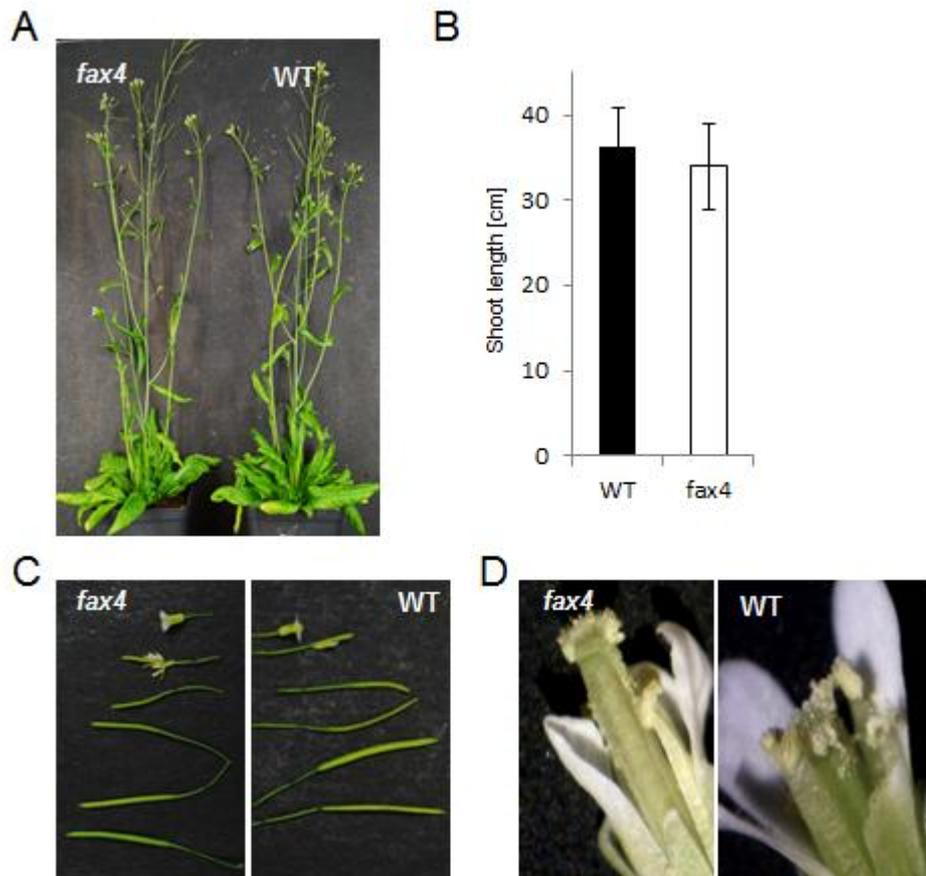


**Abb. 26: Charakterisierung homozygoter T-DNA-Insertionslinien *fax4-1*, *fax4-2* und *fax4-3* auf Transkriptebene mittels RT-PCR.** (A) Schematische Darstellung der *FAX4* mRNA (856 bp) inklusive 5' UTR und 3' UTR Bereich, eingezeichneter cDNA (534 bp, grauer Pfeil) und die Bindungspositionen der verwendeten Primer in dieser Arbeit. Produktgrößen: At-FAX4fw und rev = 531 bp, FAX4 LC-NT fw und rev = 321bp, FAX4 LC-CT fw und rev = 342bp. (B) RT-PCR auf cDNA von homozygoten (ho) und wildtypischen (wt) Pflanzen der T-DNA-Mutationslinien *fax4-1*, *fax4-2*, *fax4-3*. Actin: Aktin-PCR-Produkt (435 bp) als Kontrolle der cDNA. FAX4 LC-NT: FAX4 LC-NT fw und rev (321bp), zur Transkriptamplifikation von *FAX4*. Bugaeva *et al.* (2021).

In den homozygoten Pflanzen der T-DNA-Insertionslinien *fax4-1* und *fax4-2* (ho) konnte mittels cDNA spezifischer Primer ebenso wie in Wildtyppflanzen (wt) ein Produkt des *FAX4* Transkriptes amplifiziert werden und diese waren somit keine *Knockout*linien. Für homozygote (ho) Pflanzen der Linie *fax4-3* konnte kein Resttranskript von *FAX4* im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 26). Die homozygote T-DNA-Insertionslinie *fax4-3* #2 wurde somit als *Knockout*linie bestätigt und in den weiterführenden Analysen betrachtet.

Da es sich, wie bereits gezeigt wurde (Abb. 26), bei der *fax4-3* Mutante, um eine *Knockout*-Mutante handelt, sollte auch diese phänotypisch untersucht werden. Zum einen sollte so der Phänotyp der *FAX4*-RNAi Mutanten bestätigt werden und zum anderen erneut Hinweise auf die Funktion von *FAX4* in der Entwicklung von *Arabidopsis* erlangt werden. Diesmal unter der

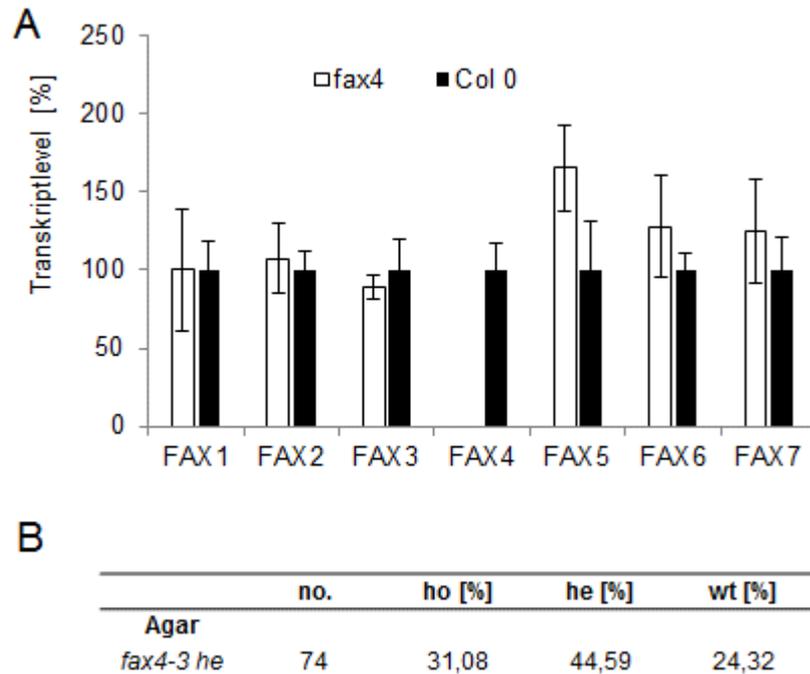
Berücksichtigung, dass kein *FAX4* Transkript vorhanden war. Wiederum wurden Schoten und Samenentwicklung mikroskopisch betrachtet, sowie das Wachstum der Pflanze verfolgt (Abb. 27). Verwendet wurden hierzu die *Knockoutlinie fax4-3 #2*, sowie eine Wildtyplinie *fax4-3 #3* im Vergleich.



**Abb. 27: Phänotypische Analysen der *Knockoutlinie fax4-3* vergleichend zum Wildtyp.** (A) Repräsentative Aufnahmen des Gesamthabitus und (B) Gesamtlänge [cm] des Haupttriebes nach 6 Wochen, sowie der Schoten (C) und Blüten (D) im Wildtyp (schwarz) und in der *fax4* Mutante (weiß). n= 10 Pflanzen. Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar.

Anders als die *FAX4*-RNAi waren *fax4 Knockouts* nicht kleiner als der Wildtyp und im Gesamthabitus unverändert (Abb. 27, A und B). Innerhalb der *fax4-3 Knockout*-Mutante konnte weder bei der Entwicklung der Schoten (Abb. 27, C und D), noch bei der Samenbildung ein Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden. Die Narbe der Mutante bildete ebenso wie die wildtypische Narbe ihre Haarstrukturen zurück und eine Befruchtung (Behaftung) mit Pollen konnte deutlich beobachtet werden (Abb. 27, D).

Um ebenso zu klären, ob *FAX* Proteine innerhalb der *fax4-3 Knockout*-Mutante komplementär oder koreguliert sind, wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Hierzu wurde aus Rosettenblättern (4 Wochen alt) RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert (Abb. 28, A). Des Weiteren sollte die Segregation in heterozygoten *fax4-3* Linien betrachtet werden (Abb. 28, B).



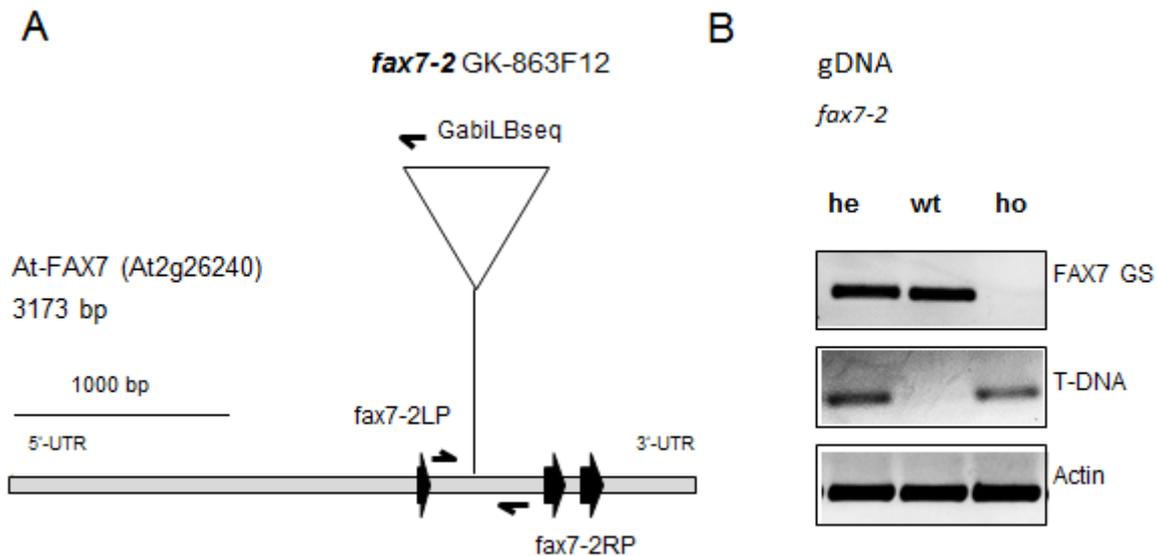
**Abb. 28: Expressions- und Segregationsanalysen der *fax4-3* Mutanten.** (A) Relativer Transkriptgehalt [%] der FAX-Proteine in den *fax4* *Knockout*-Mutanten in *Arabidopsis*-Rosettenblättern (4 Wochen). Die relativen Transkriptmengen der FAX-Proteine FAX1-FAX7 in WT-Pflanzen (schwarz) und *fax4* *Knockout*-Pflanzen (weiß) wurden mittels qRT PCR ermittelt. Die Normierung der Transkripte erfolgte auf Aktin. Die Detektion der Transkripte erfolgte mittels spezifischer Primerpaare. n= mind. 3, Batch aus je drei Pflanzen. Transkriptgehalt in Col-0/WT wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Verwendet wurde die jeweilige cDNA. \*: markiert Signifikanz < 0,05 bezogen auf den jeweiligen Wildtyp nach einem T-Test. (B) Segregationsanalysen der *fax4-3* Mutanten. Die Nachkommen der heterozygoten Einzelmutanten wurden auf Agarplatten gekeimt und nach ca. 2 Wochen genotypisiert. Die resultierende Genotypverteilung homozygot (ho), heterozygot (he), und wildtyp (wt) der Pflanzen wird in Prozent [%] angegeben. no.: Anzahl der analysierten Keimlinge.

In den *fax4-3* *Knockout*-Pflanzen konnte im Vergleich zum Wildtyp Col-0 kein signifikanter Unterschied im Transkriptgehalt der FAX-Gene FAX1 bis FAX7 nachgewiesen werden (Abb. 28, A). Ein transkriptioneller *Knockout* von *FAX4* konnte bestätigt werden. Die *fax4-3* Mutante wich in den Segregationsanalysen mit ca. 31 % homozygoten Nachkommen etwas von der Vorgabe nach Mendel (25% ho, 50% he, 25% wt) ab (Abb. 28, B).

Zusammengefasst konnte, der in den *FAX4*-RNAi beschriebene Phänotyp mithilfe der *fax4-3* *Knockout* Mutanten in den untersuchten Bedingungen nicht bestätigt werden.

#### 4.2.4.2 Charakterisierung der FAX7 T-DNA-Insertionslinie

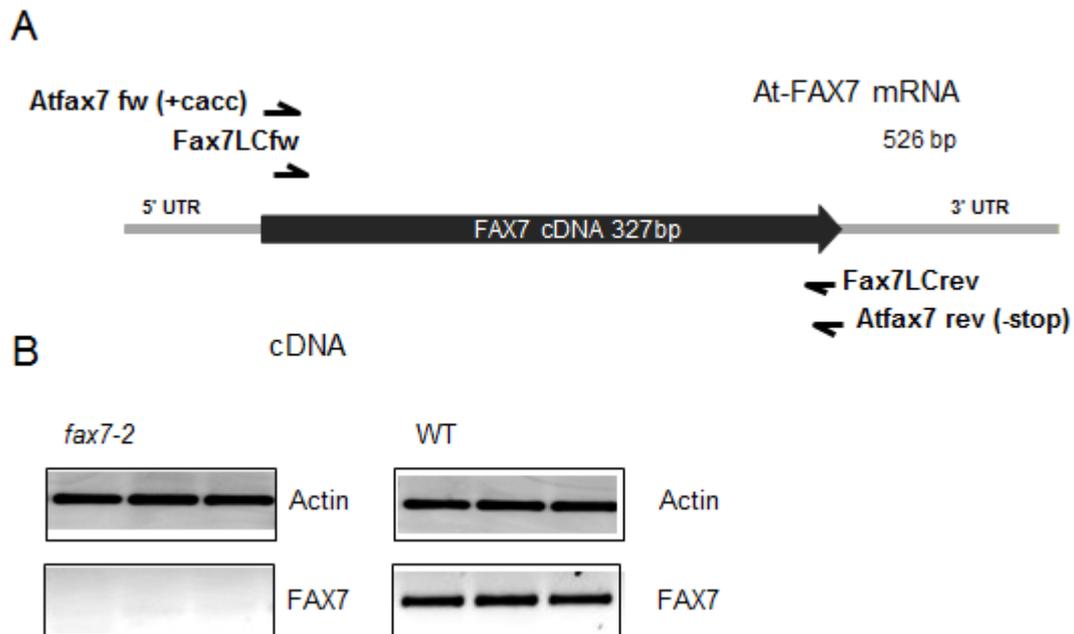
Hinsichtlich der T-DNA-Insertion in das Gen *At-FAX7* (At2g26240) wurde die Insertionslinie *fax7-2* (GK-863F12) wie bereits für *FAX4* beschrieben untersucht. Mittels Sequenzierung des T-DNA PCR Produkts wurde gezeigt, dass die T-DNA-Insertion ausgehend vom Translationsstart (+1) im ersten Intron (an Stelle +286) liegt (Abb. 29, A) Weiterhin folgte eine PCR-Genotypisierung (Abb. 29, B).



**Abb. 29: Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinie *fax7-2* (GK-863F12) in *At-FAX7* (At2g26240).** (A) Schematische Darstellung der genomischen DNA von *FAX7*. Die Gesamtlänge des *FAX7* Gens beträgt 3173 bp. Die T-DNA Insertionen der *fax7-2* Linie liegt ausgehend vom Translationsstart +1 im ersten Intron an Stelle +286. Dargestellt sind die für die Genotypisierung genutzten Primer Fax7-2LP und Fax7-2RP (gemom. Sequenz) und GabiLBSeq (T-DNA spezifisch) Die T-DNA-Insertion ist als Dreieck und die Exons sind als schwarze Pfeile dargestellt. Maßstabsgetreu wiedergeben. (B) PCR-Genotypisierung (gDNA) der T-DNA-Mutationslinien *fax7-2*. Aktin-PCR-produkt (435 bp) als Kontrolle. FAX7 GS: Amplifikation der genomischen Sequenz mit *At-FAX7* genspezifischem Primerpaar (400 bp, Fax7-2LP und Fax7-2RP. T-DNA: Amplifikation der T-DNA-Insertion durch spezifische Primer (Fax7-2LP und GabiLBseq, Produktgröße 280 bp. Verwendet wurden heterozygote (he), homozygote (ho) und wildtypische (wt) Pflanzen. Zur Verifikation der in (A) gezeigten T-DNA-Insertionsstellen wurde die PCR-Produkte sequenziert.

Die PCR Genotypisierung der T-DNA-Mutationslinien *fax7-2* ist in Abb. 29 beispielhaft und repräsentativ dargestellt. Zur Überprüfung der gDNA diente eine Amplifikation von Aktin. Die untersuchten homozygoten Pflanzen *fax7-2* zeigten ein spezifisches Produkt für die Insertion der T-DNA und kein Amplifikat für die genomische FAX7 Sequenz. Wildtyplinien zeigten keine für die T-DNA-Insertion spezifischen Produkte. Die T-DNA-Insertionslinie *fax7-2* #4 konnte hinsichtlich der Insertion in das FAX7 Gen als homozygot bestätigt werden.

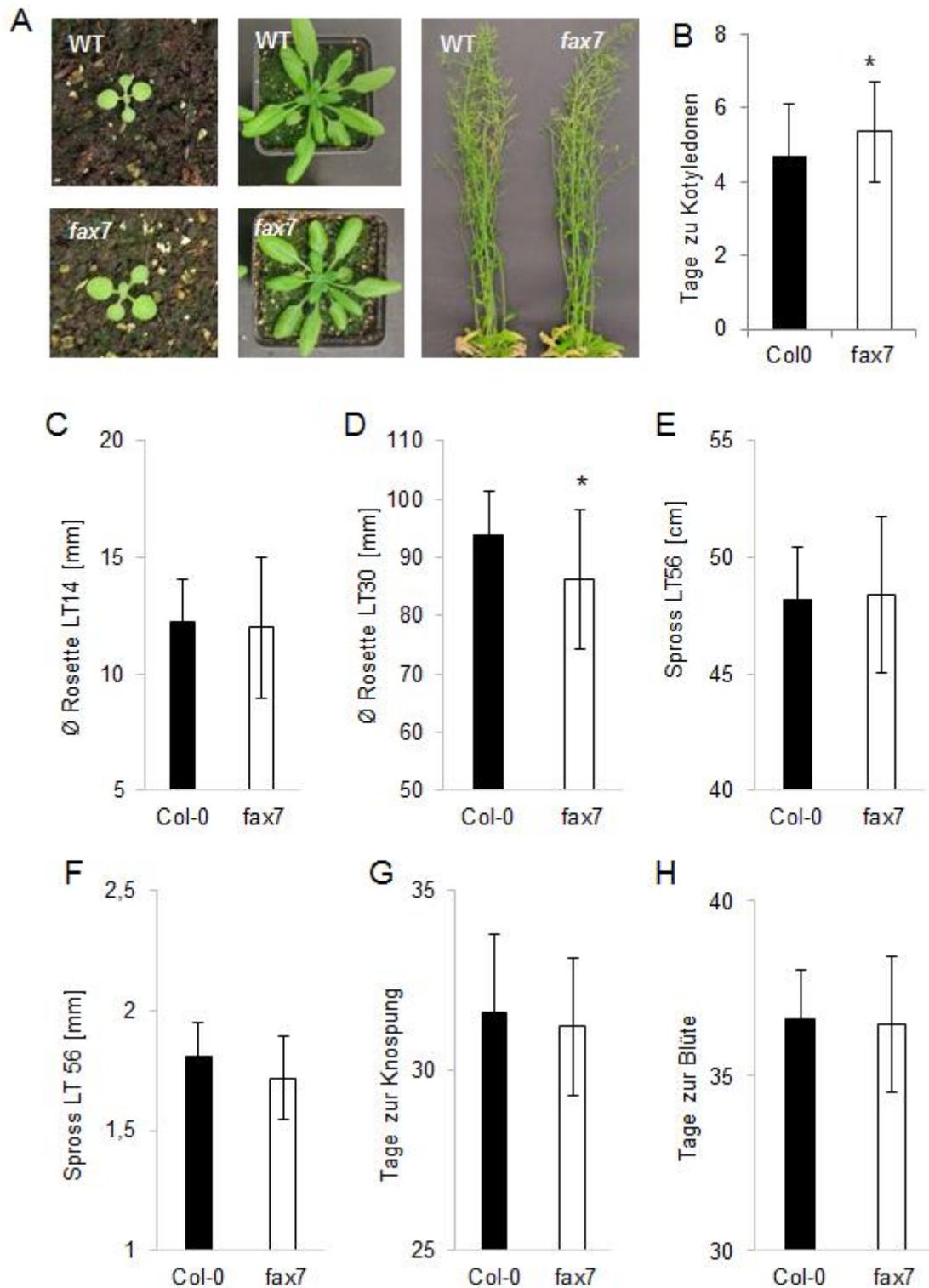
Die homozygote T-DNA-Insertionslinie *fax7-2* #4 sollte hinsichtlich des Transkriptgehaltes von *FAX7* mittels RT-PCR untersucht werden (Abb. 30).



**Abb. 30: Charakterisierung der homozygoten T-DNA-Insertionslinie *fax7-2* (GK-863F12) #4 auf Transkriptebene mittels RT-PCR.** (A) Schematische Darstellung der *FAX7* mRNA (4526 bp) inklusive 5'UTR und 3'UTR Bereich, eingezeichneter cDNA (327 bp, grauer Pfeil) und die Bindungspositionen der verwendeten Primer in dieser Arbeit. Produktgrößen: At-FAX7 fw (+caac) und At-FAX7 rev(-stop) = 328 bp, FAX7 LC fw und rev = 317 bp. (B) RT-PCR auf cDNA von homozygoten (ho, Linie #4) und wildtypischen (wt) Pflanzen der T-DNA-Mutationslinie *fax7-2*. Actin: Aktin-PCR-Produkt (435 bp) als Kontrolle der cDNA. FAX7: FAX7 LC fw und rev (317 bp), zur Transkriptamplifikation von *FAX7*.

Die homozygote T-DNA-Insertionslinie *fax7-2* #4 konnte als *Knockout*linie bestätigt werden. Für Pflanzen dieser Linie konnte kein Resttranskript von *FAX7* im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 30). Homozygote Tochterlinien von *fax7-2* #4 wurden in weiterführenden Analysen betrachtet.

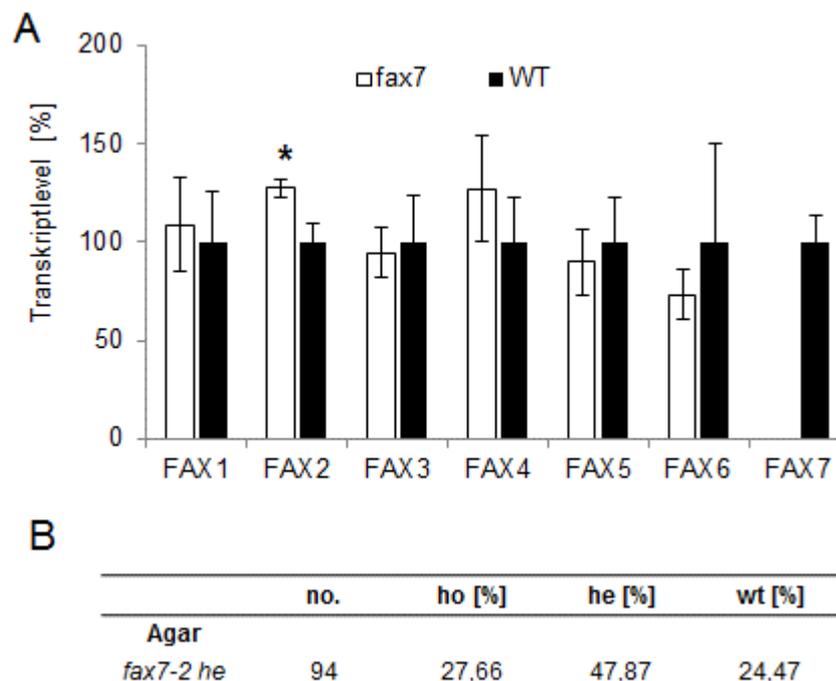
Analog zu *FAX4*-RNAi Mutanten wurde auch die *fax7-2* *Knockout*-Mutante in der Bachelorarbeit von Simon Both, 2018 detailliert phänotypisch analysiert, um die Rolle des Proteins *FAX7* rückwirkend während der Entwicklung von *Arabidopsis* betrachten zu können. Es erfolgte eine Keimungsanalyse auf Platte (Abb. 31, Anhang Abb. 59), sowie eine Phänotypisierung auf Erde (Abb. 31).



**Abb. 31: Phänotypische Analysen der *fax7-2 #4 Knockoutlinie* vergleichend zum Wildtyp Col-0.** (A) Repräsentative Aufnahmen der Rosette (LT 15 und 30, links) und Gesamthabitus (LT 56, rechts). (B) Anzahl der Tage bis zur Entfaltung der Kotyledonen auf Agarplatten. Insgesamt wurden insgesamt 100 Samen aus Nachkommen der Linie *fax7-2 #4* betrachtet. (C + D) Rosettendurchmesser in mm an Lichttag (LT) 14 und 30. (E) Gesamtlänge in cm und (F) Durchmesser in mm des Primärtriebes an Lichttag 56. (G) Tage bis zur ersten Knospung. (H) Tage bis zur ersten Blüte. Verwendet wurden fünf Tochterlinien der *fax7-2 #4* und die Daten gemittelt (*fax7*, weiß) und der Wildtyp Col-0 (schwarz). \*: Signifikanz < 5% vergleichend zum Wildtyp nach einem T-Test. Gezeigt sind Mittelwerte. Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar. n= mind. 9 Pflanzen.

Bezüglich der Keimungsanalyse zeigte sich, dass *fax7-2 Knockout*-Mutanten länger brauchten, um Kotyledonen vollständig auszubilden als der Wildtyp (Abb. 31, B). Allerdings waren Keimungszeitpunkt und die Ausbildung des ersten Blattpaares wieder ähnlich dem Wildtyp (Anhang Abb. 59). Allgemein konnte kein auffälliger Phänotyp auf Erde unter den getesteten Bedingungen bei *fax7-2 Knockout*-Mutanten beobachtet werden. Lediglich das Wachstum während der vegetativen Phase (3. bis 4. Entwicklungswoche) war leicht verzögert (Abb. 31, D). Darüber hinaus zeigten *fax7-2* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp weder einen Defekt im Wachstum (Abb. 31, A, C, E und F) noch eine verlangsamte Entwicklung, wie beispielsweise der Knospen- oder Blütenbildung (Abb. 31, G und H).

Um ebenso zu klären, ob FAX Proteine innerhalb der *fax7-2 Knockout*-Mutante komplementär oder koreguliert sind, wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Hierzu wurde aus Rosettenblättern (4 Wochen alt) RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert (Abb. 32, A). Des Weiteren sollte die Segregation in heterozygoten *fax7-2* Linien betrachtet werden (Abb. 32, B).



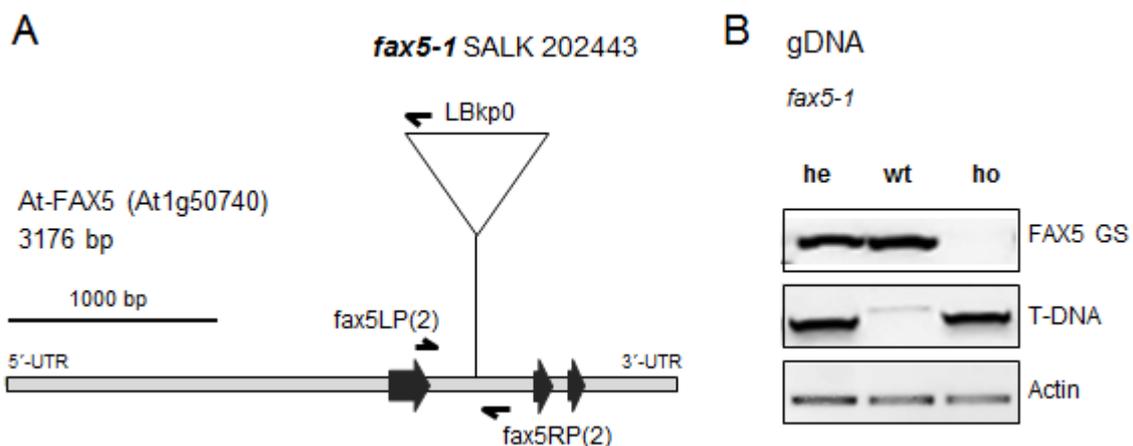
**Abb. 32: Expressions- und Segregationsanalysen der *fax7-2* Mutanten.** (A) Relativer Transkriptgehalt [%] der FAX-Proteine in den *fax7 Knockout*-Mutanten in *Arabidopsis*-Rosettenblättern (4 Wochen). Die relativen Transkriptmengen der FAX-Proteine FAX1 bis FAX7 in WT-Pflanzen (schwarz) und *fax7 Knockout*-Pflanzen (weiß) wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Die Normierung der Transkripte erfolgte auf Aktin. Die Detektion der Transkripte erfolgte mittels spezifischer Primerpaare. n = mind. 3, Batch aus je drei Pflanzen. Transkriptgehalt in Col-0/WT wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Verwendet wurde die jeweilige cDNA. \*: markiert Signifikanz < 0,05 bezogen auf den jeweiligen Wildtyp nach einem T-Test. (B) Segregationsanalysen von heterozygoten *fax7-2* Mutanten. Die Nachkommen der heterozygoten Einzelmutanten wurden auf Agarplatten gekeimt und nach ca. 2 Wochen genotypisiert. Die resultierende Genotypverteilung homozygot (ho), heterozygot (he), und wildtyp (wt) der Pflanzen wird in Prozent [%] angegeben. no.: Anzahl der analysierten Keimlinge.

Abb. 32, A zeigt, dass in *fax7-2 Knockout*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp der Transkriptgehalt von FAX2 um ca. 30 % signifikant erhöht war. Eine weitere differentielle Regulierung bezogen auf Wildtyppflanzen innerhalb der Transkriptmengen der FAX-Gene konnte nicht festgestellt werden. Die untersuchten heterozygoten Einzelmutanten *fax7-2* in *Arabidopsis* segregierten ähnlich der Vorgabe nach Mendel (25% ho, 50% he, 25% wt) (Abb. 32, B).

Zusammengefasst zeigten *fax7-2 Knockout*-Mutanten keinen auffälligen Phänotyp unter den getesteten Bedingungen vergleichend zum Wildtyp.

#### 4.2.4.3 Charakterisierung von FAX5 und FAX6 T-DNA-Insertionslinien

Analog zur obigen Vorgehensweise sollte auch die T-DNA-Insertionslinie *fax5-1* (SALK202443) hinsichtlich ihrer Insertion in das FAX5 Gen untersucht und eine homozygote Linie identifiziert werden. Mittels Sequenzierung des T-DNA PCR Produkts wurde gezeigt, dass die T-DNA-Insertion ausgehend vom Translationsstart (+1) im ersten Intron (an Stelle +418) liegt (Abb. 33, A). Weiterhin folgte eine PCR-Genotypisierung (Abb. 33, B).

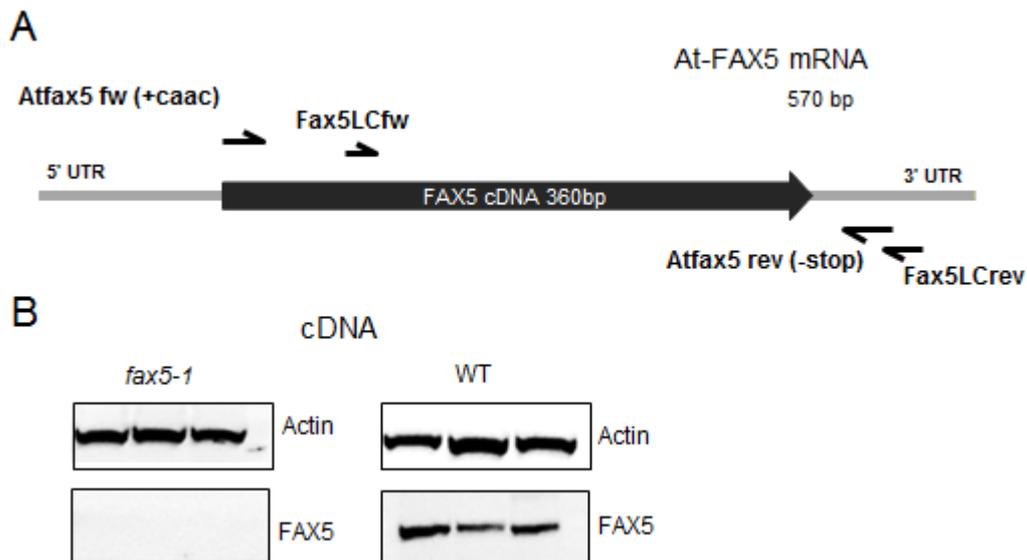


**Abb. 33: Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinie *fax5-1* (SALK 202443) in *At-FAX5* (At1g50740).** (A) Schematische Darstellung der genomischen DNA von FAX5. Die Gesamtlänge des FAX5 Gens beträgt 3176 bp. Die T-DNA Insertionen der *fax5-1* Linie liegt ausgehend vom Translationsstart +1 im ersten Intron an Stelle +418. Dargestellt sind die für die Genotypisierung genutzten Primer Fax5LP(2) und Fax5RP(2). Die T-DNA-Insertion ist als Dreieck und die Exons sind als schwarze Pfeile dargestellt. Maßstabsgetreu wiedergeben. (B) PCR-Genotypisierung (gDNA) der T-DNA-Mutationslinien *fax5-1*. Aktin-PCR-produkt (435 bp) als Kontrolle. FAX5 GS: Amplifikation der genomischen Sequenz mit *At-FAX5* genspezifischem Primerpaar (415 bp, At-FAX5LP(2) und At-FAX5RP(2)). T-DNA: Amplifikation der T-DNA-Insertion durch spezifische Primer (At-FAX5LP(2) und LBkp0, Produktgröße 572 bp. Verwendet wurden heterozygote (he), homozygote (ho) und wildtypische (wt) Pflanzen. Zur Verifikation der in (A) gezeigten T-DNA-Insertionsstellen wurde die PCR-Produkte sequenziert.

Die untersuchte homozygote Linie *fax5-1* zeigte ein spezifisches Produkt für die Insertion der T-DNA und kein Amplifikat für die genomische FAX4 Sequenz. In Wildtyplinien konnte kein T-DNA-spezifisches Produkt amplifiziert werden. Die SALK-Linie 202443 konnte hinsichtlich der Insertion in das FAX5 Gen als homozygot bestätigt werden. Die daraus entstandenen und

ebenfalls homozygoten Tochterlinien *fax5-1* #4 und #13 wurden in dieser Arbeit experimentell verwendet.

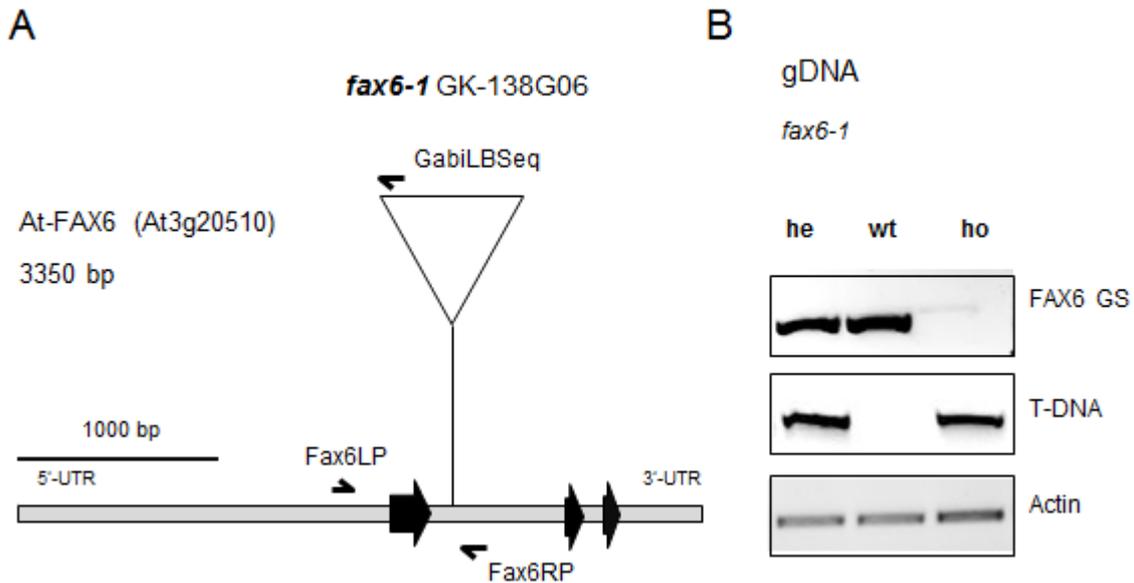
Weiterhin sollten nun die, als homozygot bestätigte, T-DNA-Insertionslinie *fax5-1* sowie Wildtyppflanzen, als Kontrolle, hinsichtlich des Transkriptgehaltes von *FAX5* mittels RT-PCR untersucht werden (Abb. 34).



**Abb. 34: Charakterisierung der homozygoten T-DNA-Insertionslinien *fax5-1* (SALK202443) auf Transkriptebene mittels RT-PCR.** (A) Schematische Darstellung der *FAX5* mRNA (570 bp) inklusive 5' UTR und 3' UTR Bereich, eingezeichneter cDNA (360 bp, grauer Pfeil) und die Bindungspositionen der verwendeten Primer in dieser Arbeit. Produktgrößen: *At-FAX5* fw (+caac) und *At-FAX5* rev(-stop) = 357bp, *FAX5* LC fw und rev = 347 bp. (B) RT-PCR auf cDNA von homozygoten (ho) und wildtypischen (wt) Pflanzen der T-DNA-Mutationslinien *fax5-1*. Actin: Aktin-PCR-Produkt (435 bp) als Kontrolle der cDNA. FAX5: *FAX5* LC fw und rev (347 bp), zur Transkriptamplifikation von *FAX5*.

Die homozygote T-DNA-Insertionslinie *fax5-1* konnte mittels cDNA spezifischer Primer als *Knockout*linie bestätigt werden. Für homozygote (ho) Pflanzen dieser Linie konnte kein Resttranskript von *FAX5* im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 34). Homozygote Tochterlinien wurden in weiterführenden Analysen betrachtet.

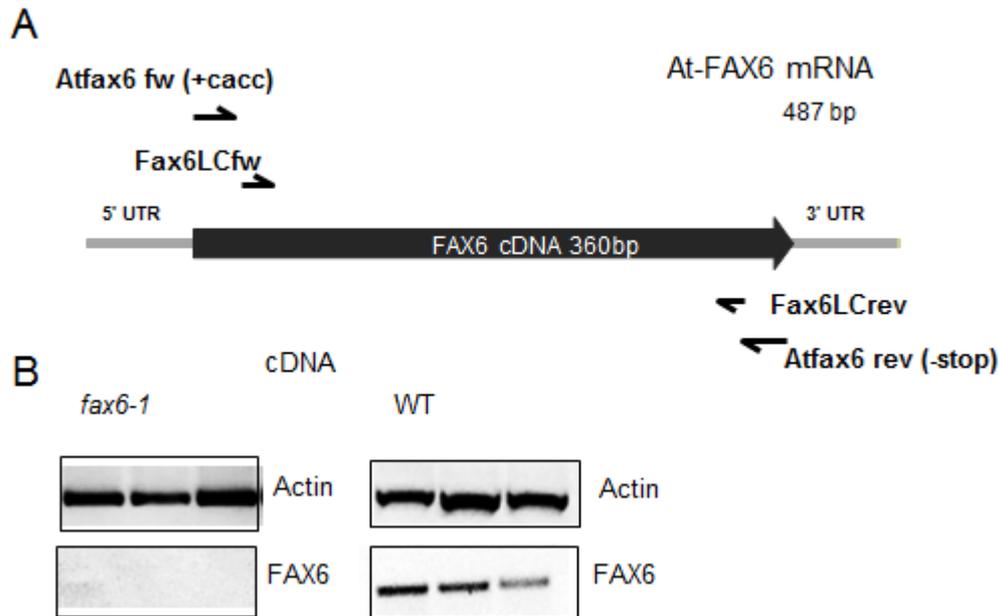
Hinsichtlich der T-DNA-Insertion in das Gen *FAX6* wurde die Insertionslinie *fax6-1* (GK-138G06) wie bereits für *FAX4* bis *FAX7* beschrieben untersucht. Mittels Sequenzierung des T-DNA PCR Produkts wurde gezeigt, dass die T-DNA-Insertion ausgehend vom Translationsstart (+1) im ersten Intron (an Stelle +280) liegt (Abb. 35, A). Weiterhin folgte eine PCR-Genotypisierung (Abb. 35, B).



**Abb. 35: Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinie *fax6-1* (GK-138G06) in *At-FAX6* (At3g20510).** (A) Schematische Darstellung der genomischen DNA von *FAX6*. Die Gesamtlänge des *FAX6* Gens beträgt 3350 bp. Die T-DNA Insertionen der *fax6-1* Linie liegt ausgehend vom Translationsstart +1 im ersten Intron an Stelle +280. Dargestellt sind die für die Genotypisierung genutzten Primer Fax6LP und Fax6RP (genom. Sequenz) und GabiLBSeq (T-DNA spezifisch). Die T-DNA-Insertion ist als Dreieck und die Exons sind als schwarze Pfeile dargestellt. Maßstabsgetreu wiedergeben. (B) PCR-Genotypisierung (gDNA) der T-DNA-Mutationslinien *fax6-1*. Aktin-PCR-produkt (435 bp) als Kontrolle. FAX6 GS: Amplifikation der genomischen Sequenz mit *At-FAX6* genspezifischem Primerpaar (552 bp, *At-FAX6LP* und *At-FAX6RP*). T-DNA: Amplifikation der T-DNA-Insertion durch spezifische Primer (*At-FAX6LP* und GabiLBseq, Produktgröße 775 bp. Verwendet wurden heterozygote (he), homozygote (ho) und wildtypische (wt) Pflanzen. Zur Verifikation der in (A) gezeigten T-DNA-Insertionsstellen wurde die PCR-Produkte sequenziert.

Die PCR Genotypisierung der T-DNA-Mutationslinien *fax6-1* ist in Abb. 35 beispielhaft und repräsentativ dargestellt. Die untersuchte homozygote Linie *fax6-1* #2 zeigte ein spezifisches Produkt für die Insertion der T-DNA und kein Amplifikat für die genomische *FAX6* Sequenz. In Wildtyplinien konnte kein T-DNA-spezifisches Produkt gezeigt werden. Die T-DNA-Insertionslinie *fax6-1* #2 konnte hinsichtlich der Insertion in das *FAX6* Gen als homozygot bestätigt werden.

Nun sollte die, als homozygot bestätigte, T-DNA-Insertionslinie *fax6-1* #2 hinsichtlich des Transkriptgehaltes von *FAX6* mittels RT-PCR zur Identifikation von einem möglichen *Knockout* untersucht werden (Abb. 36).



**Abb. 36: Charakterisierung der homozygoten T-DNA-Insertionslinie *fax6-1* (GK-138G06) #2 auf Transkriptebene mittels RT-PCR.** (A) Schematische Darstellung der *FAX6* mRNA (487 bp) inklusive 5'UTR und 3'UTR Bereich, eingezeichneter cDNA (360 bp, grauer Pfeil) und die Bindungspositionen der verwendeten Primer in dieser Arbeit. Produktgrößen: At-FAX6 fw (+caac) und At-FAX6 rev(-stop) = 357 bp, FAX6 LC fw und rev = 306 bp. (B) RT-PCR auf cDNA von homozygoten (ho, Linie #2) und wildtypischen (wt) Pflanzen der T-DNA-Mutationslinie *fax6-1*. Actin: Aktin-PCR-Produkt (435 bp) als Kontrolle der cDNA. FAX6: FAX6 LC fw und rev (306 bp), zur Transkriptamplifikation von FAX6.

Die homozygote T-DNA-Insertionslinie *fax6-1* #2 konnte mittels cDNA spezifischer Primer als *Knockout*linie bestätigt werden. Für homozygote (ho) Pflanzen dieser Linie konnte kein Resttranskript von *FAX6* im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 36). Die Linie *fax6-1* #2 wurde in weiterführenden Analysen betrachtet.

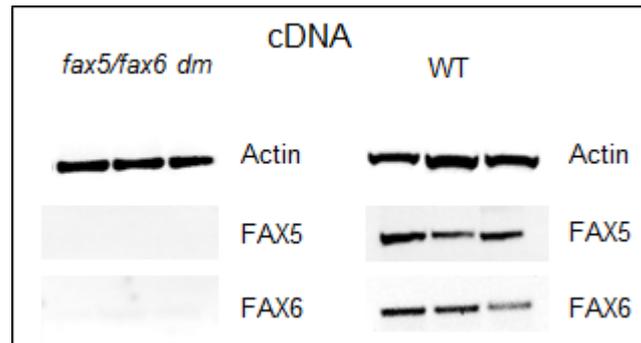
Die Proteine FAX5, FAX6 und FAX7 sind alle in Membranen des sekretorischen Weges vorhergesagt (Li *et al.*, 2015). FAX5 und FAX6 sind auf Aminosäuresequenzebene zu 81 % identisch (Könnel *et al.*, 2019). Aus diesen Gründen sollten Doppel-*Knockout*-Mutanten generiert werden, um die FAX-Proteine FAX5, FAX6 und FAX7 im jeweiligen Zusammenhang zu untersuchen und mögliche Komplementationeffekte in Einzelmutanten zu umgehen. So sollten Rückschlüsse auf ihre Funktion in *Arabidopsis* gezogen werden. Zur Erstellung von *Arabidopsis*-FAX Doppelmutanten wurden homozygote Einzelmutanten der T-DNA-Insertionslinien, *fax5-1*, *fax6-1* und *fax7-2* in Generation T4 unter Standardbedingungen auf Erde angezogen. Nach Ausbildung der Infloreszenzen (nach ca. 5-6 Wochen), wurden entsprechende Pflanzen zur Kreuzung ausgewählt und präpariert. Die Kreuzungsvarianten (Narbe (weiblich) x Pollen (männlich)), sowie die resultierende Doppelmutante sind in Tab. 13 dargestellt.

**Tab. 13: Übersicht der Kreuzung zur Erstellung von *Arabidopsis*-Doppelmutanten.** Verwendete Linien und Darstellung der Kreuzungsvarianten (Narbe (weiblich) x Pollen (männlich)) und resultierende Doppelmutantenbezeichnung.

Ansatz	Narbe x Pollen	Doppelmutante
1	<i>fax5-1</i> #4 x <i>fax6-1</i> #2	<i>fax5/fax6</i>
2	<i>fax5-1</i> #13 x <i>fax6-1</i> #2	<i>fax5/fax6</i>
3	<i>fax6-1</i> #2 x <i>fax5-1</i> #13	<i>fax5/fax6</i>
4	<i>fax5-1</i> #13 x <i>fax7-2</i> #4	<i>fax5/fax7</i>
5	<i>fax7-2</i> #4 x <i>fax5-1</i> #13	<i>fax5/fax7</i>
6	<i>fax6-1</i> #2 x <i>fax7-2</i> #4	<i>fax6/fax7</i>
7	<i>fax7-2</i> #4 x <i>fax6-1</i> #2	<i>fax6/fax7</i>

Da bereits Sequenzanalysen zeigten, dass FAX5 und FAX6 zu 81% in ihrer Aminosäuresequenz identisch waren und auch die Lokalisationsvorhersagen für beide ähnlich sind, lag eine mögliche Komplementation in ihrer Funktion in der Pflanze nahe. Daher wurden zunächst mit den *fax5/fax6* Doppelmutanten weitergearbeitet, um diese zu bestätigen und im Vergleich zu den Einzelmutanten zu charakterisieren. Hierzu wurden Kreuzungsansatz 1 und 3 parallel weiterverfolgt.

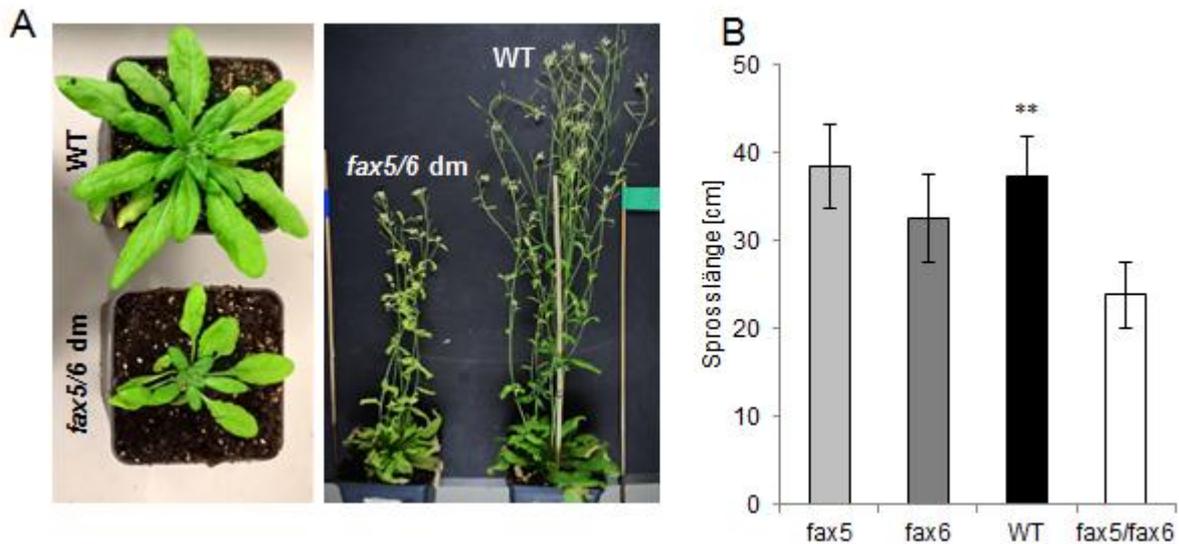
Ausgehend von den Samen wurden die für beide T-DNA-Insertionslinien heterozygoten Pflanzen (F1) (*fax5/fax6* (he/he)) vermehrt und als unabhängige Linien betrachtet. Eine detaillierte Tabelle, die die heterozygoten Linien ihrem Kreuzungsansatz zuordnet ist im Anhang dargestellt (Tab. 14). Hieraus resultierten unter anderem die heterozygoten Linien *fax5/fax6* dm #14 und #30. Nachkommen (F2) dieser Linien wurden analog zu den Einzelmutanten genotypisiert vermehrt (Anhang Tab. 14). Innerhalb dieser Nachkommen sollten hinsichtlich beider T-DNA-Insertionen (*fax5-1* und *fax6-1*) homozygote Pflanzen (*fax5/fax6* ho/ho) bestimmt und als Doppel-*Knockout* identifiziert werden (Abb. 37).



**Abb. 37: Charakterisierung der homozygoten *fax5/fax6* Doppelmutanten auf Transkriptebene mittels RT-PCR.** RT-PCR auf cDNA von homozygoten *fax5/fax6 dm* und wildtypischen (WT) Pflanzen. Aktin: Aktin-PCR-Produkt (435 bp) als Kontrolle der cDNA. FAX5: FAX5 LC fw und rev (347 bp), zur Transkriptamplifikation von FAX5. FAX6: FAX6 LC fw und rev (306 bp), zur Transkriptamplifikation von FAX6.

In *fax5/fax6* Doppelmutanten, die homozygot für beide T-DNA-Insertionslinien waren, konnte ebenfalls ein *Knockout* beider Gene bestätigt werden. Die Doppelmutanten zeigten weder ein Amplifikat des *FAX5* noch des *FAX6* Gentranskriptes (Abb. 37).

Auch die Rolle von *FAX5* und *FAX6* innerhalb der Entwicklung von *Arabidopsis* sollte untersucht werden. Hierzu wurden sowohl die Einzel-*Knockout*-Mutanten *fax5-1*, *fax6-1* als auch die *fax5/fax6 dm* (ho/ho) im Vergleich zum rücksegregierten Wildtyp untersucht. Auch hier wurden die Schoten- und Samenentwicklung, sowie das Wachstum der Pflanze verfolgt und vergleichend mit dem Wildtyp dargestellt (Abb. 38, Anhang, Abb. 62).

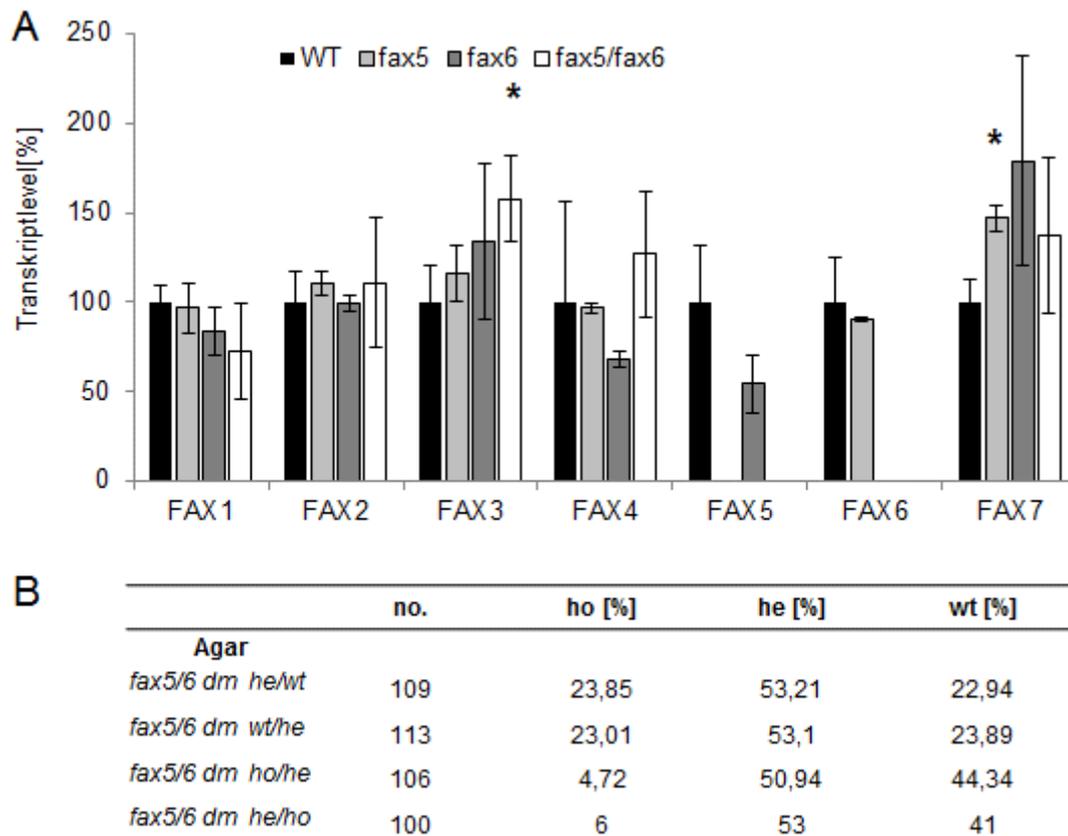


**Abb. 38: Phänotypische Analysen der *fax5/fax6 dm* (ho/ho) vergleichend zum rücksegregierten Wildtyp *fax5/fax6* (wt/wt).** (A) Repräsentative Aufnahmen des Gesamthabitus nach 4 (links) und 8 Wochen (rechts). (B) Gesamtlänge [cm] des Haupttriebes nach 6 Wochen. Verwendet wurden die Einzelmantanten *fax5-1*, *fax6-1*, die *fax5/fax6 dm* (ho/ho) und der rücksegregierte Wildtyp (*fax5/fax6 wt/wt*). WT (schwarz) und *fax5* (hellgrau), *fax6* (dunkelgrau) und *fax5/fax6* (weiß). \*\*: Signifikanz < 0,01 vergleichend zum Wildtyp nach einem T-Test. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar. n= mind. 6 Pflanzen.

Bei der Phänotypisierung von *fax5/fax6 dm* (ho/ho) zeigten sich deutliche Unterschiede zum Wildtyp. Die Doppelmutanten waren signifikant kleiner. Diese konnte allerdings erst ab ca. der 4. Entwicklungswoche im Rosettenstadium beobachtet werden (Abb. 38, A und B). Ebenso zeigten *fax5/fax6 Knockout*-Mutanten eine verzögerte Allgemeinentwicklung. Während der Wildtyp bereits in der 4. Wochen einen Knospungsansatz zeigte, konnte dies in den *fax5/fax6 dm* nicht beobachtet werden. Erst in der 8. Woche bildeten die *fax5/fax6 dm* Blüten und erste Schoten aus, während im Wildtyp schon reife Schoten aufwies (Abb. 38). Die Einzelmantanten *fax5-1* und *fax6-1* unterschieden sich in Größe und Entwicklung nicht vom Wildtyp (Abb. 38, B und Anhang Abb. 62, B).

Mittels Expressionsanalysen sollte geklärt werden, ob FAX Proteine innerhalb der *fax5/fax6* Mutanten komplementär oder koreguliert sind. So wären Rückschlüsse auf unterschiedliche oder ähnliche Funktionen der FAX-Proteine innerhalb des Metabolismus von *Arabidopsis* möglich und eine Erklärung von entstehenden oder ausbleibenden Phänotypen beim Verlust einzelner oder mehrerer FAX-Proteine. Hierzu wurde aus Rosettenblättern (4 Wochen alt) RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. In *fax5-1* und *fax6-1* Einzelmantanten, sowie in *fax5/fax6 dm* (ho/ho) wurde die Expression der FAX-Proteine FAX1 bis FAX7 untersucht und grafisch dargestellt (Abb. 39, A). Bereits Li *et al.* (2015) zeigte, dass im Segregationsverhalten von *fax1* Mutanten ein Verlust an homozygoten Nachkommen in der Folgegeneration vorlag (4-7 % homozygote Nachkommen anstelle von 25%). Somit konnte die Rolle von FAX1 bei der Pollenentwicklung, genauer der Bildung der äußeren Pollenwand, und der resultierenden männlichen Sterilität nachgewiesen werden. Deshalb sollten auch *fax5*, *fax6* und *fax5/fax6* Mutanten diesbezüglich untersucht werden, um mögliche Rückschlüsse auf deren Bedeutung bei der Fertilität und der Pollenentwicklung in

*Arabidopsis* zu ziehen. Hierzu wurden Linien in Generation T2 von *fax5/fax6* dm (*he/wt*, *wt/he* und *he/ho*, *ho/he*) verwendet. Es sollte zum einen die Segregation innerhalb der Einzelmutanten und zum anderen in den Doppelmutanten analysiert werden, wenn ein Gen bereits als *Knockout* zu Grunde lag. Die Pflanzen wurden im Keimlingsstadium (2 Wochen alt) mit Gen bzw. T-DNA-Insertion spezifischen Primern genotypisiert (Abb. 39, B).



**Abb. 39: Expressions- und Segregationsanalysen der *fax5*- und *fax6*-Einzelmutanten, sowie *fax5/fax6* Doppelmutanten.** (A) Relativer Transkriptgehalt [%] der FAX-Proteine in den jeweiligen *Knockout*-Mutanten in *Arabidopsis*-Rosettenblättern (4 Wochen). Die relative Transkriptmenge der FAX-Proteine FAX1 bis FAX7 in WT-Pflanzen (schwarz) und *fax5* (hellgrau), *fax6* (dunkelgrau) und *fax5/fax6* (weiß) *Knockout*-Pflanzen wurde mittels qRT PCR ermittelt. Die Normierung der Transkripte erfolgte auf Aktin. Die Detektion der Transkripte erfolgte mittels spezifischer Primerpaare. n= mind. 3, Batch aus je drei Pflanzen (nur *fax5/fax6* sind Einzelpflanzen, n=3). Transkriptgehalt in Col-0/WT wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Verwendet wurde die jeweilige cDNA. \*: markiert Signifikanz < 0,05 bezogen auf den jeweiligen Wildtyp nach einem T-Test. (B) Segregationsanalysen von *fax5/fax6* dm. Die Nachkommen der heterozygoten Mutanten *fax5/fax6 he/wt*, *wt/he*, *ho/he* und *he/ho* wurden auf Agarplatten gekeimt und nach ca. 2 Wochen genotypisiert. Die resultierende Genotypverteilung homozygot (ho), heterozygot (he), und wildtyp (wt) der Pflanzen wird in Prozent [%] angegeben. no.: Anzahl der analysierten Keimlinge.

In den *fax5-1 Knockouts* waren die Transkriptmengen für FAX1 bis FAX4 und FAX6 Wildtyp-ähnlich, während für FAX7 eine signifikante Erhöhung des Transkriptes im Vergleich zum Wildtyp, detektiert werden konnte (Abb. 39, A). Im Vergleich zum Wildtyp konnten in den *fax6-1 Knockouts* keine signifikant veränderten Transkriptmengen festgestellt werden. In den *fax5/fax6 dm Knockout*-Mutanten war der Transkriptgehalt von FAX3 signifikant um ca. 57% erhöht (Abb. 39, A). Alle anderen Transkriptlevel waren vergleichend zum Wildtyp

unverändert. In dieser Analyse konnte wiederum bestätigt werden, dass es sich bei allen verwendeten Pflanzen um *Knockouts* der jeweiligen FAX-Gene handelte, denn es konnten spezifisch keine Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 39). Die Segregationsanalysen zeigten, dass die *fax5* und *fax6* Einzelmутanten, repräsentiert durch *fax5/fax6* dm he/wt und wt/he, nicht abweichend des Mendelschemas (25% ho, 50% he, 25% wt) segregierten (Abb. 39, B). Anders zeigte es sich bei den Segregationsanalysen der Doppelmutanten (*fax5/fax6* dm ho/he und he/ho). Lag ein *fax5 Knockout* (*fax5/fax6* dm ho/he) bereits vor, segregierte FAX6 nur zu ca. 4,7 % in homozygote Nachkommen und zu ca. 44 % in wildtypische Nachkommen. Ähnlich verhielt es sich, wenn bereits *fax6* ausgeknockt (*fax5/fax6* dm he/ho) war. Hier konnten 6 % homozygote und 41 % wildtypische Nachkommen identifiziert werden. In beiden Fällen zeigte sich die Verteilung heterozygoter Nachkommen angelehnt an Mendel (ca. 50 %) (Abb. 39, B). In *fax5/fax6* dm konnte also ein ähnlicher Phänotyp hinsichtlich des Segregationsverhalten und somit ein Verlust homozygoter Nachkommen gezeigt werden, als bei *fax1* Mutanten (Li *et al.*, 2015).

Aufgrund der veränderten Segregation in *fax5/fax6* Doppelmutanten sollte auch eine veränderte Schoten- und Samenentwicklung innerhalb der Einzel- und Doppel-*Knockout*-Mutanten genauer untersucht werden. Deshalb wurden Blüten und Schoten betrachtet (Abb. 40, Anhang Abb. 62). So sollte überprüft werden, ob eine Befruchtung der Narbe stattfand oder ähnlich, wie bei *fax1* Mutanten eine männliche Sterilität zu Grunde lag (Li *et al.*, 2015).



**Abb. 40: Betrachtung der Befruchtung, Schoten- und Samenentwicklung des rücksegregierten Wildtypes (*fax5/fax6 wt/wt*) und der *fax5/fax6 dm* (*Knockout ho/ho*).** (A) Gesamtblütenhabitus des Wildtypes (oben) und der *fax5/fax6 dm* (unten) zur Analyse der Befruchtung. Weiße Pfeilspitzen: Vorhandensein von Pollen bei WT Antheren (oben) und Fehlen der Pollen, verkürzte Antheren und fehlende Befruchtung der Narbe, keine Rückbildung der Haarstrukturen bei *fax5/fax6 dm* (unten). (B) Nahaufnahme der Antheren im WT (oben) und der *fax5/fax6 dm* (unten). Weiße Pfeilspitzen: Pollenkörner bei Wildtyp-Antheren (oben), fehlende Pollenkörner bei *fax5/fax6 dm* (unten). Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen. (C) Schotenentwicklung in verschiedenen Stadien im Wildtyp (links) und der *fax5/6 dm* (*ho/ho*) (rechts). Weiße Pfeilspitzen: keine Rückbildung der Haarstrukturen, verkürzte und verkümmerte Schoten. (D) Betrachtung der Samenbildung in entfärbten Schoten im Wildtyp (*wt/wt*), *fax5/6 dm* *he/ho*, *ho/he* und *ho/ho*. Weiße Pfeilspitzen: beispielhafte Markierung fehlender Samen.

In den *Knockout*-Mutanten der T-DNA-Insertionslinien *fax5-1* und *fax6-1* konnte bezüglich der Befruchtung, Schoten- und Samenentwicklung in allen Analysen kein Unterschied zu Wildtyp festgestellt werden (Anhang Abb. 62). Allerdings konnte in *fax5/fax6 dm Knockout*-Mutanten ein Defekt in der Befruchtung beobachtet werden. Zum einen zeigte sich bei einer genaueren Betrachtung der Blüten, dass die Antheren der *fax5/fax6 dm* deutlich verkürzt waren (Abb. 40, A), zum anderen waren vergleichend zu den Wildtyppflanzen keine Pollen erkennbar (B). Auch die Haarstrukturen der Narbe, welche sich nach Befruchtung zurückbilden, blieben bei den *fax5/fax6 dm* erhalten (Abb. 40, A unten). Ebenso konnte eine

Ausbildung verkürzter und verkümmerter Schoten, welche noch immer die Narbentypischen Haarstrukturen aufwiesen, festgestellt werden (Abb. 40, B). In entfärbten Schoten konnten bereits in *fax5/fax6* dm *he/ho* oder *ho/he* Mutanten Lücken in der Samenanlage beobachtet werden, obwohl die Schotenentwicklung unauffällig war (Abb. 40, C). Doppel-*Knockouts* (*fax5/fax6 ho/ho*) konnten keine Samen mehr ausbilden (Abb. 40, D) und waren somit steril.

Zusammenfassend konnte in *fax5/fax6* Doppel-*Knockout*-Mutanten ein ähnlicher Phänotyp in *Arabidopsis*-Mutanten beschrieben werden, der bereits von Li *et al.* (2015) für den Verlust des Proteins FAX1 gezeigt werden konnte.

## 5 Diskussion

Plastiden sind von zwei Hüllmembranen abgegrenzte Organellen, die bei verschiedenen zellulären Prozessen wie der Energieproduktion durch Fotosynthese oder auch der Fettsäure- und Lipidbiosynthese eine wichtige Rolle spielen. Um ihre Biogenese und ihre Funktion zu regulieren, müssen Plastiden mit anderen Zellkompartimenten kommunizieren. Diese Kommunikation kann durch Signalmoleküle und durch die Herstellung direkter Kontakte zwischen der Plastidenhülle und anderen Organellen vermittelt werden. Die Mechanismen der Bildung von Plastiden-Organellen Kontaktstellen und ihre Funktionen sind jedoch noch immer weitestgehend unklar (Mueller-Schuessele und Michaud, 2018). Ebenso war lange fraglich, wie im plastiden synthetisierte Fettsäuren zur weiteren Lipidsynthese ins ER exportiert werden. Hier konnte erstmals die Charakterisierung des Fettsäureexport-Proteins FAX1 (*Fatty Acid Export 1*) in der inneren Hüllmembran (IE) von Chloroplasten Aufschlüsse geben (Li *et al.*, 2015). Innerhalb der FAX-Familie sind in *Arabidopsis thaliana* sieben Proteine bekannt. In dieser Arbeit sollten vor allem die Proteine der FAX-Familie FAX4, FAX5, FAX6 und FAX7 genauer charakterisiert werden. Um ihre Topologie, Funktion und Rolle im Fettsäure/Lipidhaushalt der Pflanze, analog zu FAX1 zu untersuchen, wurden vergleichende Sequenzanalysen, ein funktioneller Komplementationsassay in Hefe, Lokalisationsstudien und Charakterisierungen von FAX-Mutanten in *Arabidopsis* durchgeführt. Des Weiteren sollten neue Hypothesen zu Funktion und Transportmechanismen der FAX-Proteine entwickelt werden und eine mögliche Rolle in der Bildung von Membrankontaktstellen zwischen Organellen diskutiert werden. Zur zukünftigen Strukturaufklärung und funktionellen Analysen sollte die rekombinante Expression und Proteinaufreinigung am Protein FAX1 etabliert werden.

### 5.1 Rekombinante Expression in *E. coli*

Trotz der biologischen und pharmakologischen Bedeutung von Membranproteinen sind strukturelle und funktionelle Studien im Vergleich zu löslichen Proteinen immer noch wenig vertreten: Derzeit sind >1200 Membranproteinstrukturen verfügbar, was etwa 3% der bisher >35'000 insgesamt bekannten Proteinstrukturen ausmacht (*mpstruc database*, <https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>). Um Membranproteine strukturell und funktionell zu untersuchen, müssen einige Anforderungen beachtet werden. Zum einen spielt bei der rekombinanten Expression die Qualität und zum anderen die Quantität des exprimierten Proteins eine Rolle (Wang *et al.*, 2003). So ist beispielsweise die Gewinnung ausreichender Proteinmengen ein überwiegendes Problem, denn rekombinante Membranproteine sind in der Regel schwach exprimiert (Bill *et al.*, 2011; Korepanova *et al.*, 2005). Um die für Strukturanalysen benötigte Quantität und Qualität an Protein zu gewinnen, ist ein geeignetes Expressionssystem unerlässlich (Quick und Wright, 2002).

In dieser Arbeit konnte die Expression und Aufreinigung des chloroplastidären Membranproteins FAX1 aus *Arabidopsis* etabliert und nachfolgend optimiert werden. FAX1 wurde erfolgreich in *E. coli* Bakterien exprimiert, aus isolierten *E. coli* Membranen mittels des Detergens DDM (n-Dodecylmaltosid) solubilisiert und mit einer Konzentration von 1 mg/ml aufgereinigt. Der Nachweis von FAX1 erfolgte über eine Antikörper-spezifische Detektion. Das Protein FAX1 konnte bereits 2015 von Li *et al.*, hinsichtlich seiner Rolle während der Entwicklung, sowie des Fettsäure- und Lipidmetabolismus in *Arabidopsis* charakterisiert werden. Mit seinen vier  $\alpha$ -Helices, welche eine Tmemb14\_Domäne (Pfam|PF03647) bilden, ist FAX1 aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten der Familie der TMEM14 Proteine zugeordnet. Die Funktion der TMEM14 Proteine ist außer für FAX1-Familie bislang ungeklärt, obwohl diese Proteinfamilie allgegenwärtig in Eukaryoten und in einigen Bakterien vertreten ist (InterPro|UPF0136; Li *et al.*, 2015). In Menschen sind die TMEM14A und TMEM14C Proteine in der mitochondrialen Membran lokalisiert. Eine NMR-Struktur (*nuclear magnetic resonance*) der humanen Proteine TMEM14A und C liegt bereits vor (Klammt *et al.*, 2012). TMEM14A enthält eine amphiphile N-terminale Helix, die sich vermutlich an der Lipid-Wasser-Grenzfläche befindet, während für TMEM14C eine amphiphile Helix zwischen der zweiten und dritten Membrandomäne platziert ist, die senkrecht zur Lipiddoppelschicht orientiert ist. Für ihre Analysen exprimierten Klammt *et al.* (2012) TMEM14A und C in einem *E. coli*-basierendem zellfreien Expressionssystem. Dieser Ansatz wurde auch für die Expression des Proteins FAX1 verfolgt (Dr. Jens Neunzig, AG Prof. Dr. Philippar, UdS, Saarbrücken). Das zellfreie Expressionssystem erwies sich allerdings aufgrund schlechter Expression von FAX1 und somit geringer resultierender Proteinquantität als nicht geeignet. Li *et al.* (2015) konnten in Strukturmodellen für FAX1 eine höhere strukturelle Ähnlichkeit zu TMEM14C und für FAX5/6 zu TMEM14A beobachten. Im Gegensatz zu den menschlichen Proteinen zeigt FAX1 einen verlängerten, variablen N-Terminus, der eine zusätzliche  $\alpha$ -helikale Domäne beinhaltet, die höchstwahrscheinlich nicht in die IE integriert. Eine spezifische Funktion dieses N-Terminus während des Transportes von Fettsäuren/Lipiden ist nicht auszuschließen (Li *et al.*, 2015, Könnel *et al.*, 2019). Um letztlich die tatsächliche Struktur von FAX1 aufzuklären und *in vitro* Funktionsanalysen durchführen zu können, ist eine rekombinante Expression und Aufreinigung des Proteins in ausreichender Menge und Reinheit notwendig, die innerhalb dieser Arbeit erzielt wurde.

### **Expressionsbedingungen**

Als geeignetes Expressionssystem wurde in dieser Arbeit der *E. coli* Stamm BL21 etabliert. *E. coli* ist eines der weit verbreiteten Systeme für heterologe Proteinexpression und besitzt einige Vorteile: Das Bakterium weist unter optimalen Bedingungen eine schnelle Wachstumskinetik mit einer Verdopplungszeit von ca. 20 min auf, erreicht eine hohe Zelldichte, ist leicht zu kultivieren und schnell und einfach zu transformieren (Rosano und Ceccarelli, 2014). Eine erfolgreiche Expression von Membranproteinen mit vorhergesagten  $\alpha$ -Helices konnte in *E. coli* bereits mehrfach gezeigt werden (Wang *et al.*, 2003; Quick und Wright, 2002). Der Expressionsstamm BL21 konnte bereits erfolgreich für Membranproteine etabliert werden (Kästner *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2003, Korepanova, 2005). Ein wichtiger

Faktor für die erfolgreiche Expression von Membranproteinen in *E. coli* ist die Wahl des Plasmid-Vektors. Für die Expression von FAX1 wurde mit dem Expressionsvektor pBADMyHisA (Invitrogen) gearbeitet. Ein idealer Vektor sollte einen regulierten, moderaten Promotor haben und zugleich eine weite Spanne möglicher Konzentrationen der die Expression induzierenden Substanz ermöglichen. Somit werden Hintergrundexpression, Proteolyse oder Zelltod bei der Expression toxischer Proteine verhindert. Zu starke Promotoren führen zur vermehrten Bildung von Proteinaggregaten, sogenannten *Inclusion Bodies*, da die Maschinerie der Proteintranslation und Insertion überlastet ist. Variable Konzentrationen an Induktor erlauben eine bessere Kontrolle der Expression. Für den Vektor pBAD konnte bereits gezeigt werden, dass er die aufgeführten Kriterien erfüllt und somit für die Expression von Membranproteinen in *E. coli* geeignet ist (Wang *et al.*, 2003). Mittels des pBAD-Expressionssystems konnten für Membranproteine bereits Proteinkonzentrationen von 1 mg pro Liter Expressionskultur isoliert werden (Li *et al.*, 2001; Auer *et al.*, 2001). Eine Kombination aus dem *E. coli* Expressionsstamm BL21 und pBAD als Expressionsvektor wurde zuvor erfolgreich verwendet (Wang *et al.*, 2003; Lilie *et al.*, 1998; Weickert *et al.*, 1996; Guzman *et al.*, 1995, Grisshammer und Tate, 1995).

Des Weiteren ist die Expression von Membranproteinen und die Bildung von *Inclusion Bodies* abhängig von den Expressionsbedingungen, wie z.B. von Medium, Induktorkonzentration, Zelldichte bei Induktion und Zellernte, Temperatur und Expressionsdauer (Auer *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001), weshalb auch in dieser Arbeit unterschiedliche Bedingungen für FAX1 getestet wurden. Hier wurde, wie in der Literatur beschrieben, die Expression in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase induziert und vor der stationären Phase geerntet. Es zeigte sich, dass bei einer Induktion bei  $OD_{600} = 0,6$  und einer anschließenden Expressionszeit zwischen 6-8 h FAX1 erfolgreich exprimiert wurde, wobei nach 8 h die Ausbeute am höchsten war. Generell führt die Verwendung von Vollmedium zu einer höheren Zelldichte und somit zu mehr exprimiertem Protein, weshalb als Expressionsmedium das Vollmedium LB verwendet wurde. Es konnte gezeigt werden, dass das für FAX1 mittels Antikörpernachweis detektierte Signal bei einer verlängerten Expressionsdauer (über Nacht), vergleichend zu 6-8 h, im Zellysate-Überstand stark abnahm. Aus der Literatur geht hervor, dass eine zu lange Expressionsdauer zu Proteolyse führen kann, was die Reduktion des Signals, ebenso wie die gelegentlich für FAX1 detektierte Doppelbande, erklären kann (Kiefhaber *et al.*, 1991; Schein und Noteborn, 1988). Weiterhin wurde bei der Übernachtskultur die exponentielle Wachstumsphase deutlich überschritten. Bei einer Erhöhung der Expressionstemperatur auf 37°C konnte ebenfalls kaum FAX1 Signal im Zellysate-Überstand detektiert werden, hinzu kam hier ein starkes FAX1 Signal im Pellet des Zellysates. Dies deutet auf die vermehrte Bildung von *Inclusion Bodies* hin. Eine Minderung der Expressionstemperatur kann die Bildung von *Inclusion Bodies* reduzieren, da diese abhängig von Proteinsynthese- und Proteinfaltungsrate ist. Beispielsweise konnte für einen Magnesiumtransporter im pBAD-System gezeigt werden, dass eine Expression bei 37°C vermehrt zu *Inclusion Bodies* führt, während eine Reduktion der Temperatur nach Induktion der Expression die Bildung dieser verhindern konnte (Wang *et al.*, 2003). Ähnlich verhielt es

sich auch für die Expression von FAX1, weshalb die optimale Expressionstemperatur mit 24°C bestimmt wurde.

Um die Expressionsbedingungen für FAX1 zukünftig weiterhin zu optimieren, könnte man in den Expressionsstamm C43 wechseln, der eine hohe Kapazität für die Produktion von mitochondrialen Membranproteinen aufweist. Dieser Stamm zeigte sich weniger sensitiv gegenüber toxischen Effekten bedingt durch eine Überexpression von Membranproteinen (Miroux und Walker, 1996). Kästner *et al.* (2000), konnten zeigen, dass so die Ausbeute des 2-Hydroxycarboxylat Transporters CitS fünffach im Vergleich zum Expressionsstamm BL21 gesteigert werden konnte. Zudem könnte die Expression bei noch geringeren Temperaturen (22-24°C) untersucht werden. Des Weiteren wurde die *Arabidopsis* cDNA Sequenz von FAX1 nicht für *E. coli* Codon-optimiert. Codon-Optimierung könnte den Gehalt an exprimiertem Protein steigern. Allerdings geht eine effektivere Translation nicht mit der Bildung von funktionellem Protein einher. Um ein funktionelles Protein zu erhalten, muss die Polypeptidkette korrekt gefaltet werden (Gustafsson *et al.*, 2004).

### **Isolierung und Aufreinigung**

Zur Aufreinigung müssen Membranproteine aus ihren komplexen biologischen Membranen extrahiert und anschließend von umgebenden Proteinen isoliert werden. Aufgrund ihrer hydrophoben Oberflächenreste verlieren sie jedoch typischerweise abseits vom biologischen Membransystem ihre Stabilität und neigen in wässriger Umgebung zur Aggregation (Fiedler *et al.*, 2010). Um die Wasserunlöslichkeit von Membranproteinen zu überwinden, sind membranmimetische Systeme, wie Detergenzien, erforderlich, die die stabilisierende Lipid-Doppelschicht-Umgebung der biologischen Membran nachahmen. Detergenzien sind eine Klasse amphiphiler oberflächenaktiver Mittel, sogenannter Tenside, mit einer hydrophilen Kopfgruppe und typischerweise einer hydrophoben Kohlenwasserstoffkette. Aufgrund ihrer konischen Form aggregieren sie in wässriger Umgebung im Allgemeinen zu kugelförmigen Detergenzsmizellen. Detergenzien sind in der Lage, die Lipid-Doppelschicht der Membran zu zerstören und somit Membranproteine zu extrahieren und zu solubilisieren, wodurch eine stabilisierende hydrophobe Umgebung geschaffen wird. Aufgrund ihrer geringen Größe und unimodalen Verteilung ermöglichen diese Protein/Detergens-Komplexe spektroskopische Untersuchungen am Zielprotein. Die Stabilität dieser Komplexe wird durch Kohäsionswechselwirkungen zwischen Detergenzmolekülen und Detergens-Protein-Wechselwirkungen bestimmt (Khao *et al.*, 2011). Aber auch im solubilisierten Detergensgebundenen Zustand sind Membranproteine weniger stabil, als in ihrer natürlichen, lipidreichen Umgebung (le Maire *et al.*, 2000; White und Wimley, 1999; Haltia und Freire, 1995).

Um FAX1 aus isolierten *E. coli* Membranen zur weiteren Aufreinigung zu solubilisieren wurde DDM als Detergens verwendet. Gerade im Fall von Proteinen mit  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen erwies sich DDM bislang aufgrund seiner gering denaturierenden Eigenschaften als geeignetes Detergens (Privé, 2007). Da Membranproteine gleichzeitig

hydrophile und hydrophobe Bereiche besitzen, also einen amphiphilen Charakter aufweisen, aggregieren oder präzipitieren sie in Anwesenheit ungünstiger oder starker Detergenzien, wie Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) schnell. Diesen Detergenzien fehlen in der Regel wichtige Membran-Doppelschichteigenschaften, wie die typische Membrandicke und imitieren daher oft nur teilweise die Lipid-Doppelschicht-Umgebung, was zur Aggregation und Denaturierung von Membranproteinen führen kann (Zhou und Cross, 2013).

Um nach der Expression das Protein über Affinitätschromatographie aufzureinigen und mittels Antikörpern zu detektieren, wurde ein 6x His-Tag C-terminal an FAX1 fusioniert. Für FAX1 wurde mit einem Imidazolgradienten von 100 mM – 1 M eluiert, wobei das meiste Protein bei 100 – 500 mM in Lösung ging. Dies deutet auf eine spezifische Bindung des Proteins mittels His-Tags an die Ni-NTA-Beads hin und somit auf eine geeignete Aufreinigungsmethode. Der Polyhistidin-Tag bindet mit mikromolarer Affinität an zweiwertige Nickel- oder Cobalt-Ionen, hier in Form von Ni-NTA-Agarosebeads, wodurch die Proteine immobilisiert werden. Das Protein kann durch Elution über einen Imidazolgradienten von 75 – 300 mM aufgereinigt werden. Imidazol konkurriert spezifisch mit dem Protein und löst die Bindung zu den Ni-NTA-Agarosebeads. Mittels anschließender Dialyse oder Gelfiltration wird das Imidazol entfernt (Hengen 1995; Hochuli *et al.*, 1987). His-Tags konnten bereits für lösliche Proteine als effektiv beschrieben werden (Edwards *et al.*, 2000). Bezüglich der Membranproteine scheint die Länge des His-Tags relevant zu sein. Beispielsweise verringerte sich die Expression des Aquaporins (AqpZ), während die unspezifische Oligomerisation des Proteins zunahm, wenn der His-Tag von sechs auf zehn Polyhistidin verlängert wurde (Mohanty und Wiener 2004). Ebenfalls kann der His-Tag die spätere Kristallisation beeinflussen und die Qualität der Kristalle mindern (Bucher *et al.*, 2002).

Die nach Ni-Affinitätschromatographie aufgereinigten Eluate von FAX1 waren mit Fremdproteinen kontaminiert. Zum einen könnte diese durch andere Histidin-reiche Proteine erklärbar sein, zum anderen durch unspezifische Bindungen. Diese Verunreinigung konnte durch Reduktion der eingesetzten Menge an Ni-NTA-Agarosebeads und Verringerung der Inkubationszeit mit dem DDM-solubilierten Protein vermindert werden. Zusammen mit der Erhöhung der Imidazolkonzentration auf mind. 20 mM im Waschpuffer konnten unspezifische Bindungen weitestgehend ausgewaschen und die Reinheit des Proteins erhöht werden. Ein weiteres Problem bei der Verwendung von His-Tags ist, das natürliche Histidin-reiche Proteine des Expressionsorganismus, ebenso mit Nickelionen, und somit den Nickel-NTA-Beads interagieren und bei Aufreinigung koeluieren (Bolanos-Garcia und Davies, 2006; Wülfing *et al.*, 1994). Zur weiteren Reinigung von FAX1 erfolgte deshalb eine Größenausschlusschromatographie, um Kontaminationen mit größeren Proteinen zu reduzieren. Falls die Verunreinigung *E. coli*-eigener Histidin-reicher Proteine hier eine größere Rolle spielen sollte, könnte auf den Expressionsstamm LOBSTR, welcher BL21 als genetischen Hintergrund trägt, zurückgegriffen werden. Durch genetische Modifikation der häufigsten Histidin-reichen Proteine konnten in diesem Stamm weniger Kontamination

festgestellt und so eine höhere Reinheit des exprimierten Proteins erlangt werden (Andersen *et al.*, 2013; Robichon *et al.*, 2011). Ab einem Imidazolgehalt von 40 mM im Waschpuffer konnte mittels Antikörpernachweis eine schwache Hintergrundbande auf der Höhe von FAX1 detektiert werden. Es ist also nicht auszuschließen, dass FAX1 bereits in geringen Mengen auch unterhalb von 100 mM Imidazol eluiert. Hier sollten zukünftig Konzentrationen zwischen 50 mM und 100 mM untersucht werden. Dennoch korrelierte bei den in dieser Arbeit gewählten Parametern eine gute Proteinreinheit mit geringem Proteinverlust.

Die Aufreinigung von FAX1 erfolgte aus Gründen der Protein-Stabilität in Anwesenheit von 20% Glycerol und bei pH 8. Der Glycerolgehalt wurde in der anschließenden Größenausschlusschromatografie auf 5% herunterverdünnt. Nach Größenausschlusschromatographie wurden Fraktionen in denen FAX1, im Vergleich zu der Verunreinigung vor allem von Proteinen >60 kDa, im Überschuss vorlag vereinigt und mittels Amicon-Zentrifugation auf einen Proteingehalt von 1mg/ml konzentriert. Auf diese Weise isoliertes FAX1 Protein war bei 4°C über Nacht stabil, zur längeren Lagerung wurde es bei -80°C eingefroren.

### Weiterführende Analysen

Da auf die Expression und Aufreinigung des Proteins in Zukunft Struktur- und Funktionsanalysen folgen sollen, musste bereits während der Etablierung einiges beachtet werden, um neben der Proteinreinheit auch weitere Voraussetzungen für nachfolgende Experimente zu schaffen. Grundsätzlich sind alle Proteine hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber der Umgebung einzigartig. Detergens, Lipide, pH-Wert und Temperatur beeinflussen die Stabilität und Monodispersität/Homogenität vieler Transportproteine (Poolman und Knol, 1999; Li *et al.*, 2001; Auer *et al.*, 2001; Boulter und Wang, 2001; Engel *et al.*, 2002). Um eine Kristallstruktur des Proteins zu erhalten, muss ein Protein stabil und monodispers bei 4°C oder 20°C über Tage oder Wochen vorliegen (Ferre-D'Amare und Burley, 1994; Garavito *et al.*, 1996; Rosenbusch *et al.*, 2001). Hohe Glycerinkonzentrationen (bis zu 20%) können die Stabilität von Membrantransportern in Lösung erhöhen. Glycerin kann die Struktur von Detergensanordnungen beeinflussen, sodass die gebildeten Protein-Detergens-Mizellen dichter gepackt und weniger komprimierbar werden, was zu einer nativeren membranähnlichen Umgebung führt (Deutscher *et al.*, 1990, Engel *et al.*, 2002).

Generell sind Proteine besser zu kristallisieren, wenn sie homogen vorliegen (Kwong *et al.*, 1999). Biochemisch bedingte Heterogenität kann durch freies, ungebundenes Detergens, also Detergens-Monomere, oder Protein-freie Detergensmizellen in der Lösung entstehen. So wird die Verteilung von Protein-Detergens Mizellen im Kristallisationsansatz beeinflusst. Aus diesem Grund erfolgte in dieser Arbeit die Solubilisierung von FAX1 mit 1% DDM und konnte im Laufe der Aufreinigung bis hin zu 0,05% DDM für die Gesamtkonzentration von 1 mg/ml FAX1 gedrosselt werden, ohne ein Ausfallen oder Aggregieren des Proteins zu initiieren. Es ist also wichtig, die Detergenskonzentration so gering wie möglich zu halten und trotzdem die Löslichkeit des Proteins zu gewährleisten. Als Detergens mit einer geringen

CMC (*critical micellar concentration*) ist für DDM eine Konzentration von 0,1- 0,2 % bei einer Proteinkonzentration von 5-10 mg/ml im Kristallisationsansatz als ausreichend beschrieben. Diese Detergenkonzentration kann reguliert werden durch den Gehalt an Detergens im letzten Reinigungsschritt und einer anschließenden Aufkonzentration mittels Größenausschlusszentrifugation (Auer *et al.*, 2001; Engel *et al.*, 2002; Boulter und Wang, 2001).

Konformationelle Heterogenität aufgrund intrinsischer, struktureller Flexibilität von Membranproteinen kann die Kristallisation ebenfalls beeinflussen. Im Gegensatz zu Proteinen deren Reaktionszyklus nur die Bindung prosthetischer Gruppen umfasst, sind Membrantransporter hochflexibel (Deisenhofer *et al.*, 1985; Kühlbrandt *et al.*, 1994). Letztlich ist also auch das Protein selbst ein wichtiger Parameter der Kristallisation, da flexible Termini und Loops von Proteinen oft die Bildung qualitativ guter Kristalle verhindern. Es konnte gezeigt werden, dass Kernproteine ohne diese flexiblen Regionen besser zu kristallisieren sind (Doyle *et al.*, 1998; Kwong *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 1995). Da FAX1, wie bereits beschrieben, einen verlängerten N-Terminus aufweist, wäre es denkbar, dass dieser nachfolgende Analysen stören könnte. Hier könnte ein neuer Expressionsansatz, welcher sich auf die Tmemb\_14-Domäne und somit auf die Kernregion von FAX1 beschränkt, angegangen werden. Alternativ könnten auch die Proteine FAX5 und FAX6 exprimiert und aufgrund ihrer Ähnlichkeit in Sequenz und Topologie zu FAX1 Rückschlüsse gezogen werden. FAX5 und FAX6 bestehen nur aus den Tmemb\_14 Domänen und haben keine verlängerten Termini (Li *et al.*, 2015, Könnel *et al.*, 2019). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich aber bereits, dass FAX5 und FAX6 nach der *in vitro* Translation für Importstudien in isolierte Hefeorganellen aggregierten. So könnten FAX5 oder FAX6 aufgrund ihrer Hydrophobizität im Falle der rekombinanten Expression in *E. coli* ebenfalls Aggregate und *Inclusion Bodies* bilden. Das Kristallisationsverhalten kann ebenfalls durch Ko-aufgereinigte Lipide aus dem Expressions-Organismus beeinflusst werden, da diese die Heterogenität der Proteinkonformation und der Größenverteilung der Mizellen verändern. Allerdings konnte gezeigt werden, dass gerade bei Membranproteinen ein bestimmter Gehalt an Lipiden, also eine Restkontamination, vor Denaturierung und Aggregation des Proteins schützt (Auer *et al.*, 2001; Engel *et al.*, 2002; Boulter und Wang, 2001).

Ausgehend von einer Konzentration von 1 mg/ml aufgereinigtem FAX1 konnten in der vorliegenden Arbeit weitere Analysen durchgeführt werden. Ziel war es, die entstandenen Protein-DDM-Mizellen im Vergleich zu proteinfreien DDM-Mizellen mittels dynamischer (*dynamic light scattering*, DLS) und statischer Lichtstreuung zu untersuchen, und somit die Größenverteilung und das Molekulargewicht der Mizellen zu bestimmen. Daraus konnten dann Rückschlüsse auf das Protein FAX1 bezüglich einer möglichen Oligomerisierung gezogen werden. DLS und SEC-MALS (*Size-Exclusion-Multi-Angle-Light-Scattering*; Größenausschlusschromatographie gekoppelt mit statischer Lichtstreuung, UV, und Brechungsindex) ergaben ein Molekulargewicht für FAX1-DDM-Komplexe von ca. 90 kDa, welches sich gut mit dem Molekulargewicht der Protein-freien DDM-Mizellen deckte. Reine DDM-Mizellen sind gemittelt 53 kDa groß, die Größe kann aber zwischen 20 und 95 kDa

variieren (Strop und Brunger, 2005; Oliver *et al.*, 2013). Anhand der SEC-MALS-Daten wird deutlich, dass im Gegensatz zu reinen DDM-Mizellen in den FAX1-Mizellen eine UV-Absorption bei 280 nm und somit Protein nachgewiesen werden konnte. In den Protein-Detergens-Mizellen liegt also mit hoher Wahrscheinlichkeit FAX1 vor. Dass sich Mizellen mit FAX1 in ihrem Molekulargewicht nicht um die errechnete Größe von FAX1 von ca. 25 kDa unterscheiden, liegt daran, dass der Anteil an gebundenem Detergens gerade bei Membranproteinen stark abhängig von der Größe des Proteins und der Art des Detergens ist. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass FAX1 unter den gewählten Bedingungen meist als Monomer vorlag, da durch die Oligomerisierung deutlich größere Mizellen zu erwarten wären. Untersuchungen verschiedener Detergenzien mit Membranproteinen unterschiedlicher Größe, Form, Art und Anzahl der Membrandomänen zeigten, dass die Menge an gebundenem Detergens abhängig vom Detergens selbst, der Anzahl an abzuschirmenden Membrandomänen des Proteins und der damit zugänglichen hydrophoben Oberfläche ist. Diese Varianz konnte vor allem im Fall von DDM gezeigt werden (Chaptal *et al.*, 2017). Protein-Detergens-Komplexe bilden im Gegensatz zu Protein-freien Detergens-Mizellen keine kugelförmigen Mizellen und unterscheiden sich daher in der Anzahl der DDM-Moleküle, die sich um die Membrandomänen des Proteins zusammenlagern. Die DLS-Daten der FAX1-DDM-Mizellen zeigen, dass über 70% der vorliegenden Partikel einen hydrodynamischen Durchmesser von ca. 4 nm aufwiesen. Hier wird deutlich, dass die Größenverteilung der Mizellen vorwiegend homogen war, was eine Voraussetzung für z.B. Kristallisationsstudien ist. Alles in Allem konnte die Expression und Aufreinigung von FAX1 etabliert und ausreichend für nachfolgende Experimente optimiert werden.

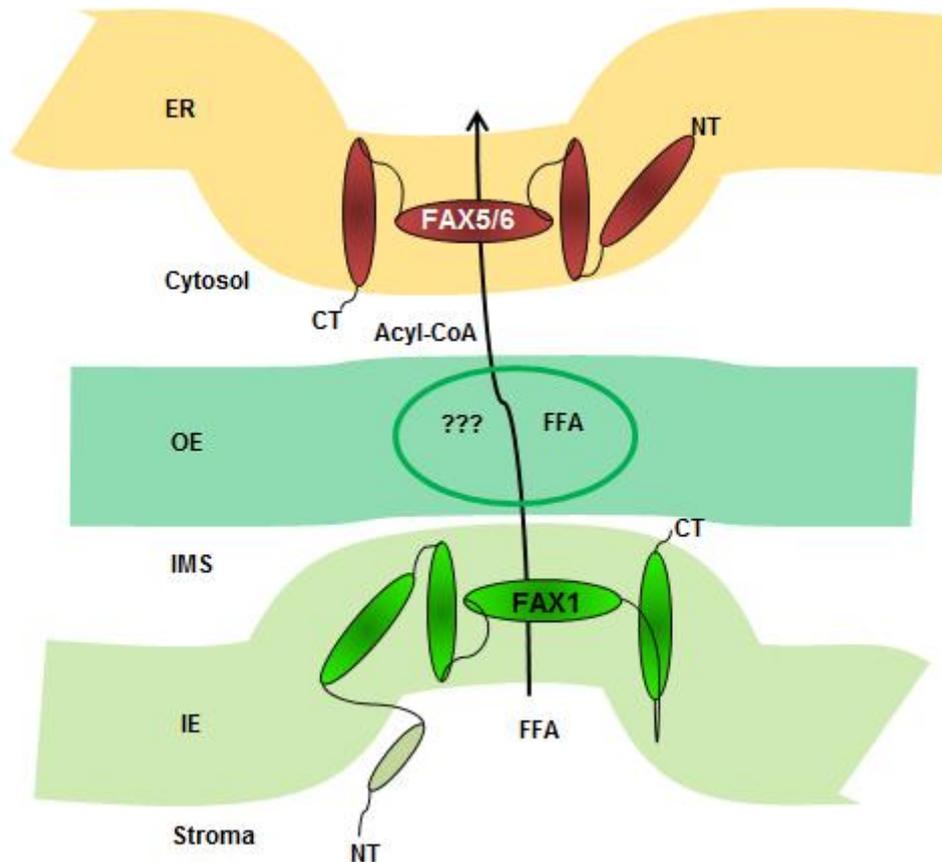
## 5.2 Hypothese zu Topologie und Funktion der FAX-Proteine

Vergleichende Sequenzanalysen im Rahmen dieser Arbeit konnten bestätigen, dass alle Mitglieder der FAX-Familie, wie bereits für FAX1 gezeigt werden konnte, eine konservierte Kernregion mit einer Tmemb\_14 Domäne aufweisen. Wie bereits beschrieben, beinhaltet diese Domäne vier  $\alpha$ -Helices und FAX-Proteine können so aufgrund von Ähnlichkeiten der Proteinsequenz zu der TMEM14 Familie zugeordnet werden, zu der auch die humanen mitochondrialen Membranproteine TMEM14A und TMEM14C gehören (Li *et al.*, 2015; Könnel *et al.*, 2019; Bugaeva *et al.*, 2021). FAX1 bis FAX4 weisen als plastidär lokalisierte FAX-Proteine einen verlängerten und variablen N-Terminus auf, während FAX5-FAX7 Proteine des sekretorischen Weges nur durch die Tmemb\_14 Domäne repräsentiert werden (Li *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Bugaeva *et al.*, 2021). Innerhalb der Tmemb\_14 Domäne zeigte sich bei Sequenzanalysen zwischen den *Arabidopsis*-Proteinen, dass At-FAX1 die meisten Ähnlichkeiten zu At-FAX2 und At-FAX5, At-FAX6 aufweisen, wohingegen die Tmemb\_14 Domänen von At-FAX3, At-FAX4 und At-FAX7 ähnlich sind. Eine detaillierte Diskussion der Proteine FAX2 und FAX3 ist Bugaeva *et al.* (2021) zu entnehmen. At-FAX5 und At-FAX6, in Ihrer Aminosäuresequenz über 80% identisch und beide im ER/sekretorischen Weg lokalisiert (zur Lokalisation siehe unten), stellen vermutlich Isoformen mit redundanten Funktionen dar und werden daher im Folgenden als FAX5/6 zusammengefasst. In FAX1 und

FAX5/6 konnten mittels Sequenzanalysen und Strukturmodellierung entsprechend der NMR-Strukturen für TMEM14A die erste  $\alpha$ -Helix und entsprechend TMEM14C die dritte  $\alpha$ -Helix als amphiphil beschrieben werden (Klammt *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015). Vorhersagen für die *Arabidopsis*-Proteine konnten ebenfalls den stärksten amphiphilen Charakter in FAX1 und FAX5/6 der dritten Helix zuordnen (Aramemnon, (Schwacke *et al.*, 2003). Sogenannte *Helical Wheel* Analysen im Rahmen dieser Arbeit bestätigten einen amphiphilen Charakter der Helix 1 und Helix 3 für FAX1 und FAX5/6 in verschiedenen Pflanzenspezies, wie Grünalgen, Moosen, Mono- und Dikotyledonen (Könnel *et al.*, 2019). Generell wird angenommen, dass FAX/TMEM14 Proteine mittels der Tmemb14\_Domäne in Membranen inserieren (Klammt *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015). Alle FAX Proteine wiesen innerhalb der Tmemb\_14 Domäne entweder mindestens eine amphiphile  $\alpha$ -Helix oder mindestens zwei  $\alpha$ -Helices mit hydrophobem Charakter auf (Bugaeva *et al.*, 2021). Es liegt also nahe, dass in diesen konservierten Domänen und Motiven die Funktion der FAX-Proteine begründet wird.

Allgemein ist bekannt, dass die Insertion amphiphiler  $\alpha$ -Helices in die hydrophobe Phase einer biologischen Membran durch biophysikalische Kräfte Membranbiegung auslösen kann (Peter *et al.*, 2004). So beinhalten amphiphile Membran-inserierende Motive eine hydrophile Seite, die einer hydrophoben gegenübersteht. Dies bedingt eine asymmetrische Integration und somit eine Krümmung oder gar Biegung der Membran (Madsen und Herlo, 2017). Abhängig von Art und Verteilung der Ladung entlang der Achse von amphiphilen  $\alpha$ -Helices, können vier Arten von  $\alpha$ -Helices postuliert werden. Allerdings beeinflusst die Stärke der Interaktion, ob  $\alpha$ -Helices Membranbiegung induzieren können oder bereits gekrümmte Membranen erkennen. Helices mit weniger positiven Ladungsresten erkennen Membrankrümmung eher, als sie zu verursachen, was als *curvature sensing* bezeichnet wird (Gkeka und Sarkisov 2010).

Auch innerhalb der Sequenzen von FAX1 und FAX5/6 konnten konservierte Sequenzmotive identifiziert werden, die verantwortlich für den amphiphilen Charakter der Helices sind und somit eine mögliche Funktion darin haben Membranen zu deformieren oder Membrankrümmungen zu erkennen. Gehäuft traten positiv geladenen Aminosäurereste (Lysin, Arginin) an den Enden der  $\alpha$ -Helices auf. Die identifizierten Eigenschaften und konservierten Motive innerhalb der ersten Helix waren interessanterweise für FAX1 und FAX5/6 nahezu identisch (Abb. 41). Während die geladenen und polaren Aminosäurereste innerhalb der Helix 1 gehäuft am N-Terminalen Ende der Helix zu finden waren, waren in Helix 3 hydrophile Reste gleichmäßig entlang der Helixachse verteilt. Es konnte also aufgrund der Ladungsverteilung (nach Gkeka und Sarkisov, 2010), geschlussfolgert werden, dass Helix 1 einer vertikal-gekippt inserierenden amphiphilen Helix entspricht und Helix 3 eine „klassische“ amphiphile Helix repräsentiert und parallel in die Membran inseriert. So entstand eine neue Hypothese zur Topologie von FAX1 und FAX5/6 (Abb. 41, Könnel *et al.*, 2019).



**Abb. 41: Schematische Darstellung des vorhergesagten Topologie- und Funktionsmodelles der Membranproteine FAX1 und FAX5/6.** Die Darstellung ist eine Zusammenfassung aus Erkenntnissen dieser Arbeit und der Literatur, angelehnt an das Modell für FAX1 und FAX5/6 aus Könnel *et al.* (2019). Innerhalb der konservierten Tmemb\_14 Domäne, die vier  $\alpha$ -Helices umfasst, sind Helix1 und Helix 3 der FAX-Proteine FAX1 und FAX5/6 amphiphil. Das Topologiemodell ergab sich entsprechend der Verteilung und Ladung konservierter Reste entlang der Helixachse nach Gkeka und Sarkisov (2010). Eine mögliche Biegung der IE und ER Membranen durch FAX1 bzw. FAX5/6 ist angedeutet. CT: C-Terminus. NT: N-Terminus. FFA: Free Fatty Acids/ Freie Fettsäuren. FAX1: *Fatty Acid Export 1*. IE: inner envelope/innere Hüllmembran. OE: outer envelope/ äußere Hüllmembran. IMS: inter membrane space / Intermembranraum. ER: Endoplasmatisches Retikulum. ??? : Transportmechanismen oder -wege und beteiligte Proteine unbekannt. Die Orientierung von FAX1 im IE wird durch Proteolyseexperimente an IE-Vesikeln bestätigt (Bugueva *et al.*, 2021).

Es konnte gezeigt werden, dass amphiphile  $\alpha$ -Helices im Hefeprotein Mic10, ähnlich Helix 1, die innere Membran von Mitochondrien durchspannen und das Protein durch Oligomerisierung an der Stabilisation von Membrankrümmungen beteiligt ist (Barbot *et al.*, 2015; Bohnert *et al.*, 2015). Für „klassische“ amphiphile Helices konnte beschrieben werden, dass die Integration eine starke, lokale Asymmetrie und somit eine kräftige Membrankrümmung auslösen kann. Dabei ist die ausgelöste Biegung auch abhängig von der Anzahl der integrierten Helices. Je mehr Insertionen in einem Membranabschnitt stattfinden, desto größer ist die Gesamtkrümmung der Membran (Kozlov *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu stellen Helix 2 und 4 der Proteine FAX1 und FAX5/6 klassische Transmembrandomänen dar (Abb. 41, Könnel *et al.*, 2019). Hinzukommend konnten innerhalb und nahe der dritten Helix von FAX1 und FAX5/6 mehrere „hydrophob-positive“ Motive (Könnel *et al.*, 2019), ähnlich zu dem charakteristischen Motiv in der *Lipid-Binding-*

*Site 1* (LBS1) in dem mitochondrialen Hefeprotein Mic60 beschrieben werden. Das Protein besitzt eine amphiphile  $\alpha$ -Helix, die LBS1 genannt wird und maßgeblich für die Membrankrümmende Funktion von Mic60 ist. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb der LBS1 ein positiv geladener Aminosäurerest (Arginin oder Lysin) gefolgt von einer Aminosäure mit hydrophober Seitenkette ausschlaggebend für den amphiphilen Charakter und der Fähigkeit von Mic60 zur Membranbiegung war (Hessenberger *et al.*, 2017). Mic60 Deletionsmutanten in Hefe zeigten ebenso wie Mutanten in denen dieses „positive-hydrophobe“ Motive inaktiviert wurde eine vergrößerte Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran und keine Einstülpungen in Form der *Cristae Junctions*, enge, halsartige Strukturen die die *Cristae* mit der inneren Grenzmembran verbinden. In FAX1 wurden die konservierten „hydrophob-positiven“ Motive durch die Sequenzabfolge „WR/K“ (vor Helix 3) und „WK/R“ (in Helix 3) und in FAX5/6 durch „RF/Y“ (hinter Helix 3) repräsentiert. Dies unterstützt wiederum die Hypothese einer möglichen Membran-biegenden Funktion der FAX-Proteine bedingt durch die amphiphile  $\alpha$ -Helix und die „hydrophob-positiven“ Motive.

Auffallend war weiterhin ein C-terminal konserviertes Motiv „PPPKKK“ innerhalb von FAX1 (Könnel *et al.*, 2019). Da Prolin (P) in Polypeptidketten aufgrund ihrer strukturellen Beschränkungen normalerweise Sekundärstrukturen brechen, könnten diese drei Reste am FAX1 C-Terminus bei der Positionierung der positiven Ladungen der Lysinreste (K) für Wechselwirkungen mit negativ-geladenen Kopfgruppen der IE oder OE Lipiddoppelschicht oder unbekanntem Proteininteraktionspartnern helfen. Die Akkumulierung positiver Reste erinnert an das „KRR“ Motiv im Übergang zwischen den beiden Transmembrandomänen in Mic10, einem weiteren Hefeprotein in der inneren Mitochondrienmembran (IM) (Barbot *et al.*, 2015). Mic10 stabilisiert als Oligomer die Membrankrümmung der *Cristae Junctions* und integriert Haarnadel-ähnlich mit seinen amphiphilen  $\alpha$ -Helices in die IM. Glycin-reiche Motive innerhalb dieser Membran-durchspannenden Helices ermöglichen die Bildung von Oligomeren und so einem Gerüst um die IM Einstülpungen und so die *Cristae Junctions* zu stabilisieren. In Mic10 Deletionsmutanten in Hefezellen konnte der Verlust von *Cristae Junctions*, sowie eine abnormale Struktur der *Cristae* beobachtet werden (Barbot *et al.*, 2015; Bohnert *et al.*, 2015). Mic10 Oligomere assoziieren mit anderen Proteinen des MICOS Komplexes und werden über Mic60 mit der äußeren Membran zu einer Membran-organisierenden und -stabilisierenden Struktur verbunden (Barbot und Meinecke 2016; Schorr und van der Laan 2018).

Weiterhin konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit innerhalb der FAX4 Sequenz zwischen erster und zweiter Helix ein stark konserviertes Motiv „KS/RTGKGS“ mit zwei positiv geladenen Aminosäureresten im Wechsel mit Glycin und einem polaren Rest identifiziert werden. Da nur At-FAX4 sehr wenige At-FAX4 ähnliche Sequenzen über Standard BLAST Analysen zugänglich wurden, wurde daher eine umfassende phylogenetische Analyse durchgeführt (A. Banguela, K. Philippar, unveröffentlicht), die in der vorliegenden Arbeit genutzt werden konnte, um konservierte FAX4 Motive zu definieren. Für FAX7 ergaben sich ähnliche konservierte, positive Motive in Form von „KR/SG“ und „KSL/KIS. Wie bereits beschrieben sind  $\alpha$ -Helices mit geladenen, polaren Motiven in der Lage

Membrankrümmungen zu erkennen (Bigay *et al.*, 2005; Drin *et al.*, 2007; Bigay and Antony 2012). Beispielsweise sind in GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs)  $\alpha$ -Helices mit einer schwach geladenen, polaren Seite (mehrheitlich bestehend aus Serin und Threonin), die als *lipid packing sensor* (ALPS) bezeichnet wird, für die Erkennung von gekrümmten Membranen zuständig (Drin *et al.*, 2007). In FAX4 konnte nahe der dritten Helix, wie bereits für FAX1 und FAX5/6 ein „positiv-hydrophobes“, konserviertes Motiv mit der Sequenzabfolge „RL“ beschrieben werden. Was auch hier wiederum in der Helix mit dem stärksten amphiphilen Charakter (Schwacke *et al.*, 2003, Aramemnon) essentiell für die die Membran-biegende Funktion analog zu Mic60 sein könnte (Hessenberger *et al.*, 2017). Wie auch bei Mic10 (Barbot *et al.*, 2015; Bohnert *et al.*, 2015), konnte bei FAX4 und FAX7 am Übergang zu Helix 4 eine konservierte Akkumulation positiver Reste identifiziert werden. Die N- und C-Termini des Proteins FAX4 waren in Länge und Sequenz stark variabel und wenig konserviert. Vermutlich liegt die Funktion des Proteins deshalb nicht in den terminalen Bereichen begründet.

Zusammenfassend konnten anhand der Sequenzanalysen – vor allem für FAX1 und FAX5/6 – in FAX-Proteinen bereits bekannte Motive wie amphiphile  $\alpha$ -Helices und konservierte Ladungsverteilungen identifiziert werden. Die amphiphilen  $\alpha$ -Helices, sowie die asymmetrische Verteilung konservierter und geladener Aminosäurereste, könnte dazu führen, dass FAX-Proteine gekrümmte Membranen erkennen und interagieren oder selbst eine Membran-biegende oder -deformierende Funktion besitzen (Abb. 41). Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass FAX1 Überexpressionslinien in *Arabidopsis* eine enorme Oberflächenvergrößerung der IE in Chloroplasten zeigen. Jedoch waren diese nicht wie üblicherweise bei der Überexpression von IE lokalisierten Proteinen glatt, flach und parallel zu OE angeordnet (Breuers *et al.*, 2011), sondern tubulär und Waben-ähnlich (Könnel *et al.*, 2019). Auch die Überexpression von Membranbiegenden-Proteinen Mic10, Mic60 und CURT1 (*Curvature in Thylakoids 1*), zeigte vermehrt tubuläre Strukturen der inneren Mitochondrienmembranen bzw. mehr Grana-Stapel in Thylakoiden (Rabl *et al.*, 2009; Bohnert *et al.*, 2015, Pribil *et al.*, 2014). Anhand der Ladungsverteilung der Aminosäurereste und Motivkonservierung aber auch durch phylogenetische Studien (A. Banguela, K. Philippar, unveröffentlicht) lassen sich innerhalb der FAX Familie zwei Gruppen bilden: FAX1 und FAX5/6 sowie FAX3 und FAX7. Auffällig ist hierbei, dass sich in jeder Gruppe jeweils ein plastidäres FAX-Protein und mind. ein FAX-Protein aus dem ER/sekretorischem Weg befinden. Die FAX-Proteine innerhalb dieser Gruppeneinteilung konnten phylogenetisch bis zu der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der amphiphile Charakter der Proteine FAX3 und FAX7 im Vergleich zu FAX1 und FAX5/6 schwächer ist (Li *et al.*, 2015; Könnel *et al.*, 2019, Bugaeva *et al.*, 2021), weshalb FAX3 und FAX7 möglicherweise Membranen nicht biegen, aber Membrankrümmungen erkennen und stabilisieren könnten. FAX2 Proteine im IE von Plastiden scheinen spezifisch für Samenpflanzen zu sein und dort eine zusätzliche Funktion bei der Ölsynthese einzunehmen (Li *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Bugaeva *et al.*, 2021). Ein möglicher Zusammenhang von FAX2 und FAX4 während der Lipidsynthese im

Samen konnte bereits untersucht werden (Li *et al.*, 2020). Da FAX4 weiterhin durch phylogenetische Analysen nur in wenigen Pflanzen zu identifizieren war, liegt es nahe, dass FAX4 vermutlich eine ergänzende Funktion zu FAX2, oder auch FAX1 im Fettsäuretransport über die IE von Chloroplasten einnehmen könnte. Aufgrund des schwächeren amphiphilen Charakters von FAX4 könnte ebenso wie für FAX3 und FAX7 eine Fähigkeit zur Erkennung von Membranbiegungen und deren Stabilisierung vorliegen.

Neben dem gerichteten Transport über Membrantransporter wie beispielsweise ABC-Transporter der TGD Familie (Hurlock *et al.*, 2014), wird diskutiert, ob ein Fettsäure- und Lipid-Transfer nicht auch über Membrankontaktstellen (*membrane contact sites*) stattfinden kann. Hierzu müssen die Membranen in enger Distanz, z.B. vermittelt durch Membranbiegung, eine Plattform bilden, um einen Transfer lipophiler Moleküle zu ermöglichen (Michaud und Jouhet, 2019). Beispielsweise könnten FAX-Proteine bei der Bildung oder Stabilisierung solcher Membrankontaktstellen helfen, und so den Fettsäure- und Lipidtransport zwischen Organellen und Membransystemen ermöglichen und eine ähnliche Rolle wie das *Arabidopsis* Protein Mic60 im MTL-Komplex einnehmen (Michaud *et al.*, 2016 und 2017). So könnte durch induzierte Membrankrümmung FAX1 den Membrankontakt zwischen IE und OE der Chloroplasten ermöglichen und FAX5/6 an der Bildung von Chloroplast (OE) - ER Kontaktstellen beteiligt sein (Abb. 41; Könnel *et al.*, 2019).

### 5.3 FAX-Proteine ermöglichen den Transport von Fettsäuren

Mit Hilfe eines Komplementationsassays in Hefe analog zu Li *et al.*, 2015 wurden Funktionsanalysen für die FAX-Proteine FAX1-FAX4, FAX6 und FAX7 durchgeführt. Zum einen konnten die bereits gezeigten Ergebnisse von Li *et al.* (2015) für FAX1 reproduziert und somit bestätigt werden. Zum anderen konnte so für FAX2-4 und FAX6 ebenso eine Rolle im Fettsäuretransport gezeigt werden. Der Eisentransporter PIC1 diente in diesem Versuch als Kontrollprotein, da er durch vier  $\alpha$ -Helices und der Lokalisation in der inneren Hüllmembran (IE) von Chloroplasten eine strukturelle Ähnlichkeit zu den FAX-Proteinen besitzt (Duy *et al.*, 2007). PIC1 konnte auch in dieser Arbeit keine Rolle im Fettsäuretransport zugeordnet werden, weshalb er als geeignete Negativkontrolle betrachtet wurde. Somit konnte die Spezifität des Assays gegenüber Fettsäuretransportern bestätigt werden.

Fettsäureimport über die Hefeplasma-membran wird durch einen Multienzymkomplex aus Fat1p, einem FA-Transporter, und Faa1/4p, FA-Aktivierungsenzymen vermittelt (Black und DiRusso, 2003). In der Literatur konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Linolensäure in hohen Mengen (> 3,6 mM) für wildtypische Hefen toxisch ist, für Hefen mit deletiertem Fat1p oder Faa1p/Faa4p allerdings nicht, da hier ohne den funktionellen Importkomplex keine Aufnahme von  $\alpha$ -Linolensäure stattfinden kann (von Berlepsch *et al.*, 2012). Folglich sterben Hefezellen ab, die  $\alpha$ -Linolensäure aufnehmen. Analog zu Li *et al.* (2015) wurde in der vorliegenden Arbeit ein Drop-Dilution-Test durchgeführt. Der Assay basiert auf der Verwendung von  $\Delta fat1$  und  $\Delta faa1/4$  Hefe-Deletionsstämmen, die jeweils mit einem FAX-Protein komplementiert wurden. Durch Absterben der Hefezellen konnte so bestätigt

werden, dass FAX-Proteine die Hefemutanten im Importkomplex komplementieren und am Fettsäuretransport beteiligt sind. FAX1 konnte den Deletionsstamm  $\Delta fat1$  Hefezellen komplementieren, nicht aber  $\Delta faa1/4$ . Es wurde geschlussfolgert, dass FAX1 am Transport und nicht an der Aktivierung von FAs beteiligt ist (Li *et al.*, 2015). In dieser Arbeit konnte eine Komplementation des Deletionsstammes  $\Delta fat1$  auch durch FAX2, FAX3, FAX4, und FAX6 beobachtet werden. Die Hefezellen starben durch Aufnahme von  $\alpha$ -Linolensäure ab. Auch hier konnten die untersuchten FAX-Proteine  $\Delta faa1/4$  nicht komplementieren, weshalb die Zellen auch unter Zugabe von  $\alpha$ -Linolensäure wuchsen. Fat1p stellt, ähnlich wie FAX-Proteine, keinen klassischen Transporter dar und interagiert vermutlich über zytosolische Domänen mit Faa1p und Faa4p. Für den fortlaufenden Import von Fettsäuren ist die Aktivierung zu Acyl-CoA durch Faa1p oder Faa4p nötig. Der Fettsäure-Import in *S. cerevisiae* unterliegt folglich dem Prinzip der vektoriellen Acylierung (Claus *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2016; Black und DiRusso, 2007; Zou *et al.*, 2003). Aufgrund der funktionellen Komplementation von  $\Delta fat1$  durch die FAX-Proteine, könnte also auch die vektorielle Acylierung als Triebkraft des Fettsäure-Transportes aus dem Chloroplasten zu Grunde liegen. Da FAX-Proteinen bislang keine enzymatische Aktivität nachgewiesen wurde, liegt es nahe, dass sie die Acyl-CoA-Synthetasen Faa1p und Faa4p in Hefe nicht komplementieren können. Allerdings müssen, um einen Fettsäure-Import in Hefe zu ermöglichen FAX-Proteine mit Faa-Enzymen interagieren können. Dies könnte bei FAX-Proteinen entweder über die verlängerten und variablen Termini oder mittels einer konservierten amphiphilen  $\alpha$ -Helix, und/oder konservierten Motiven stattfinden (Li *et al.*, 2015, Könnel *et al.*, 2019, Bugaeva *et al.*, 2021). Tian *et al.*, (2019) konnten bereits mittels eines *Split Ubiquitin*-basierenden *Yeast Two-Hybrid* Systemes von Hefemembranen die Interaktion der Acyl-CoA-Synthetase LACS9 aus *Arabidopsis* und dem FAX-Protein FAX2 nachweisen und somit erneut die These der vektoriellen Acylierung als Triebkraft zum Fettsäureexport aus den Chloroplasten stützen.

Auffällig bei den Wachstumsverläufen der Hefelinien war, dass zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase die  $\Delta fat1$  Hefemutanten, welche mit FAX1-4 oder FAX6 transformiert wurden, deutlich besser wuchsen als die genutzten Kontrollen (leerer Vektor und PIC1). Möglicherweise konnten die mit FAX-Proteinen komplementierten Hefen schneller FAs aus dem Medium aufnehmen und wachsen. Somit ist auszuschließen, dass das ausbleibende Wachstum im Drop-Dilution-Assay durch generell reduziertes Wachstum der  $\Delta fat1$  Hefen zurückzuführen ist. Gegenläufig dazu zeigten die  $\Delta faa1/4$  Hefezellen mit den transformierten FAX-Proteinen kein besseres Wachstum. Da importierte FAs nicht über Faa1p und Faa4p aktiviert werden konnten, verlangsamte sich möglicherweise der Prozess der vektoriellen Acylierung und somit die Kapazität zum Fettsäure-Import und die Funktion davon abhängiger Stoffwechselwege. Dies lässt wiederum vermuten, dass FAX Proteine weniger an der Aktivierung von Fettsäuren, als am Transport beteiligt sind. Alle Hefen wuchsen letztlich im typischen sigmoiden Wachstumsverlauf, weshalb von einer generellen Beeinträchtigung durch den Expressionsvektor abzusehen ist. Das Protein FAX7 allerdings konnte keinen der Hefedeletionsstämme,  $\Delta fat1$  und  $\Delta faa1/4$ , komplementieren. Die mit FAX7 transformierten Hefen wuchsen auf den  $\alpha$ -Linolensäure Platten genauso gut, wie auf den Kontrollplatten.

Generell wuchsen Hefen mit FAX7 in Flüssigkulturen allerdings schlechter. Die Rolle von FAX7 im Fettsäure-Transport ist daher noch ungeklärt. Möglicherweise integriert FAX7 nicht, wie Fat1p, in die Plasmamembran der Hefe (DiRusso *et al.*, 2008), sondern in andere zelluläre Membranen, was durchaus einen Defekt im Wachstum erklären könnte. Subzelluläre Lokalisationstudien in dieser Arbeit konnten die Lokalisation des Proteins FAX7 in Pflanzen nicht klar eingrenzen, jedoch konnte partiell eine Integration in ER-Membranen gezeigt werden. Weshalb auch in Hefe eine Integration in Membranen des ERs denkbar wäre. Da die chloroplastidären maturen FAX-Proteine FAX1 bis FAX4 einen Fettsäuretransport ermöglichen, integrieren sie vermutlich in die Plasmamembran der Hefe. Die Proteine FAX5 und FAX6 lokalisieren in Pflanzen im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und in frühen Endosomen (EE, *early Endosomes*) und gelangen so vermutlich über den sekretorischen Weg auch innerhalb der Hefezellen zur Plasmamembran (zur Lokalisation siehe unten), wo sie wahrscheinlich integrieren und am Transport von Fettsäuren beteiligt sind. Da bezüglich des Proteins FAX7 die Replikat des Experimentes fehlen, ist die Aussagekraft nicht eindeutig und sollte wiederholt werden. Außerdem sollte zukünftig auch FAX5 als funktioneller Fettsäure-Transporter analog überprüft werden.

Aufgrund der Funktionalität des Assays kann schlussgefolgert werden, dass die Proteine FAX1-4 und FAX6 in die Plasmamembran der Hefen integrieren. Allerdings sollte die Integration der in die Hefepasmamembran letztlich noch nachgewiesen werden. Dies könnte über Isolation und Aufreinigung der Plasmamembranen von transformierten Hefen und anschließender Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern der FAX-Proteine erfolgen. Auch ein FA-Importassay mit einer fluoreszierenden langkettigen Fettsäure, wie C1-BODIPY-C12, analog zu Zou *et al.* (2003) und anschließender Signaldetektion wäre möglich, um den Import der FAs über die FAX-Proteine zu überprüfen.

Weiterhin sollten in dieser Arbeit wildtypische Kontrollen etabliert werden. Zum einen sollte analog zu von Berlepsch *et al.* (2012) der wildtypische Hefestamm, zum anderen der mittels FAT1 komplementierte  $\Delta fat1$  Deletionsstamm vergleichend zur  $\Delta fat1$  Hefe untersucht werden. Anders als in der Literatur zeigte sich der Wildtyp in dieser Arbeit nicht sensitiv gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure, obwohl sowohl Fat1p und Faa1p/Faa4p und somit ein funktioneller Importkomplex für FAs vorliegen sollte (Berlepsch *et al.*, 2012). Ebenso verhielt sich der mittels FAT1 komplementierte  $\Delta fat1$  Stamm. Diese Resultate sollten in Zukunft durch weitere Analysen untersucht und bestätigt werden. Der Versuchsansatz unterschied sich in dieser Arbeit vergleichend zu Berlepsch *et al.* (2012) hinsichtlich des verwendeten Hefeexpressionsvektors. In dieser Arbeit wurde der Hefeexpressionsvektor pDR195 mit dem Promotor pPMA1 verwendet, Berlepsch *et al.* (2012) verwendeten den Hefektor pDR-GW-eGFP von Loqué *et al.* (2007), der allerdings ebenfalls auf einem pDR195 Vektorrückgrat basiert. Somit sollten mögliche Unterschiede in der Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure ausgeschlossen sein, die von der Menge an exprimiertem Protein abhängen. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass sich FAX-Proteine in ihrer FA-Transporteffizienz und Spezifität für  $\alpha$ -Linolensäure zu Fat1p unterscheiden, und so mit FAX-Proteinen transformierte Hefen sensitiver und möglicherweise schneller auf die Anwesenheit von  $\alpha$ -

Linolensäure reagieren. Dies unterstützend, konnte gezeigt werden, dass durch Transformation des wildtypischen Stammes mit einem Fettsäuretransporter aus *Synechocystis* die Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Linolensäure nochmals gesteigert werden konnte (Berlepsch *et al.*, 2012).

Alternativ könnte die Beteiligung am Fettsäure-Transport von FAX-Proteinen auch mittels eines positiven Wachstumsassays (Zou *et al.*, 2003), wie bereits für FAX1 durchgeführt (Li *et al.*, 2015), nachgewiesen werden. Die Hefe-eigene Fettsäure-Synthese wird mittels Cerulenin inhibiert und das Medium mit Fettsäuren supplementiert. Hefezellen, die ein funktionelles FA-Importsystem besitzen, können wachsen. Das ausbleibende Wachstum und somit der Import von Fettsäuren konnte für  $\Delta fat1$  und  $\Delta faa1/4$  Deletionsstämme mittels Einbringens der jeweiligen Proteine wiederhergestellt werden (Zou *et al.*, 2003). Auch FAX1 konnte so  $\Delta fat1$  positiv Hefen komplementieren. Weiterhin könnte in diesem Assay, wie bereits für FAX1, die Substratspezifität der FAX-Proteine untersucht werden. Für FAX1 konnte eine höhere Spezifität für Palmitinsäure (C16) als für Olein- (C18:1) und Stearinsäure (C18:0) gezeigt werden. Die Spezifität für  $\alpha$ -Linolensäure, welche in Pflanzen nicht aus den Plastiden exportiert wird, war vergleichbar mit Olein- und Stearinsäure (Li *et al.*, 2015).

#### 5.4 Die physiologische Rolle der FAX-Proteine in Pflanzen

Innerhalb der Proteine der FAX-Familie konnte dem Protein FAX1, lokalisiert im IE der Chloroplasten, bereits eine Bedeutung in Prozessen, wie Biomassenproduktion, Bildung der Pollenzellwand, Pollenkeimung und TAG-Bildung in Samen zugeordnet werden (Li *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020; Bugaeva *et al.*, 2021). Um nun auch die Proteine der FAX-Familie FAX4, FAX5, FAX6 und FAX7 funktionell und bezüglich ihrer Rolle im Fettsäure-/Lipidhaushalt der Pflanze zu charakterisieren, erfolgten in dieser Arbeit vergleichende Lokalisationsstudien der Proteine, sowie phänotypische Analysen, Segregations- und Expressionsanalysen von FAX-Mutanten in *Arabidopsis*. Die Proteine FAX2 und FAX3 wurden im Rahmen der Experimente zur Dissertation von Wassilina Bugaeva (AG Philippar, UdS, Saarbrücken) behandelt und zur Publikation eingereicht (Bugaeva *et al.*, 2021). Zur Funktion von FAX2 und auch von FAX4 erschienen weiterhin folgende Publikationen: Tian *et al.* (2019) und Li *et al.* (2020).

Um die Lokalisation der Proteine FAX4-FAX7 zu adressieren wurden zusätzlich zu *GFP-Targeting* Experimenten in Pflanzen auch *in vitro* Imports in Mitochondrien und Mikrosomen von Hefezellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich aber, dass FAX5-FAX7 bereits vor dem Import, vermutlich aufgrund der Hydrophobizität ihrer Tmemb<sub>14</sub> Domäne, Aggregate bildeten. FAX4 hingegen aggregierte, vermutlich aufgrund seiner verlängerten, nicht-hydrophoben N- und C- Termini, die ein Gleichgewicht zu den hydrophoben Bereichen darstellten, nicht. Bezüglich FAX4 konnte in Hefe weder ein Import in Mitochondrien, noch in Mikrosomen beobachtet werden.

## Das Protein FAX4

Kürzlich konnte FAX4 von Li *et al.* (2020) mittels *GFP-Targeting* in den Hüllmembranen von *Arabidopsis* Chloroplasten lokalisiert werden, was durch stabil transformierte *Arabidopsis*pflanzen (Janick Peter, AG Philippar, Uds, Saarbrücken) bestätigt werden konnte. Hierfür spricht auch die für FAX4 vorhergesagte chloroplastidäre Lokalisation nach *Aramemnon* (AramLocCon; Schwacke *et al.*, 2003) und die Transitpeptid-Vorhersage nach ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999). Innerhalb dieser Arbeit konnten mittels *GFP-Targeting* von FAX4 in Tabakepidermiszellen zwar ringförmige GFP-Signale, ähnlich zu FAX1 (Li *et al.*, 2015) detektiert werden, jedoch kolokalisierten diese nicht deutlich mit den Chloroplasten. Da das Protein FAX4 nicht im Tabakgenom codiert ist, könnte das *Proteintargeting* und somit die subzelluläre Lokalisation in Tabak für FAX4 nicht funktioniert haben. Um die Bedeutung von FAX4 während der pflanzlichen Entwicklung zu untersuchen wurden RNAi und T-DNA-Linien charakterisiert und phänotypisiert. Alle FAX4-RNAi-Linien wiesen einen reduzierten Transkriptgehalt von FAX4 auf. In Pflanzen wird RNA Interferenz (RNAi) als Verteidigungsmechanismus gegen Viren, aber auch regulatorischer Prozesse endogener Gene angesehen. Das Schlüsselprinzip von RNAi ist die Produktion einer Doppelstrang-RNA (dsRNA), die homolog zum Zielgen ist und mittels des Enzym Dicer zu siRNAs (small interfering RNAs) abgebaut wird. Diese siRNAs binden an den Endonuklease-enthaltenden, RNA-induzierten *Silencing*-Komplex (RISC), welcher dann aufgrund der Homologie die Ziel-RNA abbaut (Matthew, 2004). Innerhalb der FAX4-RNAi Linien, sowie in den untersuchten Geweben unterschied sich der RNAi bedingte Effekt auf den FAX4 Transkriptgehalt. Da die Insertion des RNAi-Konstrukts in das Genom von *Arabidopsis* ungerichtet stattfindet, ist der Integrationslokus in jeder Linie unterschiedlich. Ausgehend davon kann die Expression des RNAi-Konstruktes von regulatorischen Elementen lokusbedingt, und somit die Reduktion im Transkriptgehalt von FAX4, variabel sein. Außerdem kann diese Regulation in verschiedenen Geweben variieren. Dass gerade in Blüten ein weniger starker RNAi-Effekt beobachtet werden konnte, kann im verwendeten 35S Promotor begründet liegen. Hier wurde gezeigt, dass dieser in Antherengewebe und Pollen keine oder eine reduzierte Aktivität aufweist (Wilkinson *et al.*, 1997). Somit wird das RNAi-Konstrukt in Teilen der Blüte vermindert oder nicht exprimiert. Der beobachtete Phänotyp der FAX4-RNAi Linien war in allen untersuchten Linien unterschiedlich ausgeprägt und korrelierte nicht immer mit der ermittelten Menge an FAX4 Transkript. Weiterhin konnte die in dieser Arbeit als *fax4-3 Knockout*-Mutante charakterisierte und phänotypisierte T-DNA-Insertionslinie GK-930E07 den Phänotyp in den FAX4-RNAi Pflanzen nicht bestätigen. Die *fax4-3* Mutanten zeigten unter keinen der untersuchten Bedingungen einen phänotypischen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp. Dies lässt darauf schließen, dass der beobachtete Phänotyp innerhalb der FAX4-RNAi Linien, nicht im *Knockdown* von FAX4 begründet liegt, sondern wahrscheinlich auf einen unspezifischen Nebeneffekt zurückzuführen ist. Es konnte gezeigt werden, dass während der Verwendung von RNAi-Konstrukten unspezifische Effekte auftreten können, die oft als *Off-Target-Gen-Silencing* bezeichnet werden. Dieses unbeabsichtigte *Gen-Silencing* kann zu falschen Schlussfolgerungen in RNAi-Experimenten führen, die darauf abzielen, die

funktionelle Rolle eines bestimmten Zielgens in Pflanzen zu untersuchen (Senthil-Kumar und Mysore, 2011).

Obwohl *fax4-3* Mutanten innerhalb dieser Arbeit keinen auffälligen Phänotyp zeigten, zeigten Li *et al.* (2020), dass FAX4 und FAX2 spezifische FA Transporter innerhalb der TAG Biosynthese im Samen darstellen. Zum einen waren FAX2 und FAX4 während der Embryonalentwicklung im Samen, gerade in der Saatfüllphase (*seed-filling stage*), spezifisch exprimiert. In diesem Stadium werden TAGs schnell synthetisiert. Zum anderen wiesen sowohl *fax2* und *fax4* Einzelmutanten, als auch *fax2/4* Doppelmutanten einen Phänotyp im Samen auf (Li *et al.*, 2020). Diese Daten sind allerdings insbesondere bezüglich eines *Knockouts* von FAX2 und FAX4 in Frage zu stellen: (i) Bei beiden verwendeten Linien SALK\_135883 und SAIL\_671\_D03 inseriert die T-DNA jeweils im 5'UTR von FAX2 und FAX4. Ein *Knockout* beider Gene wurde von Li *et al.* (2020) allerdings nur auf RNA-Ebene über eine semi-quantitative RT-PCR gezeigt. (ii) Die in Li *et al.* (2020) als *fax2 Knockout*-Mutante verwendete T-DNA-Linie SALK\_135883 konnte von Tian *et al.* (2019) mittels qRT-PCR nicht als *Knockout* verifiziert werden. Die T-DNA Insertion im 5'UTR von FAX2 führte lediglich zu einer Reduktion des Transskriptgehaltes. (iii) Hinzu kommt, dass von den drei, in der vorliegenden Arbeit untersuchten, T-DNA-Linien bezüglich der Insertion in FAX4, nur die Linie *fax4-3* (GK-930E07) mit einer Insertion im ersten Exon von FAX4 als *Knockout* bestätigt werden konnte. Bei den beiden anderen T-DNA-Linien (*fax4-1*: SAIL\_788\_B10 und *fax4-2*: SAIL\_1176\_C06) handelte es sich, wie in der von Li *et al.* (2020) verwendeten Linie SAIL\_671\_D03 um eine Insertion im 5'-UTR-Bereich des FAX4 Genes. In beiden Fällen konnte für *fax4-1* und *fax4-2* kein transkriptioneller *Knockout* von FAX4 nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass eine Insertion im 5'-UTR Bereich keinen entscheidenden Einfluss auf die Reduktion der FAX2 und FAX4 Transkripte hat. Somit könnte es sein, dass die von Li *et al.* (2020) publizierten Daten nicht auf einem tatsächlichen *Knockout* der Proteine beruhen und die funktionellen Rückschlüsse für die Rolle von FAX2 und FAX4 in Frage stellen. Des Weiteren ist nicht geklärt, ob FAX4 in der IE von Plastiden lokalisiert ist und warum dieses Protein evolutionär nicht konserviert ist.

Aufgrund der vorliegenden Expressionsdaten (*Arabidopsis* eFP Browser, Winter *et al.*, 2007), in denen FAX4 während der Embryonalentwicklung und im Samen stark exprimiert wird, und der Hochregulierung von FAX4 Transkripten in *fax2 Knockout*pflanzen (Bugaeva *et al.*, 2021) kann ein möglicher funktioneller Zusammenhang von FAX2 und FAX4 allerdings nicht ausgeschlossen werden. Tian *et al.*, (2019), konnten At-FAX2 eine Rolle im Fettsäureexport aus Chloroplasten in Samen zuordnen und phylogenetische Analysen lassen FAX2 evolutiv als Samenpflanzenspezifisch vermuten (A. Banguela, K. Philippar, unveröffentlicht; Bugaeva *et al.*, 2021). Es könnte also sein, dass vor allem in Samen FAX2 und FAX4 im Fettsäure-Export aus den Chloroplasten wichtig sind und in einigen Pflanzenspezies zusammen oder komplementär agieren. Ein Import der Fettsäuren ins ER im Samen könnte dann über den ABC-Transporter ABCA9 erfolgen (Theodoulou *et al.*, 2015; Hwang *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013).

## Das Protein FAX7

Das Protein FAX7 ist in Membranen des sekretorischen Syntheseweges vorhergesagt, wobei für FAX7 auch eine mitochondrielle Lokalisation möglich ist (Aramemnon, Schwacke *et al.*, 2003). Brugière *et al.* (2004) und Duncan *et al.* (2011) konnten FAX7 im Proteom der äußeren Membranen von Mitochondrien in *Arabidopsis* detektieren, jedoch konnte Duncan *et al.* (2011) in der gleichen Publikation mittels *GFP-Targeting* in *Arabidopsis*-Zellkulturen eine generelle Lokalisation von FAX7 in Mitochondrien ausschließen. Mittels *GFP-Targeting* in Tabak und in stabil transformierten *Arabidopsis* Pflanzen, konnte, in Zusammenarbeit mit Dr. Melanie Krebs und Dr. Upendo Lupanga, Universität Heidelberg, auch in der vorliegenden Arbeit keine Kolo­kalisierung des Proteins FAX7, vergleichend mit den beiden Mitochondrienmarkern OM64 (Schweiger *et al.*, 2012) und MitoBlue (Sánchez *et al.*, 2014) gezeigt werden. Sowohl in Tabakepidermiszellen, als auch in stabil transformierten *Arabidopsis* Pflanzen konnte für FAX7 mittels *GFP-Targeting* eine mögliche Lokalisation im ER, vergleichend zu den Markerproteinen TPR7 (Schweiger *et al.*, 2012) und VMA12 (Jackson und Stevensen 1997) gezeigt werden. In stabil transformierten *Arabidopsis* Pflanzen kolo­kalisierte FAX7, sowohl mit N- als auch mit C- terminalem GFP, partiell mit dem ER-Marker VMA12. Außerdem konnte eine partielle Kolo­kalisierung mit der V-ATPase Untereinheit VHA-a1, die im TGN und frühen Endosomen lokalisiert (Lupanga *et al.*, 2020) ist, gezeigt werden. Da FAX7 nicht mit dem Endozytosemarker FM4-64 (van Gisbergen, 2008) kolo­kalisierte und nicht sensitiv gegenüber Brefeldin A war, konnte eine mögliche Lokalisation im TGN und frühen Endosomen nicht bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte die Lokalisation von FAX7 entlang des sekretorischen Weges also nicht klar eingegrenzt werden, allerdings lokalisierte FAX7 in definierten punktförmigen oder vesikelartigen Strukturen, die partiell mit ER Markern kolo­kalisieren. Für das Protein UBXD8, welches zu einer Unterfamilie von *Hairpin*-Proteinen zählt, die in Membranen des ER und in LDs (*Lipid Droplets*, Lipidtröpfchen) lokalisieren, konnten direkt nach der Proteinsynthese ähnliche punktförmige Fluoreszenzsignale detektiert werden (Schrul und Kopito, 2016). Diese Signale kolo­kalisieren ebenso nur partiell mit den ER-Markern Calreticulin und Calnexin und nicht mit LDs. Es konnte gezeigt werden, dass UBXD8 in definierte ER-Subdomänen integriert und möglicherweise von hier aus im ER und dann in LDs verteilt wird. Es ist also nicht auszuschließen, dass auch FAX7 in bestimmten Subdomänen des ERs lokalisiert ist und ausgehend von hier in die einschichtige Phospholipidhülle der LDs integriert wird. Analog zu Schrul und Kopito (2016) könnten Insertionsanalysen in Mikrosomen oder Liposomen, sowie Ko-lokalisations- und Interaktionsexperimente mit LDs Aufschluss über eine mögliche Funktion von FAX7 geben. Ebenfalls ähnlich zu den GFP-Signalen von FAX7, erscheinen Peroxisomen oder peroxisomale Proteine im *GFP-Targeting* in *Arabidopsis* als punktförmige Strukturen (Mano *et al.*, 2002), weshalb eine Lokalisation von FAX7 in Peroxisomen ergänzend z.B. mittels *GFP-Targeting* untersucht werden sollte.

Phänotypische Analysen der *fax7-2 Knockout*-Mutante wiesen im Wesentlichen keine Besonderheiten auf. Eventuell wird die Funktion von FAX7 durch andere Proteine im sekretorischen Weg ersetzt. Hier könnte die Charakterisierung der in dieser Arbeit erstellten *fax5/fax7* und *fax6/fax7* Doppelmutanten mögliche Rückschlüsse auf die Funktion von FAX7 im pflanzlichen System erlauben. Eine weitere Möglichkeit wäre eine *fax3/fax7* Doppelmutante, da FAX3 und FAX7 phylogenetisch einer Gruppe zuzuordnen waren. Zusammenfassend kann darauf geschlossen werden, dass FAX7 als Protein, im Vergleich zu FAX1, nicht direkt am Fettsäuretransport beteiligt ist, sondern eher eine akzessorische Rolle einnimmt und beim Transport der Fettsäuren oder Lipide über die ER-Membran helfen könnte. Oder in Bezug auf das Membrankrümmende-Modell der FAX-Proteine, durch andere FAX-Proteine induzierte Membranbiegungen erkennt und interagiert.

### Die Proteine FAX5 und FAX6

Die Proteine FAX5 und FAX6 stellen in *Arabidopsis* vermutlich Isoformen mit komplementären Funktionen dar. In Tabak (*GFP-Targeting*) waren beide Proteine im ER lokalisiert. Eine Lokalisation in Mitochondrien konnte wie für FAX7 ausgeschlossen werden. In stabil transformierten *Arabidopsis*-Linien zeigte sich im *GFP-Targeting* eine veränderte Lokalisation abhängig vom Ort des GFP-Konstrukts. So kolokalisierten N-terminale GFP-FAX5/6 Konstrukte mit dem ER Marker VMA12 (Jackson und Stevensen 1997), C-terminale FAX5/6-GFP Konstrukte allerdings nicht. Das Protein GFP könnte hier aufgrund seiner Größe beim *Targeting* innerhalb der Zellen einen Einfluss haben oder ein *Targeting*-Signal maskieren und für einen Verbleib der Proteine im ER führen. Für FAX5 und FAX6 mit C-terminalen GFP konnte in dieser Arbeit eine Kolokalisation mit VHA-a1 (Lupanga *et al.*, 2020), einer V-ATPase Untereinheit, die im TGN/EE lokalisiert, gezeigt werden. Des Weiteren kolokalisierten FAX5/6 mit dem Endozytosemarker FM4-64 (van Gisbergen, 2008) und zeigten eine Sensitivität gegenüber dem Endozytose-Inhibitor Brefeldin A (BFA). Brefeldin A wird in Analysen zum Vesikeltransport verwendet und induziert die Bildung von BFA-Kompartimenten oder BFA-Körpern, die aus Anhäufungen von Golgi-Körpern und/oder Trans-Golgi-Netzwerken (TGN) oder deren Resten bestehen (Wang *et al.*, 2002b; Foissner *et al.*, 2020). FAX5/FAX6-GFP Signale kolokalisierten mit diesen BFA-Kompartimenten, was dafür sprechen könnte, dass FAX5 und FAX6 auch im Trans-Golgi-Netzwerk oder frühen Endosomen lokalisiert sind. Unterstützt werden diese Ergebnisse auch durch Motive in der Aminosäuresequenz von FAX5/6. So besitzen FAX5 und FAX6 am C-terminalen Ende ein konserviertes „KAE“ Motiv, ähnlich dem in Pflanzen bekannten Golgi-Membranretensionssignal „KXE/D“. Das „KXE/D“ Motiv konnte bereits in *Arabidopsis* im Endomembranprotein EMP12 als Retensionssignal für den Golgi-Apparat, also frühen sekretorischen Syntheseweg, identifiziert werden. Zusätzlich ist das Motiv in eukaryotischen Endomembran-Proteinen hochkonserviert und zusätzlich in hunderten anderer Proteine mit unbekannter subzellulärer Lokalisation und Funktion vorhanden (Gao *et al.*, 2014). Außerdem konnte C-terminal unmittelbar nach der 4. Helix von FAX5/6, ein „YVYKIAA“ Motiv, konserviert als „YXYKIA“, identifiziert werden. Es könnte sich hierbei durchaus um eine Variation eines Tyrosin-basiertes Sortiersignals (*Tyrosine based sorting*

*motif*) handeln. Typisch für Motive dieser Art ist ein kritischer Tyrosinrest innerhalb von Sequenzabfolgen wie „YXXØ“ oder „NPXY“, wobei X durch jede Aminosäure und Ø durch Aminosäuren mit einer großen, hydrophoben Seitenkette, wie Tryptophan, Phenylalanin oder Tyrosin repräsentiert werden können. Motive der Art „YXXØ“ konnten bereits in zytosolischen Domänen aller Typen von Transmembranproteinen identifiziert werden und stehen im Zusammenhang mit dem Proteintargeting in Endozytose-Kompartimente oder Kompartimente des späten sekretorischen Syntheseweges (Bonifacino und Traub, 2003; Bonifacino und Dell'Angelica, 1999). Aufgrund der gleichen Resultate bezüglich der Lokalisation von FAX5 und FAX6, kann wiederum bekräftigt werden, dass es sich um Isoformen handelt (Könnel *et al.*, 2019).

Obwohl FAX6 kein vorhergesagtes chloroplastidäres Transitpeptid (ChloroP, Emanuelsson *et al.*, 1999) besitzt, lokalisierten kürzlich Huang *et al.* (2021), FAX6 aus Raps (*Brassica napus*), mittels N-terminalem *GFP-Targeting* im Chloroplasten. Die dort gezeigten GFP-Signale in Schließzellen der Epidermis von transient transformierten Tabak-Blättern zeigen allerdings kein distinktes, üblicherweise ringförmiges Signal wie für Hüllmembranproteine üblich und für FAX1, FAX3, FAX4 gezeigt (Li *et al.*, 2020; Bugaeva *et al.*, 2021), sondern ein schwaches diffuses Signal, das über die gesamte Fläche der Chloroplasten verteilt ist. Da auch keine weiteren Positiv- oder Negativ-Kontrollen untersucht wurden, handelt es sich bei diesen Signalen mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Überlagerung der Chlorophyll-Fluoreszenz in den GFP-Emissionskanal. Ein Problem das hinlänglich bekannt ist. Da FAX6 in *Brassica napus* eine hohe Sequenzähnlichkeit zu At-FAX6 (Huang *et al.*, 2021) aufweist, wäre daher ebenso von einer Lokalisation im sekretorischen Weg auszugehen.

Unterstützt wird die These, dass FAX5 und FAX6 eine redundante Funktionen innerhalb der Pflanze haben weiterhin dadurch, dass sowohl *fax5* als auch *fax6* Einzel-*Knockout*-Mutanten in *Arabidopsis* in dieser Arbeit keinen veränderten Phänotyp vergleichend zum Wildtyp zeigten. Mit den Analysen von *fax5/fax6* Doppel-*Knockout*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass sich FAX5 und FAX6 vermutlich funktionell komplementieren können, denn Doppelmутanten der beiden Gene zeigten einen auffälligen Phänotyp ähnlich zu *fax1 Knockout*-Mutanten (Li *et al.*, 2015). Neben der verringerten Biomasse, reduziertem Wachstum und verzögerter Ausbildung von Infloreszenzen, konnten in *fax5/fax6* Doppel-*Knockout*-Mutanten verkürzte Antheren und eine männliche Sterilität, somit Defekte in der Pollenentwicklung und der Produktion von Nachkommen, beobachtet werden. Diese Ergebnisse sollten zukünftig in einer erneuten Phänotypisierung und mittels Quantifizierung bestätigt werden. Des Weiteren segregierten *fax5/fax6* Mutanten, in denen ein Gen heterozygot und ein Gen homozygot vorlag, respektive *fax5/fax6* he/ho und *fax5/fax6* ho/ho, ähnlich zu *fax1 Knockout*-Mutanten nicht nach Mendel, sondern nur zu 4,7 – 6 % in homozygote Nachkommen beider Gene. Da in *fax5/fax6* Mutanten, ebenso wie in *fax1* Mutanten, eine Veränderung im Lipidhaushalt zu erwarten wäre, wurden Gesamtlipidextrakte aus Rosettenblättern isoliert und für eine ausstehende Lipidanalytik versendet (AG Prof. Dr. Peter Dörmann, Universität Bonn). In *fax1 Knockout*-Mutanten konnte vergleichend zum Wildtyp ein höherer Anteil an ER-gebildeten Lipiden und eine

Senkung an plastidären Lipiden gezeigt werden (Li *et al.*, 2015). Ebenso wären Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Antheren und Pollen sinnvoll, um zu überprüfen, ob in *fax5/fax6* Mutanten ebenso wie in *fax1* Mutanten Defekte im äußeren Pollenzellwandaufbau vorliegen. In *fax1 Knockout*-Mutanten fehlt die den Pollen aufgelagerte Exinschicht, bestehend aus Sporopollenin, und die Pollenhülle aus Tryphin. Dies führt zu einem Verkleben der Pollen innerhalb der Antheren und dem Ausbleiben der Narbenbefruchtung (Li *et al.*, 2015). Beide Schichten bestehen aus komplexen Biopolymeren, die aus FA-Derivaten und Lipiden gebildet werden. Diese Bausteine kommen ursprünglich aus den Tapetumzellen der Antheren (Ariizumi und Toriyama, 2011). FAX1 könnte also im Fettsäure-Export aus Plastiden innerhalb der Tapetumzellen eine Rolle spielen (Li *et al.*, 2015). Zhu *et al.* (2020) konnten kürzlich zeigen, dass in *Arabidopsis* der durch FAX1 vermittelte Fettsäureexport aus Chloroplasten erforderlich für die transkriptionelle Regulation der Antherenentwicklung und Bildung der Pollenzellwand sein könnte. Des Weiteren scheint FAX1 essentiell für die Pollenentwicklung und die Ausbildung eines Keimschlauches in *Arabidopsis* zu sein (Bugueva *et al.*, 2021). FAX1 war während der Pollenentwicklung, vor allem in Stadien der Pollenzellwandbildung und Anreicherung von LDs im Pollenkorn, das am höchsten exprimierte plastidäre FAX-Protein. In späteren Stadien der Pollenentwicklung konnte eine Hochregulierung der Transkriptlevel der FAX-Proteine FAX5 und FAX6 gezeigt werden. Weiterhin konnte FAX1 unter den Genen identifiziert werden, die in Expressionsanalysen von Qin *et al.* (2009) während der Pollenkeimung hochreguliert wurden. Auch im Pollenkeimschlauch zeigten Expressionsanalysen eine differentielle Expression des FAX1 Genes, welche mit dem Expressionsprofil von FAX6 korrelierte (Bugueva *et al.*, 2021). Während der Pollenschlauchkeimung konnte ein starker Anstieg an FAX5 Transkript beobachtet werden. Bugueva *et al.* (2021) schlussfolgerten, dass die Genexpression von FAX1 und FAX6 durch Pistil-Pollen-Interaktionen reguliert werden könnte, während die Regulation des Genes FAX5 vermutlich generell während der Bildung des Pollenkeimschlauches wichtig ist. Die Proteine FAX5/6 könnten also eine ähnliche Rolle wie das Protein FAX1 haben und den Fettsäure- oder Lipid-Transport in Membranen des sekretorischen Weges ermöglichen oder regulieren.

Zusammenfassend konnte in allen untersuchten Einzel-*Knockout*-Mutanten der FAX-Proteine FAX4-7 kein Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp unter Standardbedingungen beschrieben werden. Nicht auszuschließend ist, dass Experimente mit Stressfaktoren, wie Hitze/Kälte oder Nährstoffmangel, beispielsweise Phosphat, in einem Phänotyp resultieren würden. So könnte die Rolle von FAX4 und FAX7 in der pflanzlichen Entwicklung nochmals genauer betrachtet werden. Die Analysen der *fax5/fax6* Doppel-*Knockout*-Mutanten wiesen einen ähnlichen Phänotyp wie *fax1 Knockouts*, beschrieben von Li *et al.*, 2015, auf. Es könnte also ein möglicher Zusammenhang im Transportweg der Fettsäuren/Lipide über die Fettsäuretransporter FAX1 und FAX5/6 bestehen. Wobei FAX1 eine Rolle im Export aus Plastiden und FAX5/6 im Fettsäure/Lipidtransport in Membranen des sekretorischen Syntheseweges übernehmen könnte.

### 5.5 FAX1 und FAX5/6 – Transporter im selben Stoffwechselweg!?

In dieser Arbeit konnte mittels vergleichenden Sequenzanalysen, einem funktionellen Komplementationsassay in Hefe und der Charakterisierung von *Knockout*-Mutanten in *Arabidopsis* untermauert werden, dass FAX1 und FAX5/6 vermutlich ähnliche Rollen im Fettsäure- oder Lipidtransport einnehmen, möglicherweise im selben Stoffwechselweg eingebunden sind und einen ähnlichen Funktionsmechanismus hinsichtlich Membran-krümmender Eigenschaften aufweisen könnten. Expressionsanalysen in *fax1 Knockout*-Mutanten zeigen eine Hochregulierung der FAX5/6 Transkripte (Bugaeva *et al.*, 2021), was zusammen mit den Expressionsdaten der Pollenentwicklung und -schlauchkeimung andeutet, dass die Gene koreguliert sind. Hierbei ist FAX1 für den Fettsäure-Transport aus den Plastiden verantwortlich (Li *et al.*, 2015), während FAX5/6 am Import und Export von Fettsäuren/Lipiden am ER helfen könnten. Weiterhin deutet die Lokalisation von FAX5/6 im Trans-Golgi-Netzwerk und frühen Endosomen auch darauf hin, dass diese Proteine beim Vesikeltransport vom ER zur Plasmamembran beteiligt sein könnten. Ebenso möglich wäre für FAX5/6 daher eine ähnliche Funktion, wie bei den bereits beschriebenen Golgi-assoziierten ArfGAP Proteinen, die Membranbiegungen erkennen und an der Bildung von Transportvesikeln beteiligt sind (Drin *et al.*, 2007; McMahon and Mills 2004). Brück *et al.* (2008) konnten zeigen, dass die vakuoläre H(+)-ATPase (V-ATPase) nicht nur den Turgordruck und die Zellwandsynthese zu regulieren, sondern auch eine wichtige Funktion im TGN übernehmen könnte, und die Synthese und den Transport von Zellwandkomponenten beeinflusst. Der Verlust der ATPase-Untereinheit VHA-a1, die die Lokalisation der V-ATPase in Membranen des TGN oder EEs ermöglicht (Lupanga *et al.*, 2020), resultierte wie auch der Verlust der Proteine FAX5/6 in einem männlich-sterilen Phänotyp der Mutationslinien in *Arabidopsis* (Brück *et al.*, 2008). FAX5/6 könnten als den vesikulären Transport von Molekülen, wie Vorstufen von Wachs, Kutin und Sporopollenin/Tryphin, vom ER zur Plasmamembran ermöglichen oder daran beteiligt sein. Diese Schlussfolgerung könnte erste Hinweise über den bislang ungeklärten Transportmechanismus dieser Moleküle zur Plasmamembran ermöglichen. Somit ist aufgrund des männlich-sterilen Phänotyps von *fax5/fax6 Doppel-Knockout*-Mutanten am wahrscheinlichsten, dass FAX5/6 eine Rolle während der Bildung der Pollenzellwand im sekretorischen Weg einnehmen.

Auch wäre es denkbar, dass FAX5/6 bei der Bildung von Lipidtröpfchen, TAG Speicherorganellen, eine Rolle spielen. Lipidtröpfchen (*Lipid Droplets*, LDs) entstehen durch Abknospung der äußeren ER-Membranschicht und sind von einer Phospholipid-Monoschicht umgeben (Olzmann und Carvalho, 2019). Die Bildung von LDs durchläuft vier Prozessstufen: Keimbildung, Wachstum, Knospung und Ablösung (Thiam und Foret, 2016). Bei der Keimbildung entsteht eine neutrale Lipidlinse innerhalb der Membrandoppelschicht (Khandelia *et al.*, 2010; Choudhary *et al.*, 2015). Dieser Prozess könnte abhängig von der Modellierung der lokalen Lipidkomposition innerhalb der Membran oder biophysikalischer

Eigenschaften wie Krümmung, Oberflächenanziehung oder gar Membranbiegung sein (Chorlay *et al.*, 2018 und 2019; Choudhary *et al.*, 2018; M'barek *et al.*, 2017; Zanghellini *et al.*, 2010). Eine Interaktion von LDs, nach Abknospung vom ER, und Proteinen mit hydrophoben Domänen oder mit amphiphilen  $\alpha$ -Helices konnte ebenso gezeigt werden (Dhiman *et al.*, 2020). Viele ER Proteine können eine Membranbiegung an ER Membranen initiieren. Retikulone, auch in Pflanzen, besitzen beispielsweise C-terminal zwei hydrophobe Regionen verbunden mit einer hydrophilen Schlaufe (*Reticulon Homology Domain* (RHD)) und integrieren asymmetrisch, wodurch sie Membranbiegung und Tubulation im ER auslösen (Renvoise *et al.*, 2016; Falk *et al.*, 2014; Klemm *et al.*, 2013; Yang und Strittmatter, 2007). Generell ER-lokalisiert, konnte Retikulonen aber auch eine Rolle im ER-Golgi-Transport, Vesikelbildung und Membranmorphogenese zugeordnet werden (Yang und Strittmatter, 2007). Ähnlich wie bei FAX-Proteinen sind die terminalen Regionen der Retikulone im Gegensatz zur RHD wenig bis nicht konserviert (GrandPré *et al.*, 2000). Die FAX-Proteine FAX5/6 könnten also durch Membran-krümmende Eigenschaften oder die Erkennung von gebogenen Membranen bei Prozessen wie Transport über Membranen des sekretorischen Syntheseweges, Vesikelbildung oder -transport, und Bildung von Lipidtröpfchen initiierende oder stabilisierende Funktionen einnehmen.

Abschließend ergibt sich folgendes Transportmodell für die FAX-Proteine in der pflanzlichen Zelle (Abb. 42): Freie FAs werden über die plastidäre IE mittels FAX1 exportiert (Li *et al.*, 2015). In vegetativen Geweben erfolgt dies vermutlich mit der Hilfe von FAX3, der in *fax1 Knockout*-Linien den Verlust von FAX1 in der Entwicklung vom Keimlings- zum Rosettenstadium ausgleichen kann (Bugaeva *et al.*, 2021). FAX2 und möglicherweise FAX4 spielen eine Rolle in Samen (Tian *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020).



Kim *et al.*, 2013) und/oder die FAX-Proteine 5-7 erfolgen. Hierfür spricht auch, dass kürzlich Cai *et al.* (2021) zeigen konnten, dass eine gekoppelte Überexpression von FAX1 und ABCA9 die Bildung von Ölen in Samen von *Camelina sativa* erhöhen konnte. Vermutlich sind weiterhin die ER-lokaliserten Enzyme LACS 1-4 und LACS 8 beteiligt, die Fettsäuren für die Bildung von Kutin, Wachs und der Exinschicht von Pollen aktivieren (Jessen *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2009). Ausgehend vom ER, könnte ein Transport der lipophilen Vorstufen für Kutin, Wachs und die äußere Pollenzellwand über die FAX-Proteine FAX5/6 im sekretorischen Weg möglich sein. Entweder sind FAX5-7 direkt am Transport von lipophilen Substanzen über die ER Membran beteiligt oder sie agieren als Membran-krümmende oder -stabilisierende Proteine im Vesikeltransport zwischen ER und Golgi oder am TGN und frühen Endosomen. Nachfolgend übernehmen dann verschiedene ABC Transporter, die bei Mutation ähnliche Phänotypen wie *fax1* oder *fax5/6* auslösen, den Transport von lipophilen Substanzen über die Plasmamembran für die Bildung der lipophilen Biopolymere auf der Zellepidermis (zur Übersicht Kang *et al.*, 2011) oder die Vesikel fusionieren mit ihren Zielmembranen.

Expressionsanalysen zeigen in dieser Arbeit, dass in *fax5/fax6 Knockout*-Mutanten die Expression von *FAX3* und *FAX7* leicht erhöht ist, zusammen mit der Hypothese, dass *FAX3* den Verlust von *FAX1* partiell kompensieren kann (Bugaeva *et al.*, 2021), könnte auch über *FAX7* in Membranen des sekretorischen Weges ein zu *FAX5/6* alternativer, partiell kompensierender Transportweg stattfinden.

Nicht auszuschließen ist, dass FAX-Proteine aufgrund ihrer möglichen Fähigkeit zur Membranbiegung oder Stabilisation, helfen könnten zwischen Chloroplast und ER einen ähnlichen Komplex wie den MTL-Komplex (*mitochondrial transmembrane lipoprotein*) zu formen und so den Fettsäure/Lipid-Transport über die Organellmembranen erleichtern. Ein Zusammenhang zwischen Chloroplast-ER-Membranverbindung (*contact sites*) und Lipidtransport wurde bereits diskutiert (Wang und Benning, 2012a). Sowie bereits *FAX7* (Brugière *et al.*, 2004; Duncan *et al.*, 2011) konnte auch *FAX2* in Proteomanalysen isolierter Mitochondrien detektiert werden (Michaud *et al.*, 2016).

## 6 Ausblick

Ein langfristiges Ziel ist es, die Struktur von Proteinen der FAX-Familie aufzuklären. Mittels des rekombinant exprimierten Proteins FAX1 in *E. coli* sind anschließende Strukturanalyse durch NMR, Kryo-EM oder Kristallographie nun möglich. Die Methode könnte zukünftig auch für andere Transporter der FAX-Familie angewendet werden. Um die Hypothese einer Membrankrümmenden Funktion der FAX-Proteine zu validieren, könnten „Liposomen-Leakage“-Experimente, wie für Mic60 beschrieben (Hessenberger *et al.*, 2017), mit den rekombinant exprimierten und aufgereinigten FAX-Proteinen durchgeführt werden. Auch wären Interaktionsstudien innerhalb der FAX-Proteine, mit potenziellen Interaktionspartnern oder Fettsäuren/Lipiden möglich, um so weitere Rückschlüsse auf den Transportmechanismus sowie die Funktion und Affinität zu Fettsäuren/Lipiden der FAX-Proteine ziehen zu können. Die Rolle innerhalb des pflanzlichen Organismus könnte für die Proteine FAX5/6 mit der ausstehenden Lipidanalytik, sowie einer ausführlichen Betrachtung der Struktur der Pollen und der Pollenzellwand mittels Elektronenmikroskopie spezifiziert werden. Mit der Charakterisierung weiterer Doppel- oder Dreifachmutanten könnte die Bedeutung der FAX-Proteine vertieft betrachtet und so auch weitere mögliche Komplementationeffekte innerhalb der FAX-Proteine analysiert werden. Des Weiteren könnte die männliche Sterilität gezielt mittels Komplementationskonstrukten mit Gewebespezifischen Promotoren in den Antheren umgangen werden, um homozygote *fax1* oder *fax5/fax6* Pflanzen zu vermehren, umfassendere Analysen in vegetativen Geweben zu erlauben und Mehrfach-*Knockouts* zu generieren. Da für FAX1 Überexpressionslinien bereits ein vermehrter Gehalt des Speicherlipids TAG erzielt werden konnte (Li *et al.*, 2015), wären die Überexpression von FAX1 gekoppelt mit FAX5/6 sicher bezüglich ihres TAG-Gehalts interessant. Hier kann sogar ein möglicher additiver Effekt entstehen, da nicht nur FAs vermehrt aus dem Chloroplasten exportiert werden, sondern auch die Steigerung von Prozessen im späteren Transportweg möglich wäre. Die Modifikation dieser und weiterer Schlüsselproteine in der Fettsäure- und Lipidhomöostase in Pflanzen, könnte zukünftig auch eine modellierende Rolle in der Bioenergieproduktion spielen.

## 7 Zusammenfassung

Fettsäuren sind essentielle Bausteine zellulärer Lipide und werden in Pflanzen im Stroma der Plastiden synthetisiert. Der Aufbau von Lipiden kann in Plastiden (*prokaryotic pathway*) oder im endoplasmatischen Retikulum (*eukaryotic pathway*) erfolgen. Das Protein FAX1 (*Fatty Acid Export 1*), das in die innere Chloroplastenmembran inseriert und eine essentielle Rolle im Export von Fettsäuren aus Plastiden spielt, besitzt eine Rolle bei der Pflanzenentwicklung, Biomassenproduktion und Fruchtbarkeit (Li *et al.*, 2015). In *Arabidopsis* sind sieben FAX-Proteine bekannt. Sequenzanalysen von FAX1-7 führten zur Entwicklung eines neuen Modells für Topologie und Funktion, basierend auf der Membran-krümmenden Eigenschaft von Proteinen, die amphiphile  $\alpha$ -Helices enthalten (Könnel *et al.*, 2019). *GFP-Targeting* Experimente bestätigten eine Lokalisation von FAX5-FAX7 in Membranen des sekretorischen Weges. Weiterhin wurde die Fettsäure-Transportfunktion der FAX-Proteine mittels eines funktionellen Transportassays in Hefe nachgewiesen. Eine Charakterisierung von Mutanten in *Arabidopsis* zeigte, dass FAX5 und FAX6 als Isoformen in Membranen von ER, Trans-Golgi-Netzwerk und frühen Endosomen, eine Rolle im gleichen Stoffwechselweg wie FAX1 in Plastiden spielen könnten. Zudem bildet die Etablierung und Optimierung der rekombinanten Expression und Proteinaufreinigung von FAX1 in *E. coli* die Grundlage für weitere strukturelle und funktionelle Studien der FAX-Proteine.

## 8 Summary

Fatty acids are essential building blocks of cellular lipids and are synthesized in plants within the plastid stroma. Assembly of lipids can occur in plastids (prokaryotic pathway) or in the endoplasmic reticulum (eukaryotic pathway). The fatty acid export protein FAX1 (Fatty Acid Export 1), which is located in the inner envelope of chloroplasts and is essential for fatty acid export in plastids, plays an important role in plant development, biomass production and fertility (Li *et al.*, 2015). In *A. thaliana* seven FAX proteins are known. Sequence analyses of FAX1-7 lead to a new model on protein structure and function. This model is based on amphiphilic  $\alpha$ -helices-containing proteins and their role in membrane curvature (Könnel *et al.*, 2019). GFP-Targeting verified a predicted localization of FAX5-FAX7 in membranes of the secretory pathway. Further, the transport function of FAX proteins was proven by a functional transport assay in yeast. A characterization of mutants in *Arabidopsis* showed that FAX5 and FAX6, representing isoforms in membranes of ER, Trans-Golgi-Network and early endosomes, might play a role in the same pathway as the plastidic protein FAX1. Further, establishment and optimization of the recombinant expression and protein purification of FAX1 in *E. coli* set the basis for further structural and functional studies of FAX membrane proteins.

## 9 Literaturverzeichnis

**Almagro Armenteros J. J., Salvatore M., Emanuelsson O., Winther O., von Heijne G., Elofsson A., Nielsen H. (2019).** Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci Alliance*. 2: e201900429. doi: 10.26508/lsa.201900429. PMID: 31570514.

**Andersen R., Leksa N. C., Schwartz T. U. (2013).** Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins*. 81: 1857–1861. doi: 10.1002/prot.24364. PMID: 23852738.

**Ariizumi T., Toriyama K. (2011).** Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62: 437–460. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112312. PMID: 21275644.

**Armbruster U., Labs M., Pribil M., Viola S., Xu W., Scharfenberg M., Hertle A. P., Rojahn U., Jensen P. E., Rappaport F., Joliot P., Dörmann P., Wanner G., Leister D. (2013).** *Arabidopsis* CURVATURE THYLAKOID1 proteins modify thylakoid architecture by inducing membrane curvature. *Plant Cell*, 25: 2661–2678. doi: 10.1105/tpc.113.113118. PMID: 23839788.

**Auer M. , Kim M. J., Lemieux M. J., Villa A., Song J., Li X. D., Wang D. N., (2001).** High-yield expression and functional analysis of *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter. *Biochemistry* .40: 6628–6635. doi: 10.1021/bi010138+. PMID: 11380257.

**Awai K., Xu C., Tamot B., Benning C. (2006).** A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 10817-22. doi: 10.1073/pnas.0602754103. PMID: 16818883.

**Balsera M., Goetze T. A., Kovács-Bogdán E., Schürmann P., Wagner R., Buchanan B. B., Soll J., Bölter B. (2009).** Characterization of Tic110, a channel-forming protein at the inner envelope membrane of chloroplasts, unveils a response to Ca(2+) and a stromal regulatory disulfide bridge. *J Biol Chem*. 284:2603-2616. doi: 10.1074/jbc.M807134200. PMID: 18986981.

**Bates P. D., Stymne S., Ohlrogge J. (2013).** Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 358-364. doi: 10.1016/j.pbi.2013.02.015. PMID: 23529069

**Bates, P. D. (2016).** Understanding the control of acyl flux through the lipid metabolic network of plant oil biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1861: 1214–1225. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.03.021. PMID: 27003249.

**Barbot, M., Jans, D. C., Schulz, C., Denkert, N., Kroppen, B., Hoppert, M., Jakobs S., Meinecke M. (2015).** Mic10 oligomerizes to bend mitochondrial inner membranes at cristae junctions. *Cell Metab*. 21: 756–763. doi: 10.1016/j.cmet.2015.04.006. PMID: 25955211.

**Barbot M., Meinecke M. (2016).** Reconstitutions of mitochondrial inner membrane remodeling. *J. Struct. Biol*. 196: 20–28. doi:10.1016/j.jsb.2016.07.014. PMID: 27456366.

- Beisson F., Li-Beisson Y., Pollard M. (2012).** Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol.* 15 :329-37. doi: 10.1016/j.pbi.2012.03.003. PMID: 22465132.
- Benning C. (2008).** A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. *Prog Lipid Res.* 47: 381-9. doi: 10.1016/j.plipres.2008.04.001. PMID: 18440317.
- Benning C. (2009).** Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 71-91. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113414. PMID: 19572810.
- Bernard A., Joubès J. (2013).** *Arabidopsis* cuticular waxes: advances in synthesis, export and regulation. *Prog Lipid Res.* 52: 110-29. doi: 10.1016/j.plipres.2012.10.002. PMID: 23103356.
- Bigay J., Antony B. (2012).** Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Dev. Cell*, 23: 886–895. doi: 10.1016/j.devcel.2012.10.009. PMID: 23153485.
- Bigay J., Casella J. F., Drin G., Mesmin B., Antony B. (2005).** ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J.* 24: 2244–2253. doi: 10.1038/sj.emboj.7600714. PMID: 15944734.
- Bill R. M., Henderson P. J., Iwata S., Kunji E. R., Michel H., Neutze R., Newstead S., Poolman B., Tate C. G., Vogel H. (2011).** Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nat Biotechnol.* 29: 335–340. doi: 10.1038/nbt.1833. PMID: 21478852.
- Black P. N., Said B., Ghosn C. R., Beach J. V., Nunn W. D. (1987).** Purification and characterization of an outer membrane-bound protein involved in long-chain fatty acid transport in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262: 1412-1419. PMID: 3027089.
- Black P. N., DiRusso C. C. (2003).** Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes and vectorial esterification. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67: 454–472. doi: 10.1128/MMBR.67.3.454-472.2003. PMID: 12966144.
- Black P. N., DiRusso C. C. (2007).** Vectorial acylation: linking fatty acid transport and activation to metabolic trafficking. *Novartis Found Symp.* 286: 127-38; discussion 138-41, 162-3, 196-203. doi: 10.1002/9780470985571.ch11. PMID: 18269179.
- Block M. A., and Jouhet J. (2015).** Lipid trafficking at endoplasmic reticulum – chloroplast membrane contact sites. *Curr. Opin. Cell Biol.* 35: 21–29. doi: 10.1016/j.ceb.2015.03.004. PMID: 25868077.
- Bohnert M., Zerbès R. M., Davies K.M., Mühleip A. W., Rampelt H., Horvat, S.E., Boenke T., Kram A., Perschil I., Veenhuis M., *et al.*, (2015).** Central role of Mic10 in the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Cell Metab.* 21: 747–755. doi: 10.1016/j.cmet.2015.04.007. PMID: 25955210.
- Bonifacino J. S., Dell'Angelica E. C. (1999).** Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol.* 145:923-6. doi: 10.1083/jcb.145.5.923. PMID: 10352010.

- Bonifacino J. S., Traub L. M. (2003).** Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem.* 72:395-447. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800. PMID: 12651740.
- Bolanos-Garcia V. M., Davies O. R. (2006).** Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta.* 1760: 1304–1313. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.027. PMID: 16814929.
- Boucrot E., Pick A., Çamdere G., Liska N., Evergren E., McMahon H. T., Kozlov, M. M. (2012).** Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains. *Cell*, 149: 124–136. doi:10.1016/j.cell.2012.01.047. PMID: 22464325.
- Boulter J.M., Wang D.N. (2001).** Purification and characterization of human erythrocyte glucose transporter in decylmaltoside detergent solution. *Protein Expr. Purif.* 22: 337–348. doi: 10.1006/prep.2001.1440. PMID: 11437611.
- Breuers F.K., Bräutigam A., Weber A.P. (2011).** The plastid outer envelope - a highly dynamic interface between plastid and cytoplasm. *Front. Plant Sci.* 2: 97. doi: 10.3389/fpls.2011.00097. PMID: 22629266.
- Brooks C. L., Morrison M., Joanne Lemieux M. (2013).** Rapid expression screening of eukaryotic membrane proteins in *Pichia pastoris*. *Protein Sci.* 22:425-33. doi: 10.1002/pro.2223. PMID: 23339074.
- Browse J., Warwick N., Somerville C.R., Slack C.R. (1986).** Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*. *The Biochemical Journal*, 235(1) 25-31. doi: 10.1042/bj2350025. PMID: 3741384.
- Brüx A., Liu T. Y., Krebs M., Stierhof Y. D., Lohmann J. U., Miersch O., Wasternack C., Schumacher K. (2008).** Reduced V-ATPase activity in the trans-Golgi network causes oxylipin-dependent hypocotyl growth inhibition in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 20:1088-100. doi: 10.1105/tpc.108.058362. PMID: 18441211.
- Brugière S., Kowalski S., Ferro M., Seigneurin-Berny D., Miras S., Salvi D., Ravanel S., d'Hérin P., Garin J., Bourguignon J., Joyard J., Rolland N. (2004).** The hydrophobic proteome of mitochondrial membranes from *Arabidopsis* cell suspensions. *Phytochemistry.* 65:1693-707. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.03.028. PMID: 15276431.
- Bucher M. H., Evdokimov A. G., Waugh, D. S. (2002).** Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58: 392–397. doi: 10.1107/s0907444901021187. PMID: 11856823.
- Bugaeva W.\*, Könnel A.\*, Peter J.\*, Mees J., Hankofer V., Schick C., Schmidt A., Banguela-Castillo A., Philippar K. (2021).** FAX proteins in the inner envelope of chloroplasts can complement each other for fatty acid transport. *J. Ex. Bot.* (submitted), \* this authors contributed equally.

- Cai G., Wang G., Kim S. C., Li J., Zhou Y., Wang X. (2021).** Increased expression of fatty acid and ABC transporters enhances seed oil production in camelina. *Biotechnol Biofuels*. 14:49. doi: 10.1186/s13068-021-01899-w. PMID: 33640013.
- Chaptal V., Delolme F., Kilburg A., Magnard S., Montigny C., Picard M., Prier C., Monticelli L., Bornert O., Agez M., et al., (2017).** Quantification of Detergents Complexed with Membrane Proteins. *Sci Rep* 7: 41751. doi: 10.1038/srep41751. PMID: 28176812.
- Chorlay A., Thiam A.R. (2018).** An asymmetry in monolayer tension regulates lipid droplet budding direction. *Biophys. J.* 114: 631–640, doi: 10.1016/j.bpj.2017.12.014. PMID: 29414709.
- Chorlay A., Monticelli L., Verissimo Ferreira J., M'barek B. K., Ajjaji D., Wang S., Johnson E., Beck R., Omrane M., Beller M., Carvalho P., Thiam A. R. (2019).** Membrane asymmetry imposes directionality on lipid droplet emergence from the ER, *Dev. Cell* 50 (2019) 25–42, doi: 10.1016/j.devcel.2019.05.003. PMID: 31155466.
- Choudhary V., Ojha N., Golden A., Prinz W. A. (2015).** A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER, *J. Cell Biol.* 211: 261–271, doi: 10.1083/jcb.201505067. PMID: 26504167.
- Choudhary V., Golani G., Joshi A. S., Cottier S., Schneiter R., Prinz W. A., Kozlov M. M. (2018).** Architecture of lipid droplets in endoplasmic reticulum is determined by phospholipid intrinsic curvature, *Curr. Biol.* 28(6): (2018) 915–926, doi: 10.1016/j.cub.2018.02.020. PMID: 29526591.
- Claus S., Jezierska S., Van Bogaert I. N. A. (2019).** Protein-facilitated transport of hydrophobic molecules across the yeast plasma membrane. *FEBS Lett.* 593: 1508-1527. doi: 10.1002/1873-3468.13469. PMID: 31166012.
- Cook R., Lupette J., Benning C. (2021).** The Role of Chloroplast Membrane Lipid Metabolism in Plant Environmental Responses. *Cells*. 10 :706. doi: 10.3390/cells10030706. PMID: 33806748.
- Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H. (1985).** Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution *Nature*. 318: 618–624. doi: 10.1038/318618a0. PMID: 22439175.
- Deutscher M. P. (1990).** In: Deutscher M.P. (Ed.), *Methods in Enzymology*, 182, Academic Press, San Diego, 1990, pp. 83–89. ISBN: 9780121820831.
- Dhiman R., Caesar S., Thiam A. R., Schrul B. (2020).** Mechanisms of protein targeting to lipid droplets: A unified cell biological and biophysical perspective. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 108:4 13. doi: 10.1016/j.semcdb.2020.03.004. PMID: 32201131.
- DiRusso C. C., Connell E. J., Faergeman N. J., Knudsen J., Hansen J. K., Black P. N. (2000).** Murine FATP alleviates growth and biochemical deficiencies of yeast fat1Delta strains. *Eur J. Biochem.* 267: 4422-33. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01489.x. PMID: 10880966.
- DiRusso C. C., Darwis D., Obermeyer T., Black P. N. (2008).** Functional domains of the fatty acid transport proteins: studies using protein chimeras. *Biochim Biophys Acta.* 178: 135-43. doi: 10.1016/j.bbalip.2008.01.002. PMID: 18258213.

- Dobritsa A. A., Shrestha J., Morant M., Pinot F., Matsuno M., Swanson R., Lindberg Møller B., Preuss, D. (2009).** CYP704B1 is a long-chain fatty acid  $\omega$ -hydroxylase essential for sporopollenin synthesis in pollen of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151: 574-89. doi: 10.1104/pp.109.144469. PMID: 19700560.
- Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J. M., Cohen S.L., Chait B. T., MacKinnon R. (1998).** The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280: 69–77. doi: 10.1126/science.280.5360.69. PMID: 9525859.
- Drin G., Casella J. F., Gautier R., Boehmer T., Schwartz T. U., Antony B. (2007).** A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 138–146. doi: 10.1038/nsmb1194. PMID: 17220896.
- Du Z. Y., Arias T., Meng W., Chye M. L. (2016).** Plant acyl-CoA-binding proteins: an emerging family involved in plant development and stress responses. *Prog. Lipid Res.* 63: 165–181. doi: 10.1016/j.plipres.2016.06.002. PMID: 27368137.
- Duncan O., Taylor N. L., Carrie C., Eubel H., Kubiszewski-Jakubiak S., Zhang B., Narsai R., Millar A. H., Whelan J. (2011).** Multiple lines of evidence localize signaling, morphology, and lipid biosynthesis machinery to the mitochondrial outer membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 157: 1093-113. doi: 10.1104/pp.111.183160. PMID: 21896887.
- Duy D., Wanner G., Meda A., von Wiren N., Soll J., Philippar K. (2007).** PIC1, an Ancient Permease in *Arabidopsis* Chloroplasts, Mediates Iron Transport. *Plant Cell.* 19: 986-1006. doi: 10.1105/tpc.106.047407. PMID: 17337631.
- Eastmond P.J. (2006).** SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell.* 18: 665-75. doi: 10.1105/tpc.105.040543. PMID: 16473965.
- Edwards A. M., Arrowsmith C. H., Christendat D., Dharamsi A., Friesen J. D., Greenblatt J. F., Vedadi M. (2000).** Protein production: Feeding the crystallographers and NMR spectroscopists. *Nat. Struct. Biol.* 7:970-972. doi: 10.1038/80751. PMID: 11104003.
- Emanuelsson O., Nielsen H., von Heijne G. (1999).** ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8: 978-84. doi: 10.1110/ps.8.5.978. PMID: 10338008.
- Engel C. K., Chen L., Prive G. G. (2002).** Stability of the lactose permease in detergent solutions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1564: 47–56. doi: 10.1016/s0005-2736(02)00397-8. PMID: 12100995.
- Falk J., Rohde M., Bekhite M. M., Neugebauer S., Hemmerich P., Kiehntopf M, Deufel T., Hubner C. A., Beetz C. (2014).** Functional mutation analysis provides evidence for a role of REEP1 in lipid droplet biology. *Hum. Mutat.* 35: 497–504. doi: 10.1002/humu.22521. PMID: 24478229.
- Fan J., Zhai Z., Yan C., Xu C. (2015).** *Arabidopsis* TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL5 Interacts with TGD1, TGD2, and TGD4 to Facilitate Lipid Transfer from the Endoplasmic Reticulum to Plastids. *Plant Cell.* 27: 2941-55. doi: 10.1105/tpc.15.00394. PMID: 26410300.

- Ferre-D'Amare R., Burley S. K. (1994).** Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. *Structure*. 2: 357–359. doi: 10.1016/s0969-2126(00)00037-x. PMID: 8081751.
- Fiedler, S., Broecker, J. Keller, S. (2010).** Protein folding in membranes. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 1779–1798. doi: 10.1007/s00018-010-0259-0. PMID: 20101433.
- Foissner I., Hoeflberger M., Hoepflinger M.C., Sommer A., A. Bulychev A.A. (2020).** Brefeldin A inhibits clathrin-dependent endocytosis and ion transport in *Chara* internodal cells. *Biol. Cell.* 112:317-334. doi: 10.1111/boc.202000031. PMID: 32648585.
- Gallop J. L., Jao C. C., Kent H. M., Butler P. J., Evans P. R., Langen R., McMahon H. T. (2006).** Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J.* 25: 2898–2910. doi:10.1038/sj.emboj.7601174. PMID: 16763559.
- Gao C., Cai Y., Wang Y., Aniento F., Robinson D.G., Jiang L. (2001).** Retention mechanisms for ER and Golgi membrane proteins. *Trends Plant Sci.* 19: 508-515, doi: 10.1016/j.tplants.2014.04.004. PMID: 24794130.
- Garavito R. M., Picot D., Loll P. J. (1996).** Strategies for crystallizing membrane proteins. *J. Bioenerg. Biomembranes.* 28: 13–27. PMID: 8786233.
- Gautier R., Douguet D., Antony B., Drin G. (2008).** HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics.* 24: 2101-2. doi: 10.1093/bioinformatics/btn392. PMID: 18662927.
- Gerber J., Mühlenhoff U., Hofhaus G., Lill R., Lisowsky T. (2001).** Yeast ERV2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *J Biol Chem.* 276: 23486-91. doi: 10.1074/jbc.M100134200. PMID: 11313344.
- Gkeka, P., Sarkisov, L. (2010).** Interactions of phospholipid bilayers with several classes of amphiphilic  $\alpha$ -helical peptides: insights from coarsegrained molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B.* 114: 826–839. doi: 10.1021/jp908320b. PMID: 20028006.
- GrandPré T., Nakamura F., Vartanian T., Strittmatter S.M. (2000).** Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature.* 403: 439-44. doi: 10.1038/35000226. PMID: 10667797.
- Grisshammer C.G., Tate Q. (1995).** Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Rev. Biophys.* 28: 315–422. doi: 10.1017/s0033583500003504. PMID: 7480624.
- Gueguen V., Macherel D., Jaquinod M., Douce R., Bourguignon J. (2000).** Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *J Biol. Chem.* 275: 5016-25. doi: 10.1074/jbc.275.7.5016. PMID: 10671542.
- Gustafsson C., Govindarajan S., Minshull J. (2004).** Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* 22: 346-353. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.04.006. PMID: 15245907.

- Guzman L. M., Belin D., Carson M. J., Beckwith J. (1995).** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177: 4121–4130. doi: 10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995. PMID: 7608087.
- Haltia T., Freire E. (1995).** Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1228: 1–27. doi: 10.1016/0005-2728(94)00161-w. PMID: 7857960.
- Härtel H., Dormann P., Benning C. (2000).** DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 10649–54. doi: 10.1073/pnas.180320497. PMID: 10973486.
- Heinz S., Rast A., Shao L., Gutu A., Gügel I.L., Heyno E., Labs M., Rengstl B., Viola S., Nowaczyk M. M., et al., (2016).** Thylakoid membrane architecture in synechocystis depends on CurT, a homolog of the granal CURVATURE THYLAKOID1 proteins. *Plant Cell*, 28: 2238–2260. doi: 10.1105/tpc.16.00491. PMID: 27543090.
- Hengen P. (1995).** Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. In: *Trends in Biochemical Sciences.* 20, 7: 285–6. doi: 10.1016/S0968-0004(00)89045-3. PMID: 7667882.
- Hessenberger M., Zerbes R.M., Rampelt H., Kunz S., Xavier A.H., Purfürst B., Lilie H., Pfanner N., van der Laan M., Daumke O. (2017).** Regulated membrane remodeling by Mic60 controls formation of mitochondrial crista junctions. *Nat. Commun.* 8: 15258. doi: 10.1038/ncomms15258. PMID: 28561061.
- Hochuli E., Döbeli H., Schacher A. (1987).** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. In: *Journal of Chromatography A.* Band 411: 177–184. doi: 10.1016/S0021-9673(00)93969-4. PMID: 3443622.
- Horvath C. A., Vanden Broeck D., Boulet G. A., Bogers J., De Wolf M. J. (2007).** Epsin: inducing membrane curvature. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 1765–1770. doi: 10.1016/j.biocel.2006.12.004. PMID: 17276129.
- Huang K. L., Tian J., Wang H. , Fu Y.F., Li Y., Zheng Y., Li X. B. (2021).** Fatty acid export protein BnFAX6 functions in lipid synthesis and axillary bud growth in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* doi: 10.1093/plphys/kiab229.
- Hurlock A. K., Roston R. L., Wang K., Benning, C. (2014).** Lipid trafficking in plant cells. *Traffic*, 15: 915–932. doi: 10.1111/tra.12187. PMID: 24931800.
- Hwang J. U., Song W. Y., Hong D., Ko D., Yamaoka Y., Jang S., Yim S., Lee E., Khare D., Kim K., Palmgren M., Yoon H. S., Martinoia E., Lee Y. (2016).** Plant ABC Transporters Enable Many Unique Aspects of a Terrestrial Plant's Lifestyle. *Mol Plant.* 9: 338–355. doi: 10.1016/j.molp.2016.02.003. PMID: 26902186.
- Jackson D. D., Stevens T. H. (1997).** VMA12 encodes a yeast endoplasmic reticulum protein required for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase assembly. *J Biol Chem.* 272: 25928–34. doi: 10.1074/jbc.272.41.25928. PMID: 9325326.

- Jenni S., Leibundgut M., Boehringer D., Frick C., Mikolásek B., Ban N. (2007).** Structure of fungal fatty acid synthase and implications for iterative substrate shuttling. *Science*. 316: 254-61. doi: 10.1126/science.1138248. PMID: 17431175.
- Jessen D., Olbrich A., Knufer J., Kruger A., Hoppert M., Polle A., Fulda M. (2011).** Combined activity of LACS1 and LACS4 is required for proper pollen coat formation in *Arabidopsis*. *Plant J*. 68: 715–726. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04722.x PMID: 21790813.
- Jessen D., Roth C., Wiermer M., Fulda M. (2015).** Two activities of long-chain acyl-coenzyme A synthetase are involved in lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 167: 351-66. doi: 10.1104/pp.114.250365. PMID: 25540329.
- Jouhet J., Maréchal E., Baldan B., Bligny R., Joyard J., Block M. A. (2004).** Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol*. 167: 863-74. doi: 10.1083/jcb.200407022. PMID: 15569715.
- Kästner C.N., Dimroth P., Pos K.M. (2000).** The Na<sup>+</sup>-dependent citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae*: high-level expression and site-directed mutagenesis of asparagine-185 and glutamate-194. *Arch. Microbiol*. 174: 67–73. doi: 10.1007/s002030000175. PMID: 10985744.
- Kang J., Park J., Choi H., Burla B., Kretzschmar T., Lee Y., Martinoia E. (2011).** Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* 9: e0153. doi: 10.1199/tab.0153. PMID:22303277.
- Kalinger R.S., Pulsifer I.P., Hepworth S.R., Rowland O., (2020).** Fatty Acyl Synthetases and Thioesterases in Plant Lipid metabolism:Diverse Functions and Biotechnological Applications. *Lipids*. 55(5):435-455. doi: 10.1002/lipd.12226. PMID: 32074392.
- Khandelia H., Duelund L., Pakkanen K. I., Ipsen J.H. (2010).** Triglyceride blisters in lipidbilayers: implications for lipid droplet biogenesis and the mobile lipid signal in cancer cell membranes. *PLoS One*. 5: e12811. doi: 10.1371/journal.pone.0012811. PMID: 20877640.
- Khao J., Arce-Lopera J., Sturgis J. N., Duneau, J. P. (2011).** Structure of a protein-detergent complex: the balance between detergent cohesion and binding. *Eur. Biophys. J*. 40: 1143–1155. doi: 10.1007/s00249-011-0745-9. PMID: 21901295.
- Kelley L. A., Mezulis S., Yates C. M., Wass M. N., Sternberg M. J. (2015).** The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*. 10: 845-58. doi: 10.1038/nprot.2015.053. PMID: 25950237.
- Kiefhaber T., Rudolph R., Kohler H.H., Buchner J. (1991).** Protein aggregation in vitro and *in vitro*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (NY)*. 9: 825–829. doi: 10.1038/nbt0991-825. PMID: 1367356.
- Kim S., Yamaoka Y., Ono H., Kim H., Shim D., Maeshima M., Martinoia E., Cahoon E. B., Nishida I., Lee Y. (2013).** AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110: 773–778. doi: 10.1073/pnas.1214159110. PMID: 23269834.
- Kindl, H. (1993).** Fatty acid degradation in plant peroxisomes: Function and biosynthesis of the enzymes involved. *Biochimie*. 75: 225-230. doi: 10.1016/0300-9084(93)90080-C.

- Kjaerulff O., Brodin L., Jung A. (2011).** The structure and function of endophilin proteins. *Cell Biochem. Biophys.* 60: 137–154. doi: 10.1007/s12013-010-9137-5. PMID: 21184288.
- Klammt C., Maslennikov I., Bayrhuber M., Eichmann C., Vajpai N., Chua Chiu E.J., Blain K. Y., Esquivies L., Kwon J. H. J. Balana B., et al., (2012).** Facile backbone structure determination of human membrane proteins by NMR spectroscopy. *Nat. Methods.* 9: 834–839. doi: 10.1038/nmeth.2033. PMID: 22609626.
- Klemm R. W., Norton J. P., Cole R. A., Li C.S., Park S. H., Crane M. M., Li L., Jin D., Boye-Doe A., Liu T. Y., Shibata Y., Lu H., Rapoport T. A., Farese Jr. R. V., Blackstone C., Guo Y, Mak H. Y. (2013).** A conserved role for atlastin GTPases in regulating lipid droplet size. *Cell Rep.* 3: 1465–1475. doi: 10.1016/j.celrep.2013.04.015. PMID: 23684613.
- Könnel A., Bugaeva W., Gügel I.L., Philippar K. (2019).** BANFF: bending of bilayer membranes by amphiphilic  $\alpha$ -helices is necessary for form and function of organelles. *Biochem. Cell Biol.* 97: 243–256. doi: 10.1139/bcb-2018-0150. PMID: 30208283.
- Korepanova A., Gao F. P., Hua Y., Qin H., Nakamoto R. K., Cross T. A. (2005).** Cloning and expression of multiple integral membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 14: 148–158. doi: 10.1110/ps.041022305. PMID: 15608119.
- Kovács-Bogdán E., Soll J., Bölter B. (2010).** Protein import into chloroplasts: the Tic complex and its regulation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1803: 740–747. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.015. PMID:20100520.
- Kozlov M. M., Campelo F., Liska N., Chernomordik L. V., Marrink S.J., McMahan, H. T. (2014).** Mechanisms shaping cell membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 29: 53–60. doi: 10.1016/j.ceb.2014.03.006. PMID: 24747171.
- Kühlbrandt W., Wang D. N., Fujiyoshi Y. (1994).** Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature.* 367: 614– 621. doi: 10.1038/367614a0. PMID: 8107845.
- Krüger V., Deckers M., Hildenbeutel M., van der Laan M., Hellmers M., Dreker C., Preuss M., Herrmann J. M., Rehling P., Wagner R., Meinecke M. (2012).** The mitochondrial oxidase assembly protein1 (Oxa1) insertase forms a membrane pore in lipid bilayers. *J Biol Chem.* 287: 33314–26. doi: 10.1074/jbc.M112.387563. PMID: 22829595.
- Kunst L., Samuels L. (2009).** Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Curr Opin Plant Biol.* 12: 721–7. doi: 10.1016/j.pbi.2009.09.009. PMID: 19864175.
- Kwong P. D., Wyatt R., Desjardins E., Robinson J., Culp J.S., Hellmig B. D., Sweet R. W., Sodroski J., Hendrickson W. A. (1999).** Probability analysis of variational crystallization and its application to gp120, the exterior envelope glycoprotein of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1), *J. Biol.Chem.* 274: 4115–4123. doi: 10.1074/jbc.274.7.4115. PMID: 9933605.
- LaBrant E., Barnes A. C., Roston R. L. (2018).** Lipid transport required to make lipids of photosynthetic membranes. *Photosynth Res.* 138:345-360. doi: 10.1007/s11120-018-0545-5. PMID: 29961189.

- le Maire, Champeil P., Moller J.V. (2000).** Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *M. Biochim. Biophys. Acta.* 1508: 86–111. doi: 10.1016/s0304-4157(00)00010-1. PMID: 11090820.
- Li N., Gügel I.L., Giavalisco P., Zeisler V., Schreiber L., Soll J., Philippar K. (2015).** FAX1, a novel membrane protein mediating plastid fatty acid export. *PLoS Biol.* 13: e1002053. doi: 10.1371/journal.pbio.1002053. PMID:25646734.
- Li N., Xu C., Li-Beisson Y., Philippar K. (2016).** Fatty acid and lipid transport in plant cells. *Trends Plant Sci.* 21: 145–158. doi: 10.1016/j.tplants.2015.10.011. PMID: 26616197.
- Li N., Meng H., Li S., Zhang Z., Zhao X., Wang S., Liu A., Li Q., Li X., Guo L., Li H., Zuo J., Luo K., (2020).** Two plastid fatty acid exporters contribute to seed oil accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* doi: 10.1104/pp.19.01344. PMID: 32019874.
- Li X. D., Villa A., Gownley C., Kim M. J., Song J. M., Auer M., Wang D. N. (2001).** Monomeric state and ligand binding of recombinant GABA transporter from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 494: 165–169. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02334-1. PMID: 11311234.
- Li-Beisson Y., Shorrosh B., Beisson F., Andersson M.X., Arondel V., Bates P.D., Baud S., Bird D., Debono A., Durrett T.P., et al., (2013).** Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book*, 11: e0161. doi: 10.1199/tab.0161. PMID:23505340.
- Li-Beisson Y., Neunzig J., Lee Y., Philippar K. (2017).** Plant membraneprotein mediated intracellular traffic of fatty acids and acyl lipids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 40: 138–146. doi: 10.1016/j.pbi.2017.09.006. PMID: 28985576.
- Lilie H., Schwarz E., Rudolph R. (1998).** Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 497–501 doi: 10.1016/s0958-1669(98)80035-9. PMID: 9821278.
- Lister R., Carrie C., Duncan O., Ho L.H., Howell K.A., Murch, M.W., Whelan J. (2007).** Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria. *Plant Cell.* 19: 3739-59. doi: 10.1105/tpc.107.050534. PMID: 17981999.
- Lomakin A., Teplow D. B., Benedek G. B. (2005).** Quasielastic Light Scattering for Protein Assembly Studies. In: Sigurdsson E.M. (eds) Amyloid Proteins. *Methods in Molecular Biolog.* 299. Humana Press. doi: 10.1385/1-59259-874-9:153.
- Loqué D., Lalonde S., Looger L. L., von Wirén N., Frommer W.B. (2007).** A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature.* 446:195-8. doi: 10.1038/nature05579. PMID: 17293878.
- Lu B., Xu C., Awai K., Jones A. D., Benning C. (2007).** A small ATPase protein of *Arabidopsis*, TGD3, involved in chloroplast lipid import. *J Biol Chem.* 282: 35945-53. doi: 10.1074/jbc.M704063200. PMID: 17938172.
- Lu S.Y., Song T., Kosma D.K., Parsons E.P., Rowland O., Jenks M.A. (2009).** *Arabidopsis* CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant J.* 59: 553–564. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03892.x. PMID: 19392700.

- Lupanga U., Röhrich R., Askani J., Hilmer S., Kiefer C., Krebs M., Kanazawa T., Ueda T., Schumacher K. (2020).** The *Arabidopsis* V-ATPase is localized to the TGN/EE via a seed plant-specific motif. *Elife*. 9:e60568. doi: 10.7554/eLife.60568. PMID: 33236982.
- Madsen K.L., Herlo R. (2017).** Recursive alterations of the relationship between simple membrane geometry and insertion of amphiphilic motifs. *Membranes*. 7: E6. doi: 10.3390/membranes7010006. PMID: 28208740.
- Mano S., Nakamori C., Hayashi M., Kato A., Kondo M., Nishimura M. (2002).** Distribution and characterization of peroxisomes in *Arabidopsis* by visualization with GFP: dynamic morphology and actin-dependent movement. *Plant Cell Physiol*. 43:331-41. doi: 10.1093/pcp/pcf037. PMID: 11917088.
- Masterson C., Wood C. (2001).** Mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation capacities of organs from a non-oilseed plant. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Proc. Biol. Sci.* 268: 1949-1953. doi: 10.1098/rspb.2001.1783. PMID: 11564353.
- Masuda M., Takeda S., Sone M., Ohki T., Mori H., Kamioka Y., Mochizuki N. (2006).** Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J*. 25: 2889–2897. doi: 10.1038/sj.emboj.7601176. PMID: 16763557.
- Marchive C., Nikovics K., To A., Lepiniec L., Baud, S. (2014).** Transcriptional regulation of fatty acid production in higher plants: Molecular bases and biotechnological outcomes. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 116: 1332-1343. doi: 10.1002/ejlt.201400027.
- Matthew L. (2004).** RNAi for plant functional genomics. *Comp Funct Genomics*. 5: 240-4. doi: 10.1002/cfg.396. PMID: 18629158
- M'barek K. B., Ajjaji D., Chorlay A., Vanni S., Foret L., Thiam A. R. (2017).** ER membrane phospholipids and surface tension control cellular lipid droplet formation, *Dev. Cell*. 41: 591–604. doi: 10.1016/j.devcel.2017.05.012. PMID: 28579322.
- McMahon H. T., Mills I. G. (2004).** COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 379–391. doi: 10.1016/j.ceb.2004.06.009. PMID: 15261670.
- Mekhedov S., de Ilárduya O. M., Ohlrogge J. (2000).** Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. *Plant Physiol*. 122: 389-402. doi: 10.1104/pp.122.2.389. PMID: 10677432.
- Michaud M., Gros V., Tardif M., Brugière S., Ferro M., Prinz W. A., Toulmay A., Mathur J., Wozny M., Falconet D., *et al.*, (2016).** AtMic60 is involved in plant mitochondria lipid trafficking and is part of a large complex. *Curr. Biol.* 26: 627–639. doi: 10.1016/j.cub.2016.01.011. PMID: 26898467.
- Michaud M., Prinz W.A., Jouhet J. (2017).** Glycerolipid synthesis and lipid trafficking in plant mitochondria. *FEBS J*. 284: 376–390. doi:10.1111/febs.13812. PMID: 27406373.
- Michaud M., Jouhet J. (2019).** Lipid Trafficking at Membrane Contact Sites During Plant Development and Stress Response. *Front. Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2019.00002. PMID: 30713540.

- Miroux B., Walker J. E. (1996).** Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260 (1996) 289–298. doi: 10.1006/jmbi.1996.0399. PMID: 8757792.
- Moellering E. R., Benning C. (2011).** Galactoglycerolipid metabolism under stress: a time for remodeling. *Trends Plant Sci.* 16: 98–107. doi: 10.1016/j.tplants.2010.11.004. PMID: 21145779.
- Mohanty A. R., Wiener M. C. (2004).** Membrane protein expression and production: Effects of polyhistidine tag length and position. *Protein Exp. Purif.* 33: 311–325. doi: 10.1016/j.pep.2003.10.010. PMID: 14711520.
- Mól A. R., Castro M. S., Fontes W. (2018).** NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections. doi: 10.1101/416347.
- Mueller-Schuessele S. J., Michaud M. (2018).** Plastid Transient and Stable Interactions with Other Cell Compartments. *Methods Mol Biol.* 1829: 87-109. doi: 10.1007/978-1-4939-8654-5\_6. PMID: 29987716.
- Nakamura Y. (2013).** Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog. Lipid Res.* 52: 43–50. doi: 10.1016/j.plipres.2012.07.002. PMID: 22954597.
- Nunnari J., Suomalainen A. (2012).** Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148: 1145–1159. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035. PMID: 22424226.
- Ohlrogge J. B., Shine W. E., Stumpf P. K. (1978).** Fat metabolism in higher plants. Characterization of plant acyl-ACP and acyl-CoA hydrolases. *Arch Biochem Biophys.* 189: 382–91. doi: 10.1016/0003-9861(78)90225-4. PMID: 30409.
- Oliver, R. C., Lipfert J., Fox D. A., Lo R. H., Doniach S., Columbus L. (2013).** Dependence of micelle size and shape on detergent alkyl chain length and head group. *PLoS One.* 8: e62488. doi: 10.1371/journal.pone.0062488. PMID: 23667481.
- Olzmann A., Carvalho P. (2019).** Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20: 137–155. doi: 10.1038/s41580-018-0085-z. PMID: 30523332.
- Peter B. J., Kent H. M., Mills I. G., Vallis Y., Butler P. J., Evans P. R., McMahon H. T. (2004).** BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, 303: 495–499. doi: 10.1126/science.1092586. PMID: 14645856.
- Pfanner N., van der Laan M., Amati P., Capaldi R.A., Caudy A. A., Chacinska, A., Darshi M., Deckers M., Hoppins S., Icho T., *et al.*, (2014).** Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J. Cell Biol.* 204: 1083–1086. doi: 10.1083/jcb.201401006. PMID: 24687277.
- Pollard M., Beisson F., Li Y., Ohlrogge J. B. (2008).** Building lipid barriers: Biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci.*, 13: 236–246. doi: 10.1016/j.tplants.2008.03.003. PMID: 18440267.
- Poolman B., Knol J. (1999).** Amplified expression and membrane reconstitution of transport proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 27: 912–917. doi: 10.1042/bst0270912. PMID: 10830127.

- Pribil M., Labs M., Leister D. (2014).** Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *J. Exp. Bot.* 65: 1955–1972. doi: 10.1093/jxb/eru090. PMID: 24622954.
- Privé G. G. (2007).** Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods* 41: 388–397. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.01.007. PMID: 17367711.
- Pulsifer I. P., Kluge S., Rowland O. (2011).** *Arabidopsis* long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), LACS2, and LACS3 facilitate fatty acid uptake in yeast. *Plant Physiol Biochem.* 51:31–9. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.10.003. PMID: 22153237.
- Putta P., Rankenberg J., Korver R. A., van Wijk R., Munnik T., Testerink C., Kooijmann E. E. (2016).** Phosphatidic acid binding proteins display differential binding as a function of membrane curvature stress and chemical properties. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1858: 2709–2716. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.07.014. PMID: 27480805.
- Qin Y., Leydon A. R., Manziello A., Pandey R., Mount D., Denic S., Vasic B., Johnson M. A., Palanivelu R. (2009).** Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genet.* 5: e1000621. doi: 10.1371/journal.pgen.1000621. Erratum in: *PLoS Genet.* 2016 Jul; 12(7):e1006210. PMID: 19714218.
- Quan J., Tian J. (2009).** Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS One.* 4: e6441. doi: 10.1371/journal.pone.0006441. PMID: 19649325.
- Quan J., Tian J. (2011).** Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat Protoc.* 6: 242–51. doi: 10.1038/nprot.2010.181. PMID: 21293463.
- Quick M., Wright E. M. (2002).** Employing *Escherichia coli* to functionally express, purify, and characterize a human transporter. *PNAS.* 99: 8597–8601; doi: 10.1073/pnas.132266599. PMID: 12077304.
- Quilichini T. D., Grienenberger E., Douglas C. J. (2015).** The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: A tough case to crack. *Phytochemistry.* 113: 170–82. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.05.002. PMID: 24906292.
- Rabl R., Soubannier V., Scholz R., Vogel F., Mendl N., Vasiljev-Neumeyer A., Körner C., Jagasia R., Keil T., Baumeister W., *et al.*, (2009).** Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su e/g. *J. Cell Biol.* 185: 1047–1063. doi: 10.1083/jcb.200811099. PMID: 19528297.
- Rampelt H., van der Laan M. (2017a).** The yin & yang of mitochondrial architecture - interplay of MICOS and F1Fo-ATP synthase in cristae formation. *Microb. Cell,* 4: 236–239. doi: 10.15698/mic2017.08.583. PMID: 28845421.
- Rampelt H., Bohnert M., Zerbes R. M., Horvath S.E., Warscheid B., Pfanner N., van der Laan M. (2017b).** Mic10, a core subunit of the mitochondrial contact site and cristae organizing system, interacts with the dimeric F1Fo-ATP synthase. *J. Mol. Biol.* 429: 1162–1170. doi: 10.1016/j.jmb.2017.03.006. PMID: 28315355.
- Rampelt H., Zerbes R.M., van der Laan M., Pfanner N. (2017c).** Role of the mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics. *Biochim.*

Biophys. Acta Mol. Cell Res. 1864: 737–746. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.05.020. PMID: 27614134.

**Rampelt H., Wollweber F., Gerke C., de Boer R., van der Klei I. J., Bohnert M., Pfanner N., van der Laan M. (2018).** Assembly of the mitochondrial cristae organizer Mic10 is regulated by Mic26–Mic27 antagonism and cardiolipin. *J. Mol. Biol.* 430: 1883–1890. doi: 10.1016/j.jmb.2018.04.037. PMID: 29733859.

**Renvoise B., Malone B., Falgairolle M., Munasinghe J., Stadler J., Sibilla C., Park S.H., Blackstone C. (2016).** Reep1 null mice reveal a converging role for hereditary spastic paraplegia proteins in lipid droplet regulation. *Hum. Mol. Genet.* 25: 5111–5125, doi: 10.1093/hmg/ddw315. PMID: 27638887.

**Robichon C., Luo J., Causey T. B., Benner J. S., Samuelson J. C. (2011).** Engineering *Escherichia coli* BL21 (DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Appl Environ Microbiol.* 77: 4634–4646. doi: 10.1128/AEM.00119-11. PMID: 21602383

**Rosano G. L., Ceccarelli E. A. (2014).** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2014.00172. PMID: 24860555.

**Rosenbusch J.P., Lustig A., Grabo M., Zulauf M., Regenass M. (2001).** Approaches to determining membrane protein structures to high resolution: do selections of subpopulations occur? *Micron.* 32: 75–90. doi: 10.1016/s0968-4328(00)00021-4. PMID: 10900383.

**Salas J. J., Ohlrogge J. B. (2002).** Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. *Arch Biochem Biophys.* 403: 25-34. doi: 10.1016/S0003-9861(02)00017-6. PMID: 12061798.

**Salminen T.A., Blomqvist K., Edqvist J. (2016).** Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. *Plant.* 244: 971–997. doi: 10.1007/s00425-016-25854. PMID: 27562524.

**Sánchez M. I., Martínez-Costas J., Mascareñas J. L., Vázquez M. E. (2014).** MitoBlue: a nontoxic and photostable blue-emitting dye that selectively labels functional mitochondria. *ACS Chem Biol.* 9: 2742-7. doi: 10.1021/cb500552f. PMID: 25325672.

**Shockey J. M., Fulda M. S., Browse J. A. (2002).** *Arabidopsis* contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol.* 129: 1710-22. doi: 10.1104/pp.003269. PMID: 12177484.

**Shockey J. M., Fulda M. S., Browse J. (2003).** *Arabidopsis* contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme A synthetases. *Plant Physiol.* 132: 1065-76. doi: 10.1104/pp.103.020552. PMID: 12805634.

**Schein C. H., Noteborn M. H. M. (1988).** Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia coli* Is Favored by Lower Growth Temperature. *Bio/Technology*, 6: 291-294. doi: 10.1038/nbt0388-291.

- Schnurr J. A., Shockey J. M., de Boer G. J., Browse J. A. (2002).** Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129:1700-9. doi: 10.1104/pp.003251. PMID: 12177483.
- Schorr S., van der Laan M. (2018).** Integrative functions of the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Semin. Cell Dev. Biol.* 76: 191–200. doi: 10.1016/j.semcd.2017.09.021. PMID: 28923515.
- Schrul B., Kopito R.R. (2016).** Peroxin-dependent targeting of a lipid-droplet-destined membrane protein to ER subdomains. *Nat Cell Biol.* 18:740-51. doi: 10.1038/ncb3373. PMID: 27295553.
- Schwacke R., Schneider A., van der Graaff E., Fischer K., Catoni E., Desimone M., Frommer W. B., Flügge U. I., Kunze R. (2003).** ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol.* 131: 16–26. doi: 10.1104/pp.011577. PMID: 12529511.
- Schweiger R., Müller N. C., Schmitt M.J., Soll J. Schwenkert S. (2012).** AtTPR7 is a chaperone-docking protein of the Sec translocon in *Arabidopsis*. *J. Cell Sci.* 125: 5196-207. doi: 10.1242/jcs.111054. PMID: 22899711.
- Senthil-Kumar M., Mysore K. S. (2011).** Caveat of RNAi in Plants: The Off-Target Effect. *Methods Mol Biol* 744: 13-25. doi: 10.1007/978-1-61779-123-9\_2. PMID: 21533683.
- Somerville C., Browse J [J.] (1991).** Plant lipids: Metabolism, mutants, and membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 252: 80–87. doi: 10.1126/science.252.5002.80. PMID: 17739077.
- Song K., Jang M., Kim S.Y., Lee G., Lee G.J., Kim D.H., Lee Y., Cho W., Hwang I. (2012).** An A/ENTH domain-containing protein functions as an adaptor for clathrin-coated vesicles on the growing cell plate in *Arabidopsis* root cells. *Plant Physiol.* 159: 1013–1025. doi: 10.1104/pp.112.199380. PMID: 22635117.
- Strop P., Brunger A. T. (2005).** Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins. *Protein Sci.* 14: 2207–2211. doi: 10.1110/ps.051543805. PMID: 16046633.
- Suh M. C., Samuels A. L., Jetter R., Kunst L., Pollard M., Ohlrogge J., Beisson F. (2005).** Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis. *Plant Physiol.* 139: 1649-65. doi: 10.1104/pp.105.070805. PMID: 16299169.
- Tenagy, Park J. S., Iwama R., Kobayashi S., Ohta A., Horiuchi H., Fukuda R. (2015).** Involvement of acyl-CoA synthetase genes in n-alkane assimilation and fatty acid utilization in yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 15: fov031. doi: 10.1093/femsyr/fov031. PMID: 26019148.
- Theodoulou F. L., Kerr I. D. (2015).** ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem Soc Trans.* 43: 1033-40. doi: 10.1042/BST20150139. PMID: 26517919; PMCID: PMC4652935.
- Thiam A.R., Foret L. (2016).** The physics of lipid droplet nucleation, growth and budding. *Biochim. Biophys. Acta* 1861: 715–722, doi: 10.1016/j.bbalip.2016.04.018. PMID: 27131867.

- Tian Y., Lv X., Xie G., Zhang J., Xu Y., Chen F. (2018).** Seed-specific overexpression of At-FAX1 increases seed oil content in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 500:370-375. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.081. PMID: 29654768.
- Tian Y., Lv X., Xie G., Wang L., Dai T., Qin X., Chen F., Xu Y. (2019).** FAX2 mediates fatty acids export from plastid in developing *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell Physiol.* 60: 2231-2242. doi: 10.1093/pcp/pcz117. PMID: 31198959.
- Troncoso-Ponce M. A., Cao X., Yang Z., Ohlrogge J. B. (2013).** Lipid turnover during senescence. *Plant Sci.* 205-206:13-9. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.01.004. PMID: 23498858.
- Troncoso-Ponce M. A., Nikovics K., Marchive C., Lepiniec L., Baud S. (2016).** New insights on the organization and regulation of the fatty acid biosynthetic network in the model higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochimie*, 120: 3–8. doi: 10.1016/j.biochi.2015.05.013. PMID: 26025475.
- Tsukamoto Y., Wong H., Mattick J. S., Wakil S. J. (1983).** The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. IV. Mapping of active centers and model for the mechanism of action. *J Biol. Chem.* 258: 15312-22. PMID: 6654914.
- van der Laan M., Horvath S.E., Pfanner N. (2016).** Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 41: 33–42. doi: 10.1016/j.ceb.2016.03.013. PMID: 27062547.
- van Gisbergen P. A., Esseling-Ozdoba A., Vos J. W. (2008).** Microinjecting FM4-64 validates it as a marker of the endocytic pathway in plants. *J Microsc.* 231: 284-90. doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02041.x. PMID: 18778426.
- van Meer G., Voelker D. R., Feigenson G. W. (2008).** Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 112–124. doi:10.1038/nrm2330. PMID:18216768.
- Viotti C., Krüger F., Krebs M., Neubert C., Fink F., Lupanga U., Scheuring D., Boutté Y., Frescatada-Rosa M., Wolfenstetter S., Sauer N., Hillmer S., Grebe M., Schumacher K. (2013).** The endoplasmic reticulum is the main membrane source for biogenesis of the lytic vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 25:3434-49. doi: 10.1105/tpc.113.114827. PMID: 24014545.
- Voinnet O., Rivas S., Mester P., Baulcombe D. (2003).** An enhanced Transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33: 949-956. doi: 10.1046/j.1365-313x.2003.01676.x. PMID: 12609035.
- von Berlepsch S., Kunz H.H., Brodesser S., Fink P., Marin K., Flügge U. I., Gierth M. (2012).** The Acyl-Acyl Carrier Protein Synthetase from *Synechocystis* sp PCC 6803 Mediates Fatty Acid Import. *Plant Physiol.* 159: 606–617. doi: 10.1104/pp.112.195263. PMID: 22535424.
- Wan X., Wu S., Li Z., An X., Tian Y. (2020).** Lipid Metabolism: Critical Roles in Male Fertility and Other Aspects of Reproductive Development in Plants. *Mol Plant.* 13:955-983. doi: 10.1016/j.molp.2020.05.009. PMID: 32434071.
- Wang J., Huang Y., Fang M., Zhang Y., Zheng Z., Zhao Y., Su W. (2002b).** Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei*

and *Torreyia grandis*. FEMS Immun. Med. Microbiol. 34: 51– 57 doi: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00602.x. PMID: 12208606.

**Wang D.N., Safferling M., Lemieux J.M., Griffith H., Chen Y., Li X.-D. (2003).** Practical aspects of overexpressing bacterial secondary membranetransporters for structural studies. Biochim. Biophys. Acta. 1610: 23–36. doi: 10.1016/s0005-2736(02)00709-5. PMID: 12586376.

**Wang Z., Benning C. (2012a).** Chloroplast lipid synthesis and lipid trafficking through ER–plastid membrane contact sites. Biochem. Soc. Trans. 40: 457–463. doi: 10.1042/BST20110752. PMID: 22435830.

**Wang Z., Xu C, Benning C. (2012b).** TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. Plant J. 70: 614-23. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04900.x. PMID: 22269056.

**Wang Z., Anderson N. S., Benning C. (2013).** The phosphatidic acid binding site of the *Arabidopsis* trigalactosyldiacylglycerol 4 (TGD4) protein required for lipid import into chloroplasts. J Biol Chem. 288: 4763-71. doi: 10.1074/jbc.M112.438986. PMID: 23297418.

**Wang K., Froehlich J. E., Zienkiewicz A., Hersh H. L., Benning C. (2017).** A Plastid Phosphatidylglycerol Lipase Contributes to the Export of Acyl Groups from Plastids for Seed Oil Biosynthesis. Plant Cell. 29:1678-1696. doi: 10.1105/tpc.17.00397. PMID: 28687655.

**Wei L., Hubbard S. R., Hendrickson W. A., Ellis L. (1995).** Expression, characterization, and crystallization of the catalytic core of the human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain. J. Biol. Chem. 270: 8122–8130. doi: 10.1074/jbc.270.14.8122. PMID: 7713916.

**Weickert M. J., Doherty D. H., Best E. A., Olins P. O. (1996).** Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. Curr. Opin. Biotechnol. 7: 494–499. doi: 10.1016/s0958-1669(96)80051-6. PMID: 8939627.

**Wilkinson J. E., Twell D., Lindsey K. (1997).** Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: Implications for field release of transgenic plants. J. Exp. Bot. 48: 265–275. doi: 10.1093/jxb/48.2.265.

**White S. H., Wimley W. C. (1999).** Membrane protein folding and stability: physical principles. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28: 319–365. doi: 10.1146/annurev.biophys.28.1.319. PMID: 10410805.

**Winter D., Vinegar B. , Nahal H., Ammar R., Wilson G. V., Provart N. J. (2007).** An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. PLoS One. 2: e71. doi: 10.1371/journal.pone.0000718. PMID: 17684564.

**Wülfing C., Lombardero J., Plückthun A. (1994).** An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. J. Biol. Chem. 269: 2895– 2901. PMID: 8300624.

**Xu C., Fan J., Riekhof W., Froehlich J. E., Benning C. (2003).** A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in *Arabidopsis*. EMBO J. 22: 2370-9. doi: 10.1093/emboj/cdg234. PMID: 12743031.

- Xu C., Fan J., Froehlich J. E., Awai K., Benning C. (2005).** Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 17: 3094-110. doi: 10.1105/tpc.105.035592. PMID: 16199613.
- Yang Y., Strittmatter S. M. (2007).** The reticulons: a family of proteins with diverse functions. *Genome Biol.* 8: 234. doi: 10.1186/gb-2007-8-12-234. PMID: 18177508.
- Yeats T. H., Rose J. K. (2013).** The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol.* 163:5-20. doi: 10.1104/pp.113.222737. PMID: 23893170.
- Zanghellini J., Wodlei F., von Grunberg H. H. (2010).** Phospholipid demixing and the birth of a lipid droplet. *J. Theor. Biol.* 264: 952–961. doi: 10.1016/j.jtbi.2010.02.025. PMID: 20184900.
- Zick M., Rabl R., and Reichert A. S. (2009).** Cristae formation — linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1793: 5–19. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.06.013. PMID: 18620004.
- Zhao L., Katavic V., Li F., Haughn G. W., Kunst L. (2010).** Insertional mutant analysis reveals that long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), but not LACS8, functionally overlaps with LACS9 in *Arabidopsis* seed oil biosynthesis. *Plant J.* 6:1048-58. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04396.x. PMID: 21143684.
- Zhou, H. X., Cross, T. A. (2013).** Influences of membrane mimetic environments on membrane protein structures. *Annu. Rev. Biophys.* 42: 361–392. doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130326. PMID: 23451886.
- Zhu L., He S., Liu Y., Shi J., Xu J. (2020).** *Arabidopsis* FAX1 mediated fatty acid export is required for the transcriptional regulation of anther development and pollen wall formation. *Plant Mol Biol.* 104:187-201. doi: 10.1007/s11103-020-01036-5. PMID: 32681357.
- Zou Z., DiRusso C. C., Ctrnacta V., Black P. N. (2002).** Fatty acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Directed mutagenesis of FAT1 distinguishes the biochemical activities associated with Fat1p. *J Biol. Chem.* 277: 31062-71. doi: 10.1074/jbc.M205034200. PMID: 12052836.
- Zou Z., Tong F., Faergeman N. J., Borsting C., Black P. N., DiRusso, C. C. (2003).** Vectorial acylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Fat1p and fatty acyl-CoA synthetase are interacting components of a fatty acid import complex. *J Biol. Chem.* 278: 16414-22. doi: 10.1074/jbc.M210557200. PMID: 12601005.

## 10 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Schematisch vereinfachte Darstellung der Fettsäure/Lipid-Transportwege innerhalb der pflanzlichen Zelle. ....	5
<b>Abb. 2:</b> Schematische Darstellung des Aufbaus (A) und der Membran-Insertion (B) der vier Typen $\alpha$ -helicaler, amphiphiler Helices.....	12
<b>Abb. 3:</b> Schematische Darstellung der konservierten Motive innerhalb der Tmemb_14 Domäne des Proteins FAX1. ....	14
<b>Abb. 4:</b> Vereinfachte Darstellung des NICOMP DLS Instrumentes. ....	39
<b>Abb. 5:</b> Coomassie gefärbtes SDS-Gel (A) und Westernblot/Antikörperdetektion (B) der Zelllysateüberstände der Proteinexpression von mAt-FAX1/pBadMycHisA in BL21. ....	45
<b>Abb. 6:</b> Immunoblots der Zelllysate verschiedener Expressionsbedingungen von mAt-FAX1/pBadMycHisA in <i>E. coli</i> BL21.....	46
<b>Abb. 7:</b> Immunoblot der Zelllysate mAt-FAX1/pBadMycHisA in <i>E. coli</i> BL21 bei 24°C uninduziert und induziert nach 6h.....	47
<b>Abb. 8:</b> Coomassie gefärbte SDS-Gele, Immunoblot und Bestimmung der Proteinkonzentration nach Proteinaufreinigung von FAX1 aus <i>E. coli</i> Membranen. ....	48
<b>Abb. 9:</b> Coomassie gefärbtes SDS-Gel der optimierten Proteinaufreinigungsschritte von FAX1.....	50
<b>Abb. 10:</b> SEC-MALS Analyse von DDM-FAX1-Mizellen.....	51
<b>Abb. 11:</b> DLS-Analysen der DDM-FAX1-Mizellen. ....	53
<b>Abb. 12:</b> Schematische Darstellung der konservierten Motive innerhalb der Tmemb_14 Domäne der FAX-Proteine. ....	56
<b>Abb. 13:</b> Sequenzen der Temb_14 Domänen von FAX4 Proteinen in unterschiedlichen Landpflanzen. ....	58
<b>Abb. 14:</b> Funktioneller Transportassay der FAX-Proteine in <i>S.cerevisiae</i> .....	60
<b>Abb. 15:</b> Funktioneller Transportassay in Hefe zur Etablierung einer Wildtyp-Kontrolle.....	62
<b>Abb. 16:</b> <i>GFP-Targeting</i> von OM64, TPR7, FAX1, FAX4 und FAX7 in der Blattepidermis von <i>N. benthamiana</i> . ....	64
<b>Abb. 17:</b> <i>GFP-Targeting</i> von At-FAX5 und At-FAX6 in Wurzelgewebe stabil transformierter <i>Arabidopsis</i> keimlinge (T1). ....	66
<b>Abb. 18:</b> <i>GFP-Targeting</i> von At-FAX5 und At-FAX6 in Wurzelgewebe stabil transformierter <i>Arabidopsis</i> keimlinge (T1). ....	67
<b>Abb. 19:</b> <i>GFP-Targeting</i> von At-FAX5 (A) und At-FAX6 (B) in Wurzelgewebe stabil transformierter <i>Arabidopsis</i> keimlinge (T1) in Anwesenheit von Brefeldin A.....	68
<b>Abb. 20:</b> <i>GFP-Targeting</i> von At-FAX7 in Wurzelgewebe stabil transformierter <i>Arabidopsis</i> keimlinge (T1). ....	70
<b>Abb. 21:</b> <i>GFP-Targeting</i> von At-FAX5, At-FAX6 und At-FAX7 in Wurzelgewebe stabil transformierter <i>Arabidopsis</i> keimlinge (T1). ....	71

<b>Abb. 22:</b> Autoradiografie posttranslationaler <i>in vitro</i> Importstudien von radioaktiv markierten FAX-Proteinen in isolierten Hefemitochondrien und -mikrosomen. ....	73
<b>Abb. 23:</b> Autoradiografie posttranslationaler <i>in vitro</i> Importstudien von radioaktiv markierten FAX-Proteinen in isolierten Hefemikrosomen, unbehandelt (-) und gekocht (+)... ..	74
<b>Abb. 24:</b> Relativer Transkriptgehalt von <i>FAX4</i> in verschiedenen Entwicklungsstadien/Geweben der <i>FAX4</i> -RNAi Linien. ....	76
<b>Abb. 25:</b> Charakterisierung von T-DNA-Insertionslinien in <i>At-FAX4</i> (At1g33265).....	78
<b>Abb. 26:</b> Charakterisierung homozygoter T-DNA-Insertionslinien <i>fax4-1</i> , <i>fax4-2</i> und <i>fax4-3</i> auf Transkriptebene mittels RT-PCR. ....	79
<b>Abb. 27:</b> Phänotypische Analysen der <i>Knockout</i> linie <i>fax4-3</i> vergleichend zum Wildtyp. ....	80
<b>Abb. 28:</b> Expressions- und Segregationsanalysen der <i>fax4-3</i> Mutanten.....	81
<b>Abb. 29:</b> Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinie <i>fax7-2</i> (GK-863F12) in <i>At-FAX7</i> (At2g26240).....	82
<b>Abb. 30:</b> Charakterisierung der homozygoten T-DNA-Insertionslinie <i>fax7-2</i> (GK-863F12) #4 auf Transkriptebene mittels RT-PCR. ....	83
<b>Abb. 31:</b> Phänotypische Analysen der <i>fax7-2</i> #4 <i>Knockout</i> linie vergleichend zum Wildtyp Col-0.....	84
<b>Abb. 32:</b> Expressions- und Segregationsanalysen der <i>fax7-2</i> Mutanten. (A) Relativer Transkriptgehalt [%] der FAX-Proteine in den <i>fax7 Knockout</i> -Mutanten in <i>Arabidopsis</i> -Rosettenblättern (4 Wochen). ....	85
<b>Abb. 33:</b> Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinie <i>fax5-1</i> (SALK 202443) in <i>At-FAX5</i> (At1g50740).....	86
<b>Abb. 34:</b> Charakterisierung der homozygoten T-DNA-Insertionslinien <i>fax5-1</i> (SALK202443) auf Transkriptebene mittels RT-PCR. ....	87
<b>Abb. 35:</b> Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinie <i>fax6-1</i> (GK-138G06) in <i>At-FAX6</i> (At3g20510).....	88
<b>Abb. 36:</b> Charakterisierung der homozygoten T-DNA-Insertionslinie <i>fax6-1</i> (GK-138G06) #2 auf Transkriptebene mittels RT-PCR. ....	89
<b>Abb. 37:</b> Charakterisierung der homozygoten <i>fax5/fax6</i> Doppelmutanten auf Transkriptebene mittels RT-PCR. ....	91
<b>Abb. 38:</b> Phänotypische Analysen der <i>fax5/fax6</i> dm (ho/ho) vergleichend zum rücksegregierten Wildtyp <i>fax5/fax6</i> (wt/wt). ....	92
<b>Abb. 39:</b> Expressions- und Segregationsanalysen der <i>fax5-</i> und <i>fax6-</i> Einzelmutanten, sowie <i>fax5/fax6</i> Doppelmutanten.....	93
<b>Abb. 40:</b> Betrachtung der Befruchtung, Schoten- und Samenentwicklung des rücksegregierten Wildtypes ( <i>fax5/fax6</i> wt/wt) und der <i>fax5/fax6</i> dm ( <i>Knockout</i> ho/ho).....	95
<b>Abb. 41:</b> Schematische Darstellung des vorhergesagten Topologie- und Funktionsmodelles der Membranproteine FAX1 und FAX5/6. ....	106
<b>Abb. 42:</b> Schematisch vereinfachte Darstellung der Fettsäure/Lipid-Transportwege innerhalb der pflanzlichen Zelle vermittelt durch FAX-Proteine.....	121
<b>Abb. 43:</b> Schematische Darstellung des Hefe-Expressionsvektors pPICZA-GFP (4098bp). ...	151

<b>Abb. 44:</b> Schematische Darstellung des <i>E. coli</i> – Expressionsvektors pBAD/Myc-His A (4094 pb). .....	152
<b>Abb. 45:</b> Coomassie gefärbtes SDS-Gel nach Proteinaufreinigung von FAX1 aus <i>E. coli</i> Membranen.....	152
<b>Abb. 46:</b> Elutionsprofil der Gelfiltration mittels Größenausschlusschromatografie des aufgereinigten FAX1 Proteines.....	153
<b>Abb. 47:</b> Coomassiegel (A) und Immunoblot (B) der optimierten Proteinaufreinigungsschritte (reduzierte Menge an Nickelbeads) von FAX1 nach Membranisolation aus <i>E. coli</i> BL21.....	154
<b>Abb. 48:</b> Grafische Darstellung der SEC-MALS-Analysen für DDM-Mizellen (A) und DDM-Mizellen mit FAX1 (B). .....	155
<b>Abb. 49:</b> Coomassiegel der entsprechenden Fraktionen von DDM-Mizellen mit FAX1 nach SEC-MALS-Analyse.....	156
<b>Abb. 50:</b> <i>Helical Wheel</i> Analysen der vier vorhergesagten $\alpha$ -Helices in der Tmemb_14 Domäne der FAX-Proteine FAX4 (A) und FAX7 (B), sowie die erstellten Konsensussequenzen (C). .....	159
<b>Abb. 51:</b> Alignment der Sequenzen von FAX7 in unterschiedlichen Landpflanzen.....	160
<b>Abb. 52:</b> Alignment der Sequenzen von FAX4 in unterschiedlichen Landpflanzen.....	162
<b>Abb. 53:</b> Schematische Darstellung des Hefevektors pDR195 (6305 bp). .....	163
<b>Abb. 54:</b> Wachstum von transformierten fat1 (A) und faa1/4 (B) Zellen in SC-ura-Flüssigmedium.....	164
<b>Abb. 55:</b> Wachstumsverlauf der Wildtyp-Kontrollen in Hefeassay. ....	165
<b>Abb. 56:</b> <i>GFP-Targeting</i> von FAX5, FAX6 und FAX7 in Blattepidermis von <i>N. benthamiana</i> . .....	166
<b>Abb. 57:</b> Schematische Darstellung des Vektors pH7GWIWG2 (A) und des resultierenden <i>Hairpin</i> PCR Fragmentes (B) zur Erstellung der RNAi-Mutanten. ....	167
<b>Abb. 58:</b> Nachweis des FAX4-RNAi Konstruktes in den FAX4-RNAi Linien #1 - #7. ....	167
<b>Abb. 59:</b> Keimungsanalyse der FAX4-RNAi Linien #1-#7 und der <i>fax7 Knockout</i> -Mutante im Vergleich zum Wildtyp Col-0. ....	168
<b>Abb. 60:</b> Auswertung der Phänotypisierung auf Erde der FAX4-RNAi Linien #1-#7 im Vergleich zum Wildtyp Col-0. ....	169
<b>Abb. 61:</b> Phänotypische Analysen der FAX4-RNAi Linien #1 - #7 vergleichend zum Wildtyp Col-0. ....	170
<b>Abb. 62:</b> Phänotypische Analysen der <i>fax5</i> und <i>fax6</i> Einzelmutanten vergleichend zum rücksegregierten Wildtyp <i>fax5/fax6</i> (wt/wt). .....	172

## 11 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Verwendete Geräte, sowie deren Hersteller. ....	16
<b>Tab. 2:</b> Verwendete Chemikalien, sowie deren Hersteller. ....	17
<b>Tab. 3:</b> Verwendete Kits, sowie deren Hersteller. ....	20
<b>Tab. 4:</b> Verwendete T-DNA-Insertionslinien. ....	20
<b>Tab. 5:</b> Detailliert Übersicht der verwendeten Mutationslinien.....	21
<b>Tab. 6:</b> Auflistung der erstellten oder verwendeten Vektorkonstrukte. ....	22
<b>Tab. 7:</b> Liste der verwendeten Hefestämme.....	23
<b>Tab. 8:</b> Verwendete Oligonukleotidprimer. ....	24
<b>Tab. 9:</b> Standard-PCR-Programm. ....	30
<b>Tab. 10:</b> Verwendetes PCR-Programm.....	31
<b>Tab. 11:</b> Verwendete Antibiotika und deren Endkonzentration im Medium.....	33
<b>Tab. 12:</b> Zusammenfassende Tabelle der FAX-Proteinfamilie in <i>Arabidopsis</i> . ....	54
<b>Tab. 13:</b> Übersicht der Kreuzung zur Erstellung von <i>Arabidopsis</i> -Doppelmutanten.....	90
<b>Tab. 14:</b> Übersichtstabelle der Doppelmutantenkreuzung, sowie der resultierenden F1 Linien der <i>fax5/fax6</i> dm und die vermehrten Pflanzen aus F2 von Linie <i>fax5/fax6</i> dm #14 und #30 mit Genotyp.....	171

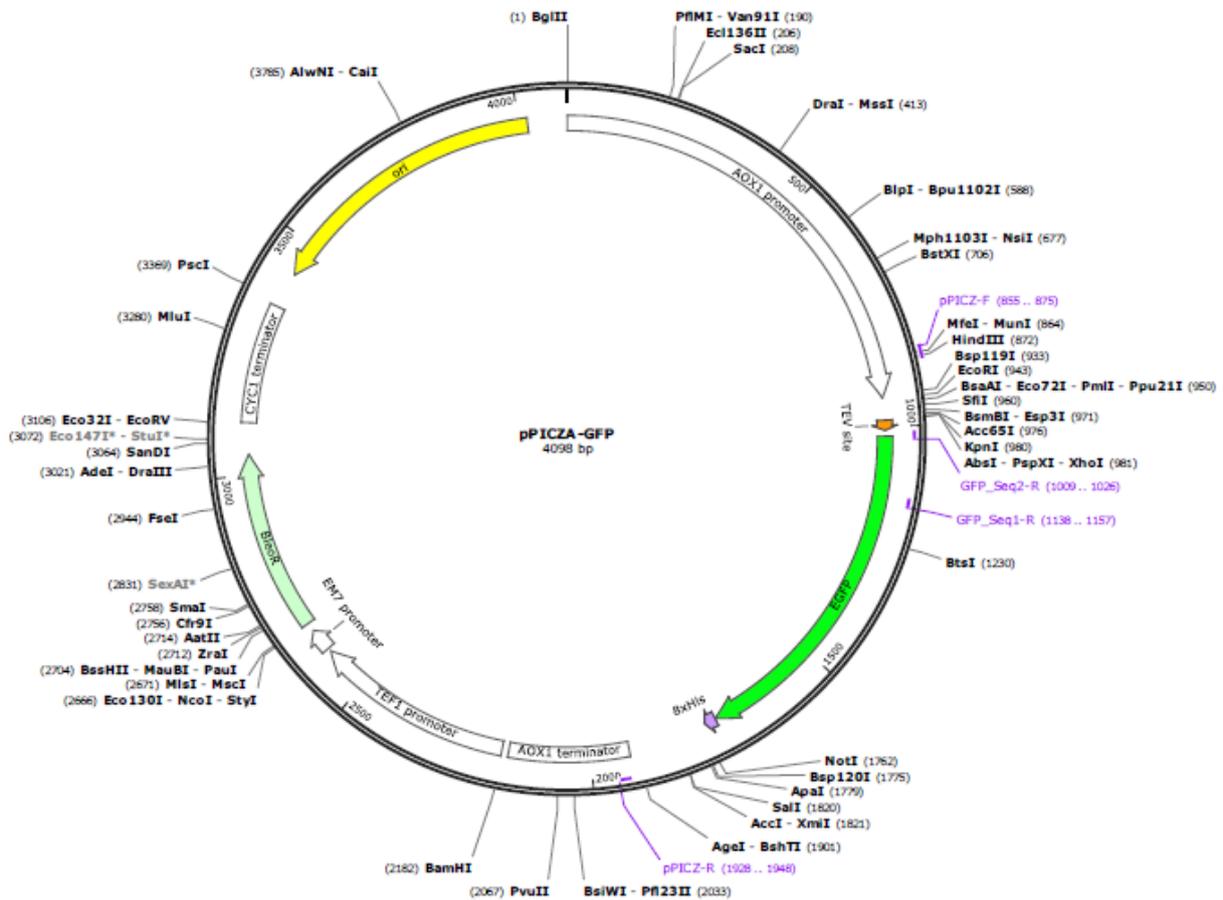
**12 Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-Binding-Cassette</i>
ACBP	Acyl-Carrier-Binding-Protein
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ALPS	<i>ArfGAP1 lipid packing sensor</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaar
<i>Br</i>	<i>Brassica rapa</i>
C16:0	Palmitinsäure
C18:0	Stearinsäure
C18:1	Ölsäure
C18:3	Linolsäure
CCCP	Carbonylcyanid-m-Chlorphenylhydrazon
cDNA	komplementäre (copy-) DNA
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
CMC	<i>Critical Micellar Concentration</i>
CoA	Coenzym A
Col-0	Columbia-0 ( <i>Arabidopsis</i> Ecotyp)
CPEC	<i>Circular Polymerase Extension Cloning</i>
CT	C-Terminus
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cTP	chloroplastidäres Transidpeptid
CurT1	<i>Curvature in Thylkoids 1</i>
<i>Dc</i>	<i>Dacus carota</i>
dd	doppelt destilliert
DDM	n-Dodecylmaltosid
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
DLS	dynamische Lichtstreuung/ <i>Dynamic Light Scattering</i>
dm	Doppelmutante
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	frühe Endosomen/ <i>early Endosomes</i>

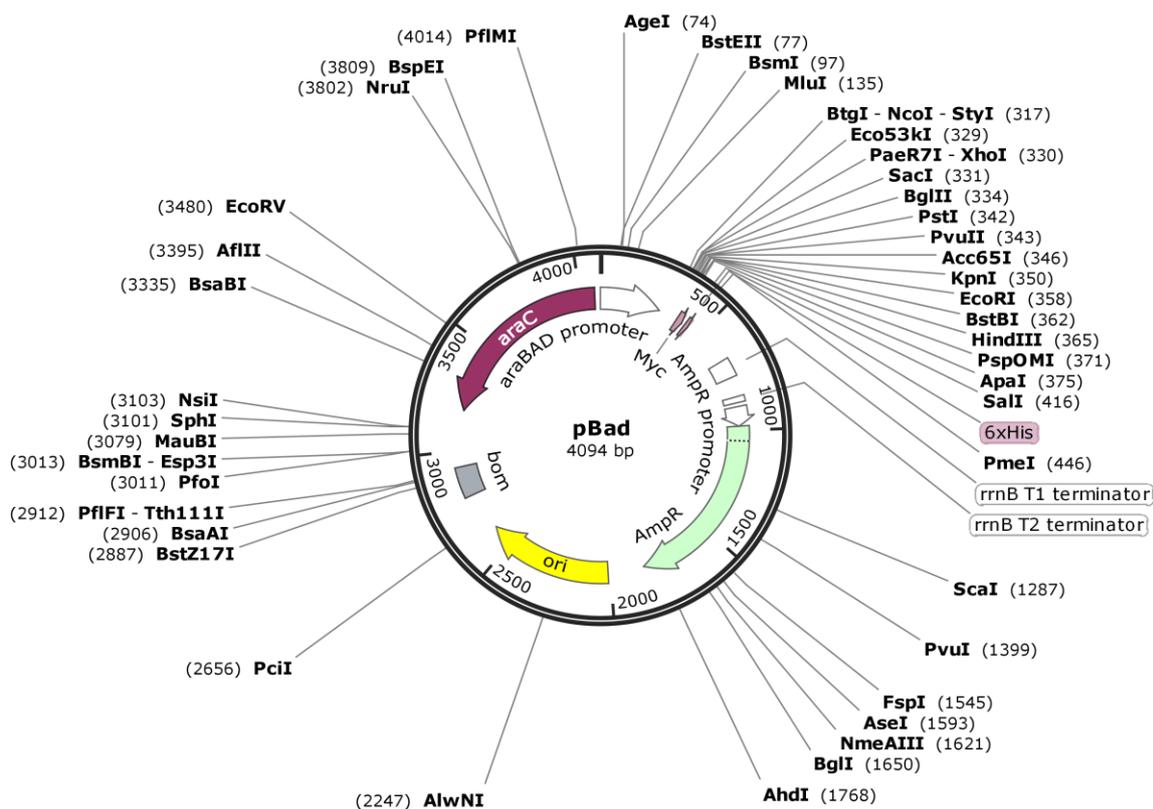
ENTH	Epsin N-terminal Homologie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FA	Fettsäure ( <i>fatty acid</i> )
Faa1/4p	Protein für Fettsäureaktivierung ( <i>fatty acid activation</i> )
FACS	<i>Fatty Acyl-CoA Synthetase</i>
FAS	<i>Fatty acid synthesis</i> /Fettsäuresynthese
Fat1p	Protein für Fettsäuretransport ( <i>fatty acid transport</i> )
FATA/B	Acyl-ACP-Thiosterase A/B
FAX	Fettsäureexporter ( <i>fatty acid exporter</i> )
FAX1-7	<i>Fatty Acid Exporter 1-7</i>
FFA	<i>Free Fatty Acids</i> /freie Fettsäuren
Fv	<i>Fragaria vesca</i>
gDNA	genomische DNA
GFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
HCl	Chlorwasserstoff
he	heterozygot
ho	homozygot
IE	innere Chloroplastenhüllmembran ( <i>inner envelope</i> )
IgG	Immunglobulin G
IMS	<i>Inter Membrane Space</i> /Intermembranraum
IM	Innere Mitochondrienmembran
kDa	Kilodalton
LACS	<i>Long-Acyl-CoA-Synthetase</i>
LD	Ölkörper oder Lipidtropfen ( <i>Lipid droplet</i> )
LiOAc	Lithiumacetat
LiPEG	Lithium-Polyethylenglycerol
LiSorb	Lithium-Sorbitol
LPS	<i>lipid packing sensor</i>
mat	matur
MCS	<i>Membrane Contact Sites</i>
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure
MGDG	Monogalaktosyl-Diacyl-Glycerol
MICOS	<i>mitochondrial contact site and cristae organizing system</i>
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MTL	<i>mitochondrial transmembrane lipoprotein</i>
MTS	<i>Mitochondrial Targeting Signal</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NT	N-Terminus
OD	Oberflächendichte
OE	äußere Hüllmembran ( <i>outer envelope</i> )

Os	<i>Oryza sativa</i>
PA	<i>Phosphatidic acid</i> / Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pb	<i>Pyrus bretschneideri</i>
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamine
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PIC1	<i>permease in chloroplasts 1</i>
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pp	<i>Physomitrium patens</i>
Pt	<i>Populus trichocarpa</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein ( <i>red fluorescent protein</i> )
RHD	<i>Reticulon Homology Domain</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SEC-MALS	<i>Size-Exclusion-Chromatography-Multi-Angle-Light-Scattering</i>
Sm	<i>Selaginella moellendorffii</i>
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerol
Tab.	Tabelle
TAG	Triacylglycerol
T-DNA	Transfer-DNA
TGD	Trigalactosyldiacylglycerol
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTR	untranslatierter Bereich ( <i>untranslated region</i> )
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein ( <i>yellow fluorescent protein</i> )
Zm	<i>Zea mays</i>

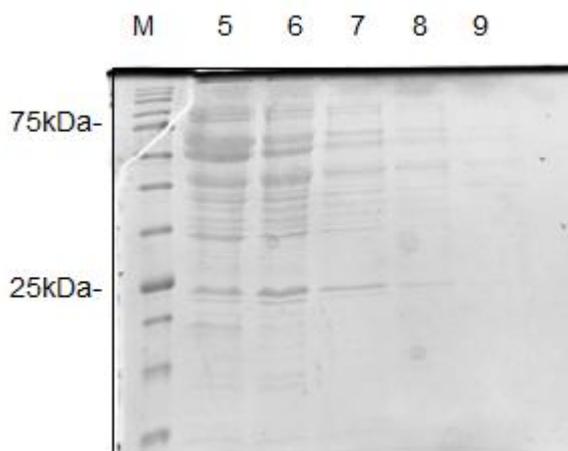
## 13 Anhang



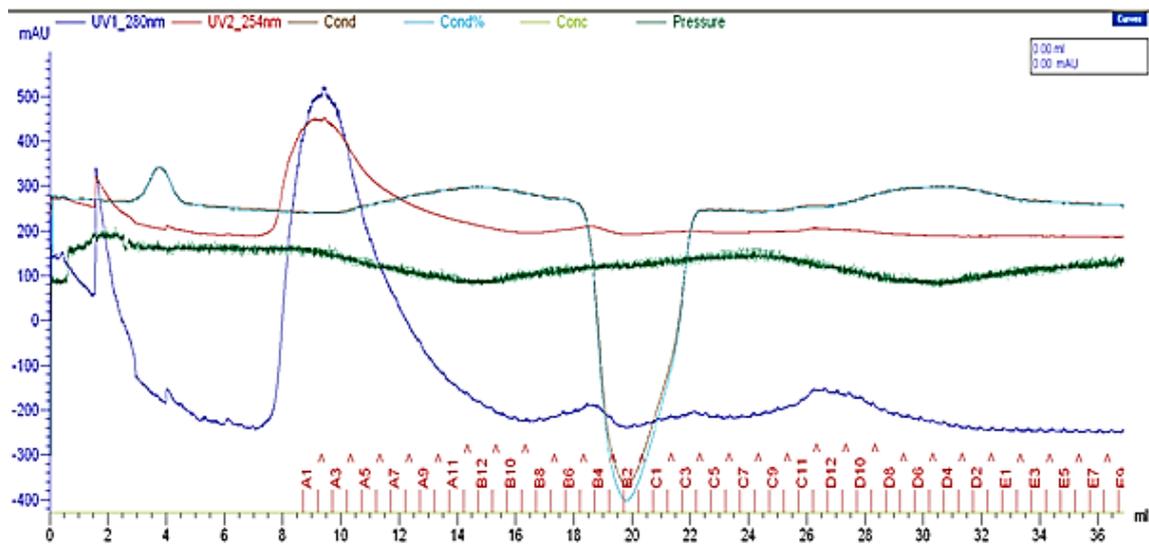
**Abb. 43: Schematische Darstellung des Hefe-Expressionsvektors pPICZA-GFP (4098 bp).** Dargestellt sind Promotoren, Terminator, Origin of Replication (ori), Resistenzen (Zeocin (BleoR)) sowie Enzymschnittstellen (schwarz) und Primerbindestellen (lila). TEV: Schnittstelle der Protease. EGFP: Sequenz des eukaryotischen GFPs. Zahlen stellen Position in der Basenabfolge dar.



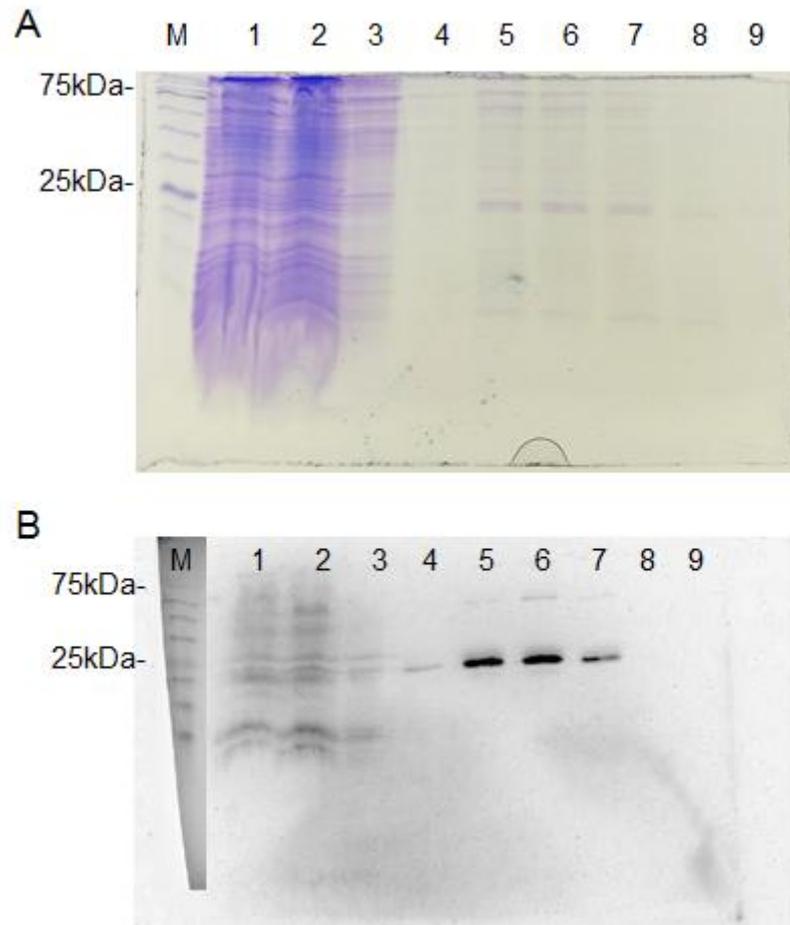
**Abb. 44: Schematische Darstellung des *E. coli* – Expressionsvektors pBAD/Myc-His A (4094pb).** Dargestellt sind Promotor, Terminator, Origin of Replicatin (*ori*), sowie Enzymschnittstellen innerhalb der *multiple cloning site* (MCS). Vermittelte Ampicillin-Resistenz. Myc und His-Tag hinter MCS. Zahlen stellen Position in der Basenabfolge dar betreffend die Version A des Vektors.



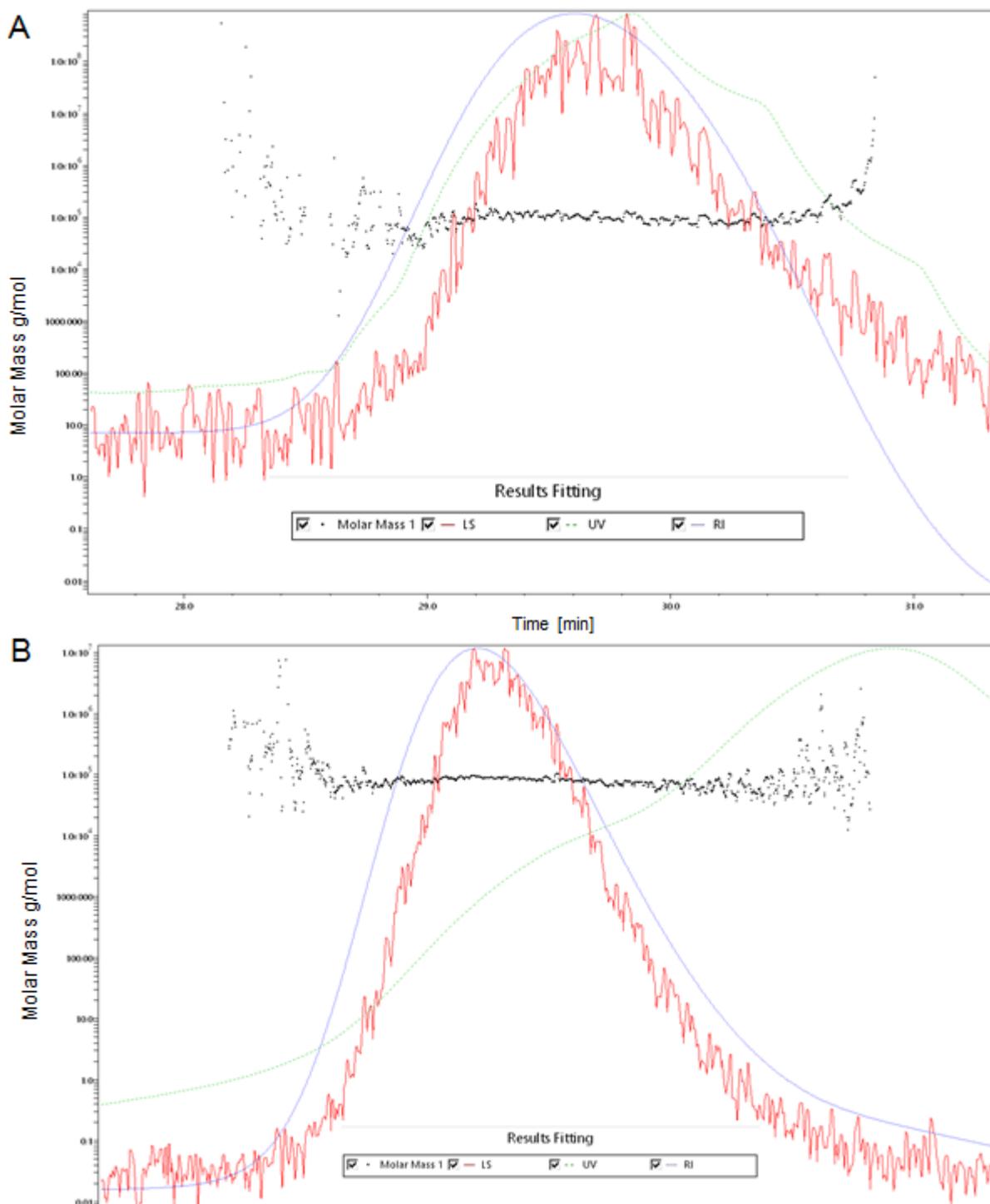
**Abb. 45: Coomassie gefärbtes SDS-Gel nach Proteinaufreinigung von FAX1 aus *E. coli* Membranen.** Ladekontrolle zu Abb. 8, B. 5: Eluat mit 100mM Imidazol. 6: Eluat mit 250mM Imidazol. 7: Eluat mit 500mM Imidazol. 8: Eluat mit 1M Imidazol. 9: Eluat mit 1M Imidazol zum zweiten Mal. Marker: FroggaBio BLUelf Prestained Proteinladder, 5µl geladen.



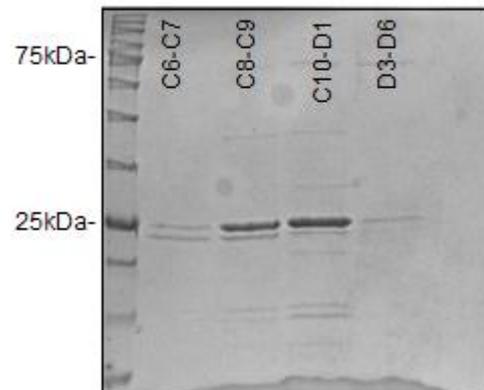
**Abb. 46: Elutionsprofil der Gelfiltration mittels Größenausschlusschromatografie des aufgereinigten FAX1 Protein.** Gezeigt sind Absorptionsspektren bei 280nm (blau) und 254nm (rot), sowie der Druck innerhalb der Säule (grün). Gemessen wurde in mAU (milli-Absorption-Unit) (Y-Achse), zur jeweiligen Durchflussrate in ml und der entsprechenden Sammelfraktion des Durchflusses (A1-E9) (X-Achse).



**Abb. 47: Coomassiegel (A) und Immunoblot (B) der optimierten Proteinaufreinigungsschritte (reduzierte Menge an Nickelbeads) von FAX1 nach Membranisolation aus *E. coli* BL21.** Proteinaufreinigungsschritte (Säulendurchfluss). 1+2: homogenisierte Membranen nach 1 h Inkubation mit Ni-NTA-Agarosebeads (pro 50 ml 1 ml Beads). 3: Eluat nach einem Säulenvolumen Waschpuffer mit 40 mM Imidazol. 4: Eluate nach zwei Säulenvolumen Waschpuffer mit 20 mM Imidazol. 5: Eluate mit 100 mM Imidazol. 6: Eluate mit 250 mM Imidazol. 7: Eluate mit 500 mM Imidazol. 8: Eluate mit 1 M Imidazol. 9: Eluate mit 1 M Imidazol. Marker: ROTI Mark Triocolor prestained, 5µl geladen.



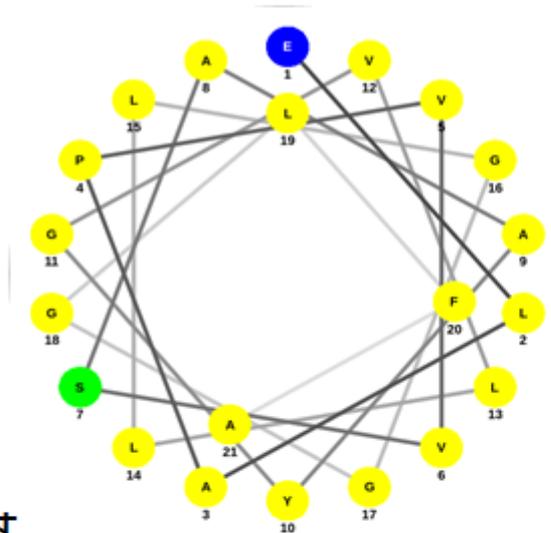
**Abb. 48: Grafische Darstellung der SEC-MALS-Analysen für DDM-Mizellen (A) und DDM-Mizellen mit FAX1 (B).** Gezeigt sind Berechnung der Molekularen Masse (y-Achse, schwarz), Messung der Lichtstreuung (LS, rot), Messung der UV-Absorption bei 280 nm (blau) und Lichtbrechungsindex RI (grün) entsprechend der Zeit in min (x-Achse). Screenshot der Programmanzeige.



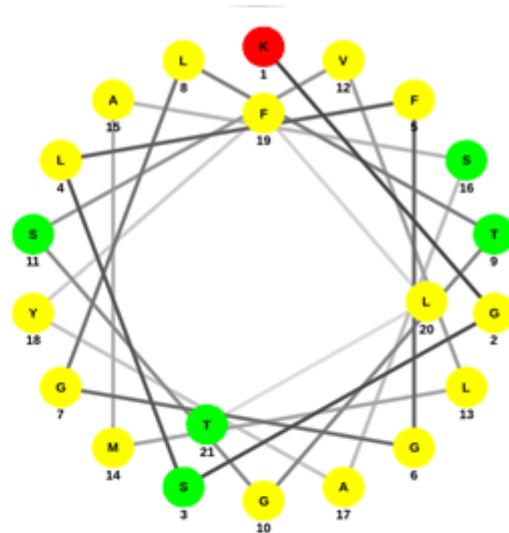
**Abb. 49: Coomassiegel der entsprechenden Fraktionen von DDM-Mizellen mit FAX1 nach SEC-MALS-Analyse.** Aufgetragen wurden Fraktionen von ca. 14 – 20 ml Chromatografiesäulendurchfluss welche im UV-Absorptionsspektrum bei 280 nm einen Peak aufwiesen. C6-C7: Fraktion entsprechend 14-15 ml, C8-C9: Fraktion entsprechen 15-16 ml, C10-D1: Fraktion entsprechend: 16-17 ml, D3-D6: Fraktion entsprechend 18-20 ml. Aufgetragen wurden je 20  $\mu$ l Probe. Marker: FroggaBio BLUelf Prestained Proteinladder, 5  $\mu$ l geladen.

A

Helix 1

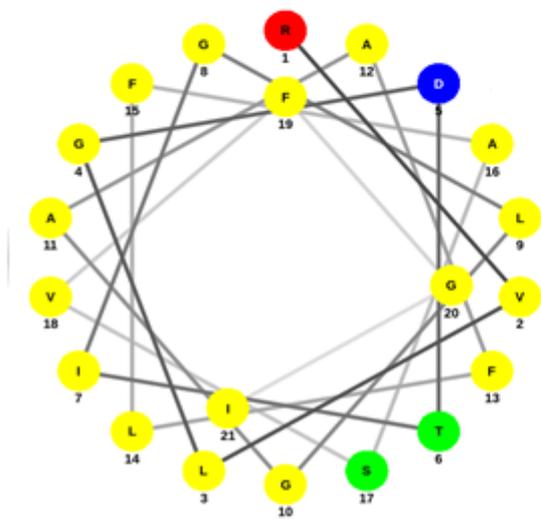


Helix 2

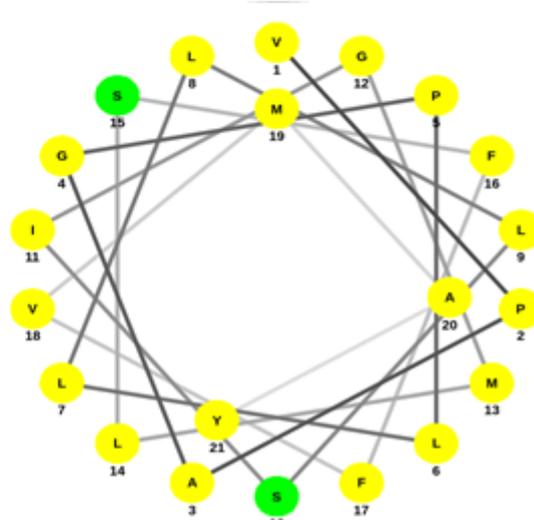


FAX4

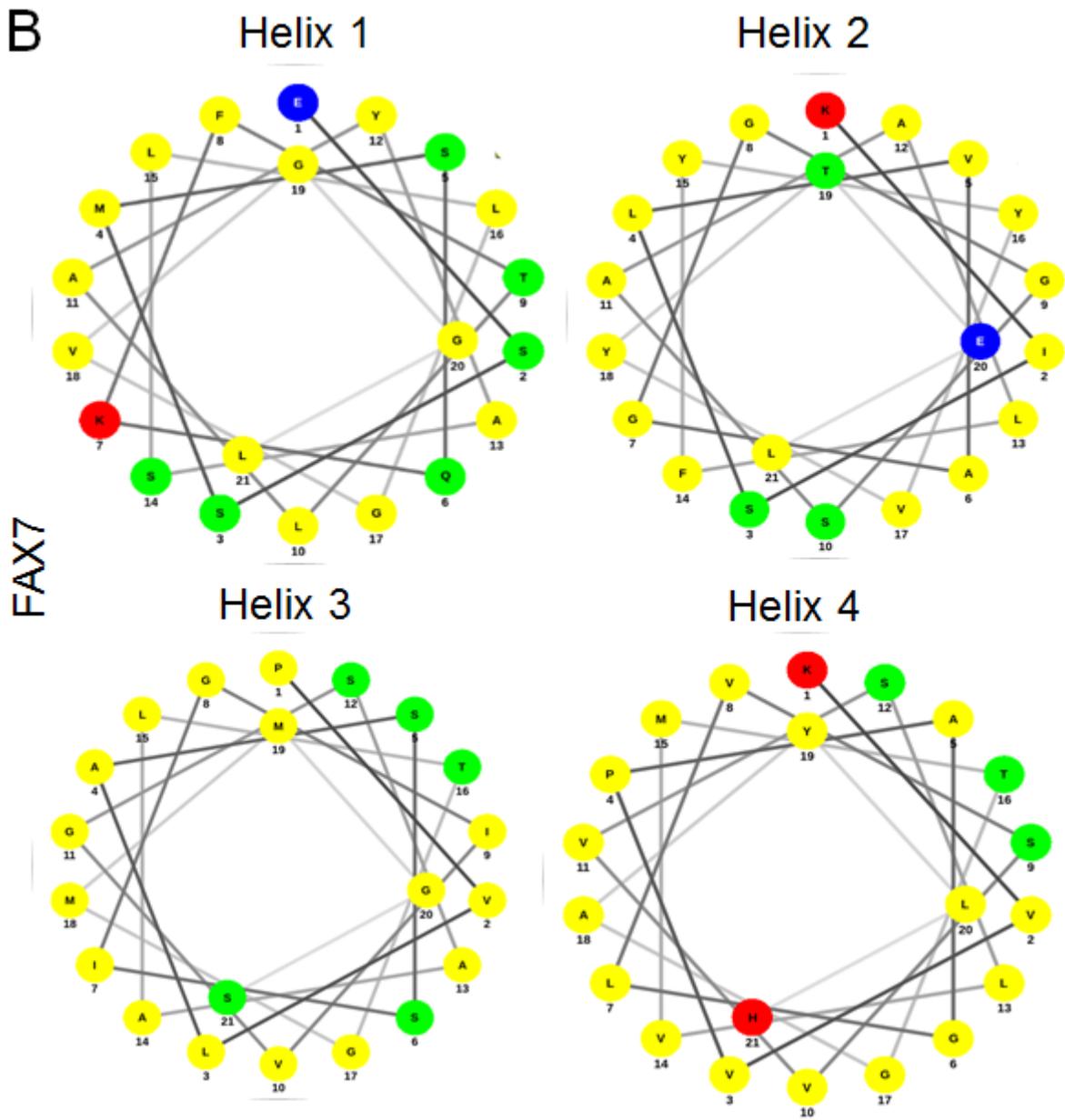
Helix 3



Helix 4



B



C

Consensus FAX4:

ELAPVTSAAYGVLLLGGGLFAYSKSGSKGSLFGGLTGSVLMASAYFLTQSPE  
 TRVLGDTIGFGAAFLFASVFGIRLASSRKPVPAGPLLLSIGMLSFVMAYMHD  
 SLPASIPDPLPLP

Consensus FAX7:

MESSMSQKFTLAYASLLGVGGLMGYLKRGSKISLVAGGGSAALFYVYTELPGN  
 PVLASSIGIVGSAALTGMMGSRYLRTKVVPAGLVSVVSLVMTGAYLHGLIRSS

**Abb. 50: Helical Wheel Analysen der vier vorhergesagten  $\alpha$ -Helices in der Tmemb\_14 Domäne der FAX-Proteine FAX4 (A) und FAX7 (B), sowie die erstellten Konsensussequenzen (C).** Helical Wheels wurden mit der NetWheels Software ((Mól *et al.*, 2018) erstellt; Settings:  $\alpha$ -helix mit 3.6 Aminosäureresten pro Helixturn). Verwendet wurden die jeweiligen Konsensussequenzen, der identifizierten pflanzlichen FAX Proteine. Lücken in der Konsensussequenz wurden mit der *Arabidopsis* Sequenz gefüllt (rot). verwendete Aminosäuresequenz der Helices gelb unterlegt. Aminosäuren mit positiver Ladung (rot), negative Ladung (blau), polar, ungeladen (grün), hydrophob (gelb).

```

                *           20           *           40           *
At : --MDSLSQKFTLAYASLLGVGGIMGYLKRGSKISLVAGGSAALFYVYVTELEFG : 53
Br : --MESSMSQKFTLVYASLLGVGGIMGYLKRGSKISVVAGGSAALFYVYKELPE : 53
Zm : MGHFISMSQKISLAYAALVCGAGGVMGYMKSGSQKSLGAVGTSAMVIYFVYIQLEV : 55

                60           *           80           *           100           *
At : NPVLASSIGIVGSAAITGMMGSRYLRTKVVVPAGLVSVVSLVMTGAYLHGLIRSS : 108
Br : NPVLASSIGIVGSAAITGMMGSRYLRTKVVVPAGVVSVMVSLVMTGAYLHGLIRSS : 108
Zm : RPFVASSIGLIGISGRASVGDGVALQEVREDVERLPAGVVSLVSLIAFELIDSRGQ : 110

                120           *           140           *
At : ----- : -
Br : ----- : -
Zm : SYDGTTENMVRHSITSGQRSINVTKSTGVAVRYAVLRNPLQNTT : 154

```

**Abb. 51: Alignment der Sequenzen von FAX7 in unterschiedlichen Landpflanzen.** Aminosäuren entsprechend ihrer Position im Präprotein nummeriert, *At-FAX7* (At2g26240). Konservierte Aminosäurereste in schwarz (100 %), dunkelgrau (50 %) und hellgrau (25 %). *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Br*, *Brassica rapa*; *Zm*, *Zea mays*. Aminosäuren im Einbuchstabencode.

```

      *      20      *      40      *
At : ~~~~~MWSLALTLPS : 10
Br : ~~~~~MSSFVLKLIHI : 10
Dc : ~~~~~MMVCSASSVSVCTLYKHQP : 19
Fv : MILFLNYLCNLEWRVGVCIPTQVQKLTAMMASATLSFSRVCFSSQHHSTIPRPKS : 55
Pt : ~~~~~MSCSFLLIPTKFTLN : 16
Pb : ~~~~~MSSYTLHLASPA--TRNCLYEHRRIPTFKS : 29
Os : ~~~~~MTAPVTTTTSSLLLLHH : 17
Zm : ~~~~~MLALMTTSSAFSA : 13
Sm : ~~~~~ : -
Pp : ~~~~~MASMYATFATSAKCS : 16

      60      *      80      *      100      *
At : ESLVSVRSTKL-GRSVSNGGRNWSGLTKLSEKSKTKR-----GNGLICCKAE- : 55
Br : ESVVSVRNTKLPGRSVSDCGRNWSGLP----KSKSRR-----GNGLICCKAE- : 52
Dc : LLLHHPEQPKTPRRPFQLGISVKKTTISISYITKPHHHN-----SSRFRCSTSL : 68
Fv : SHAFSNPNEFRCDFIAGNNAISLRTRPTKAASNPRRR-----FSCTSN- : 98
Pt : SYSKHINSTALLGFSSFSCLRNRRRNSIATLSLRGR-----SLGCKCQ- : 60
Pb : E-AFSNPHEFRCDYAAGNLLAASNTSFKAVPKTHRR-----RFSCSTSQ- : 72
Os : EAAAIRSLPSPF-----RPSAVARPGRSRR-----RALLRCSA-- : 50
Zm : ELLSFRPPRLPINRL-----RLHPRR-----HALFRCA-- : 43
Sm : ~~~~~RKRR-----IDALRCRAG- : 13
Pp : ECAATEFRARNAAASCFFEGQRLVLKSSFAGEQVFSFSKRQEITSVGVRNRAPTAS : 71

      120      *      140      *      160
At : LSELAPVVSATYGVILLGGGLFAYSKSGSKGSLFGGLTGSVLMASAYFLTKSPET : 110
Br : LSELAPAVSAGYGVILLGGGLFAYSKSGSKGSLFGGLTGSVLMASAYFLTKSPET : 107
Dc : TSEIAPVASAAYGVILLGGGLFAYTRTQSKGSLFGGLTGAALMGTAAYFLMQAHD : 123
Fv : LAEYACTTSAYVGFILLSGGFFAYTRTQSKGSLFGGLTGAALMGTAAYFLMQKPE : 153
Pt : LADIAPVTSAAAYGVILLGGGLFAFSKSGSKGSLFGGLTGAALMGTAAYFLMQAPE : 115
Pb : LAEMAPATSAYVGFILLSGGFFAFSRTGSKGSLFGGLTGAALMGTAAYFLMQPET : 127
Os : VSELAPTASAAAYGAILLGGGAFAYVRSKSGSIFGGLSGSALMGIAAYFLMQSPET : 105
Zm : VSEIAPAASAAAYGVILLGGGAFAYVRSKSGSIYGGIAGAALMGAAAYFLMQSPET : 98
Sm : LEEIAPATAAAYGILLSGGFFAYVRSKSGSIFGGITGGIAFAVAYLLMLNPD : 68
Pp : LNDYAPLTAAYVGSALLGGGLIYAYTRTGSTSSIGGGITGGIALGVAFILMQVPE : 126

```

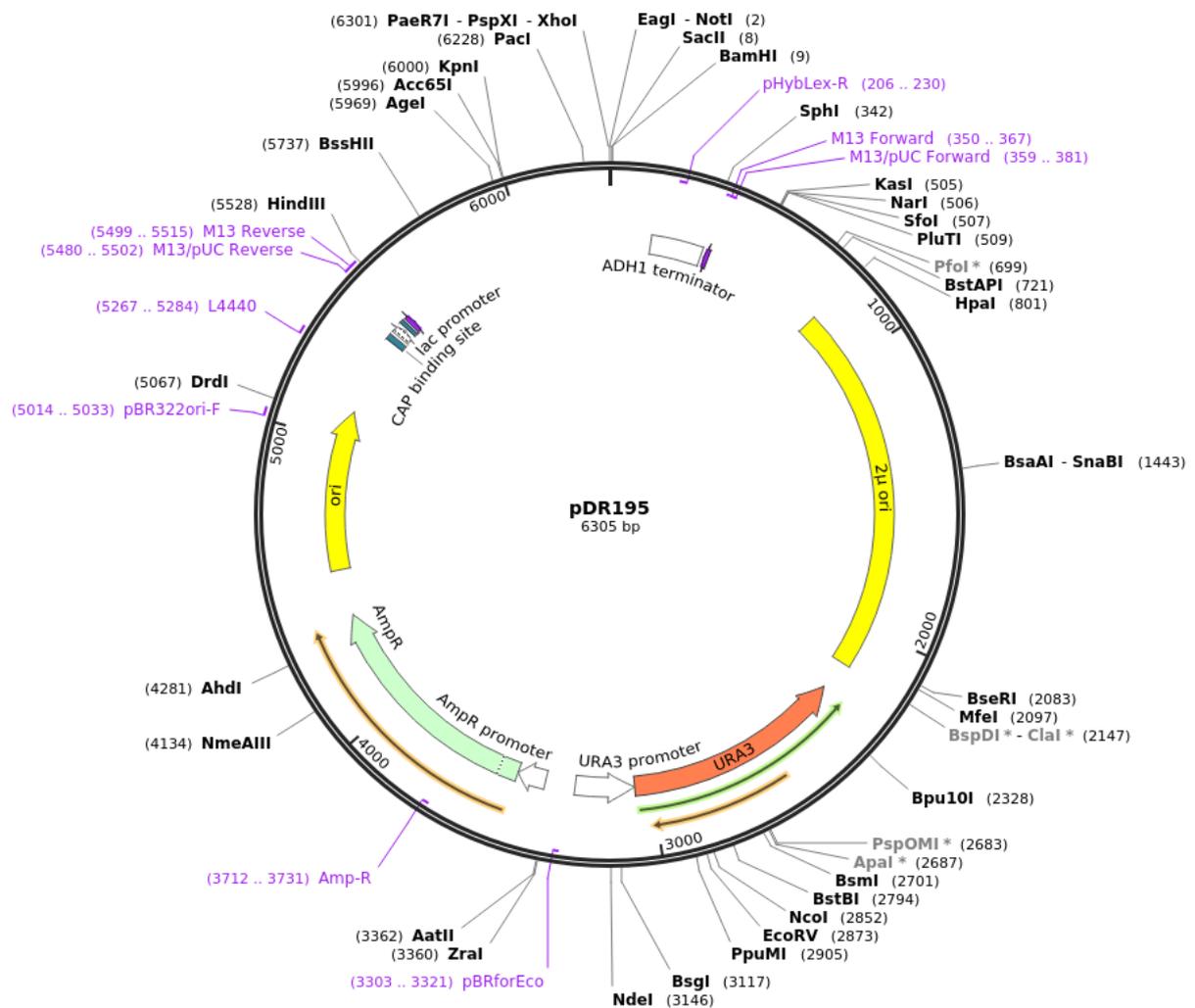
```

      *           180           *           200           *           220
At : EVLGDTIGLGAFLFSSVFGFRLASSRKPVPAGPLLILLSTGMISFFVMAYMHDSL : 165
Br : EVLGDTIGLGAFLFSSVFGFRLASSRKPVPAGPLLILLSTAMLSFFVMAYMHDSL : 162
Dc : QELGEALAFGSAFLFASVFGIRLAATRQIVPAGPLLALSICALVLFSLAYLQGTV : 178
Fv : EALGDALGFSGAFLFASVFGIRLAATRQIVPAGPLLALSICALAVFITAYLQDSV : 208
Pt : KAIGDSLGFSGAFLFSSVFGIRLAATCKLIHSGILLIGLSTICALAVFITAYLQDSL : 170
Pb : KAIGDALGFSGAFLFASVFGIRLAATCKLIHSGILLALSICALAVFITAYLKDSV : 182
Os : KALGDAVGFSGAFLFASVFGIRLYNTRKLVHSGILLVLSICALGVFYSAYMQDKV : 160
Zm : MLAGDAVGFSGAFLFACVFGIRLYNSRKLHSGILLALSICALGVFYSAYLQDKV : 153
Sm : KDLANAIGFGVAFLFIIVFGIRLAATRQPIHSGILLALSICALGVFYSAYLQDKV : 119
Pp : RDLGEAVGFSGAFLFVAIFAIRLASTGKPVHSGPELLIGLSAATSVIFALSYLETRV : 181

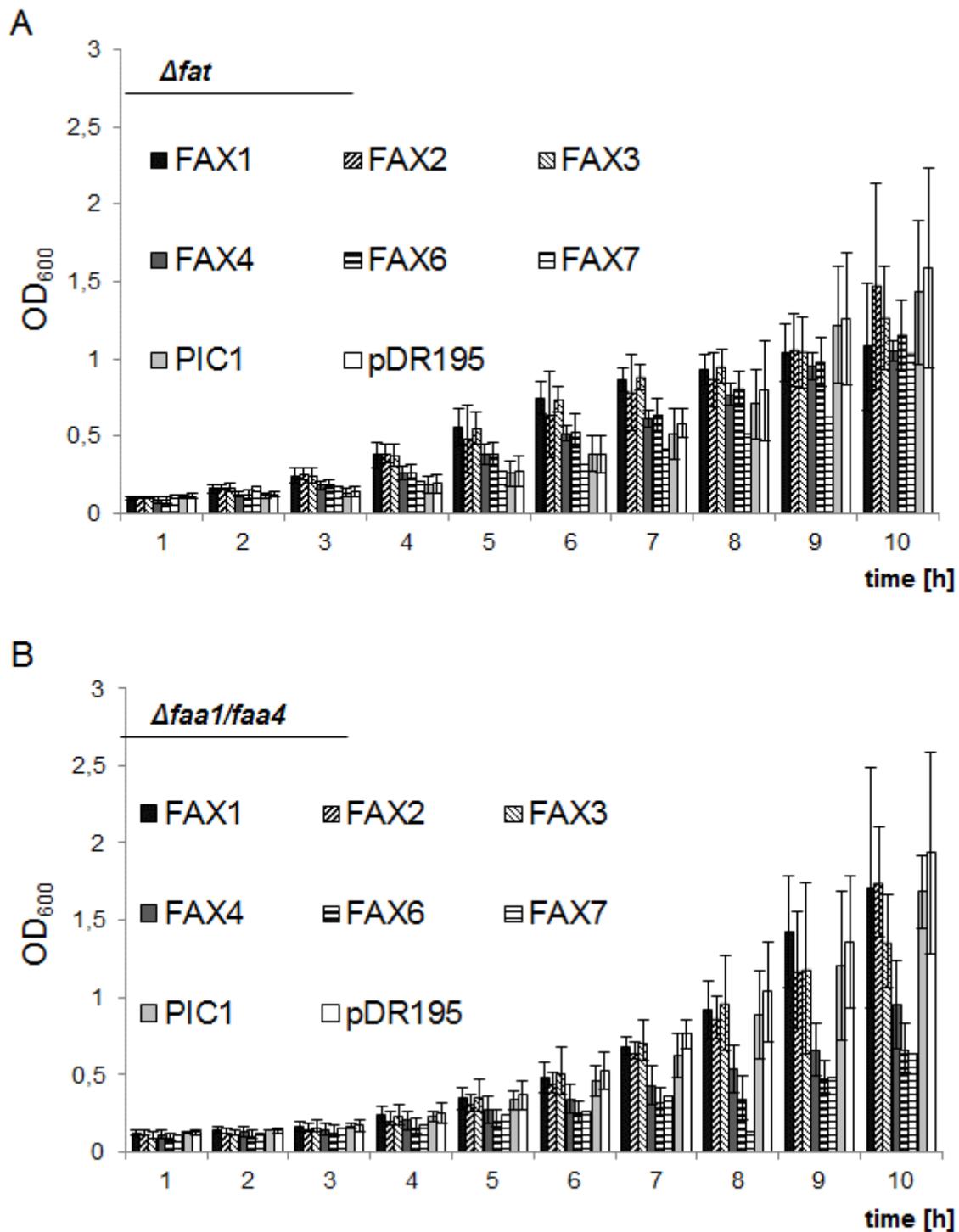
      *
At : PAI-SIPDPLPLP : 177
Br : PVAVSVPDALPLP : 175
Dc : ~~~~~~ : -
Fv : TNL~~~~~ : 211
Pt : ITDLV~~~~~ : 175
Pb : TIS~~~~~ : 185
Os : ~~~~~~ : -
Zm : ~~~~~~ : -
Sm : ~~~~~~ : -
Pp : PLS~~~~~ : 184

```

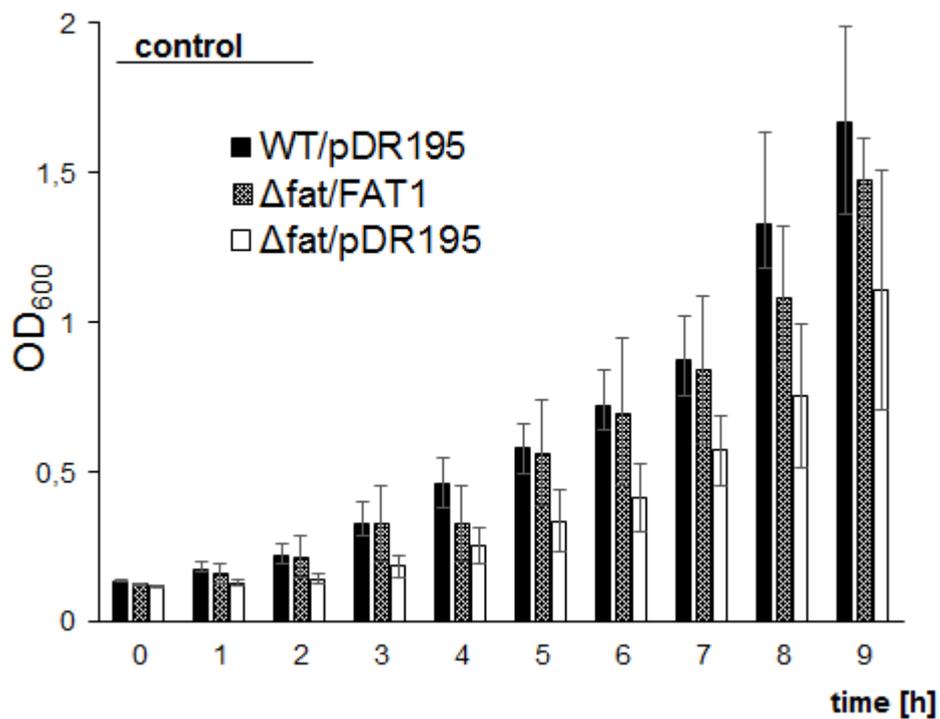
**Abb. 52: Alignment der Sequenzen von FAX4 in unterschiedlichen Landpflanzen.** Aminosäuren entsprechend ihrer Position im Präprotein nummeriert, *At-FAX4* (At1g33265). Konservierte Aminosäurereste in schwarz (100 %), dunkelgrau (50 %) und hellgrau (25 %). *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Br*, *Brassica rapa*; *Dc*, *Dacus carota*; *Fv*, *Fragaria vesca*; *Pt*, *Populus trichocarpa*; *Pb*, *Pyrus bretschneideri*; *Os*, *Oryza sativa*; *Zm*, *Zea mays*; *Sm*, *Selaginella moellendorffii*; *Pp*, *Physomitrium patens*. Aminosäuren im Einbuchstabencode.



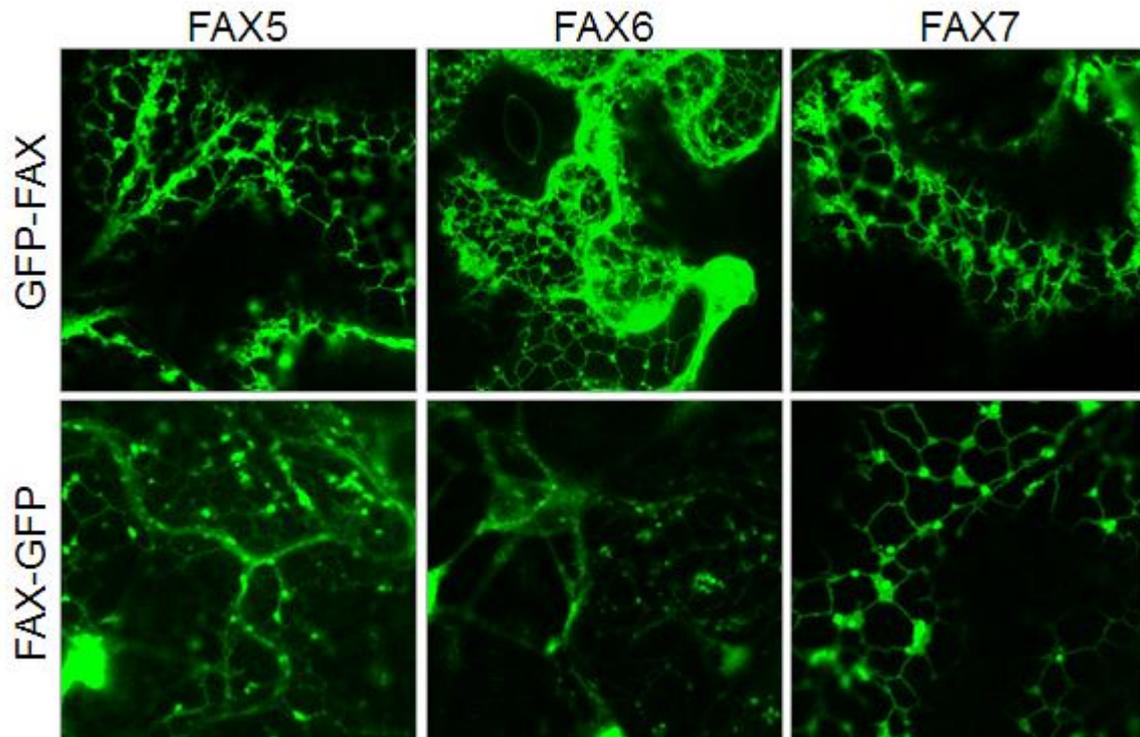
**Abb. 53: Schematische Darstellung des Hefevektors pDR195 (6305 bp).** Dargestellt sind Promotoren, Terminator, Origin of Replicatin (ori), Resistenzen (Ampicillin (Amp) in Bakterien) sowie Enzymschnittstellen (schwarz) und Primerbindestellen (lila). URA3: vermittelte Uracilsynthese für Hefeselektion. Zahlen stellen Position in der Basenabfolge dar.



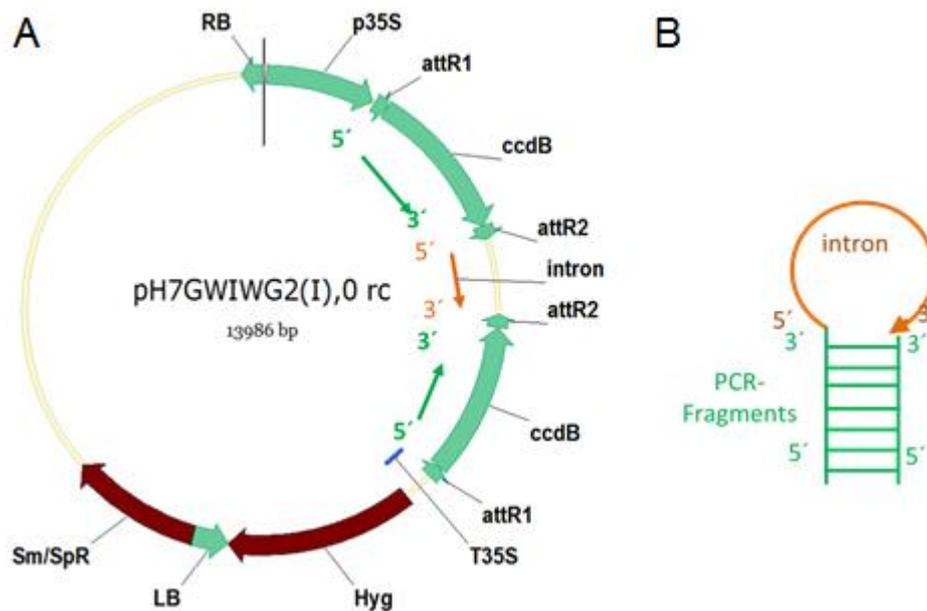
**Abb. 54: Wachstum von transformierten *fat1* (A) und *faa1/4* (B) Zellen in SC-ura-Flüssigmedium.** Die  $OD_{600}$  wurde stündlich während einer Inkubationszeit von neun Stunden bei 30 °C unter schütteln gemessen. Betrachtet wurde das Wachstum von mAt-FAX1/pDR195, FAX2/pDR195, FAX3/pDR195, FAX4/pDR195, FAX6/pDR195, FAX7/pDR195, PIC1/pDR195 und pDR195(-). Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar.



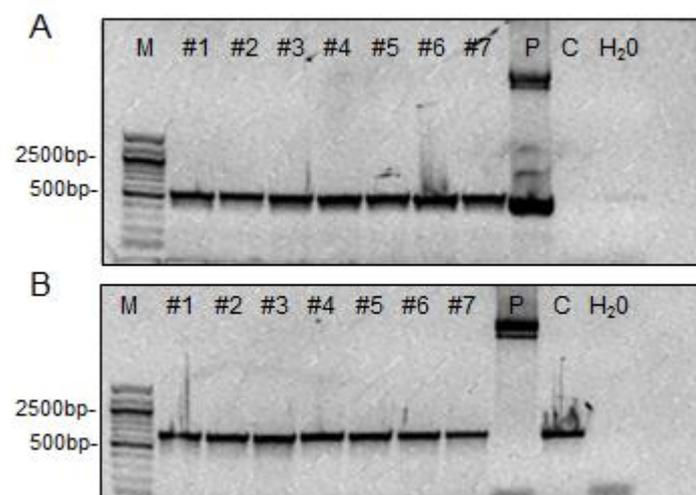
**Abb. 55: Wachstumsverlauf der Wildtyp-Kontrollen im Hefeassay.** Die  $OD_{600}$  wurde stündlich während einer Inkubationszeit von neun Stunden bei 30 °C unter schütteln gemessen. Das Wachstum von einem wildtypischen Stamm mit transformierten WT/pDR195, vom *fat1* Stamm mit transformiertem *FAT1* und vom *fat1* Stamm mit transformiertem pDR195(-) wurde verfolgt. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar.



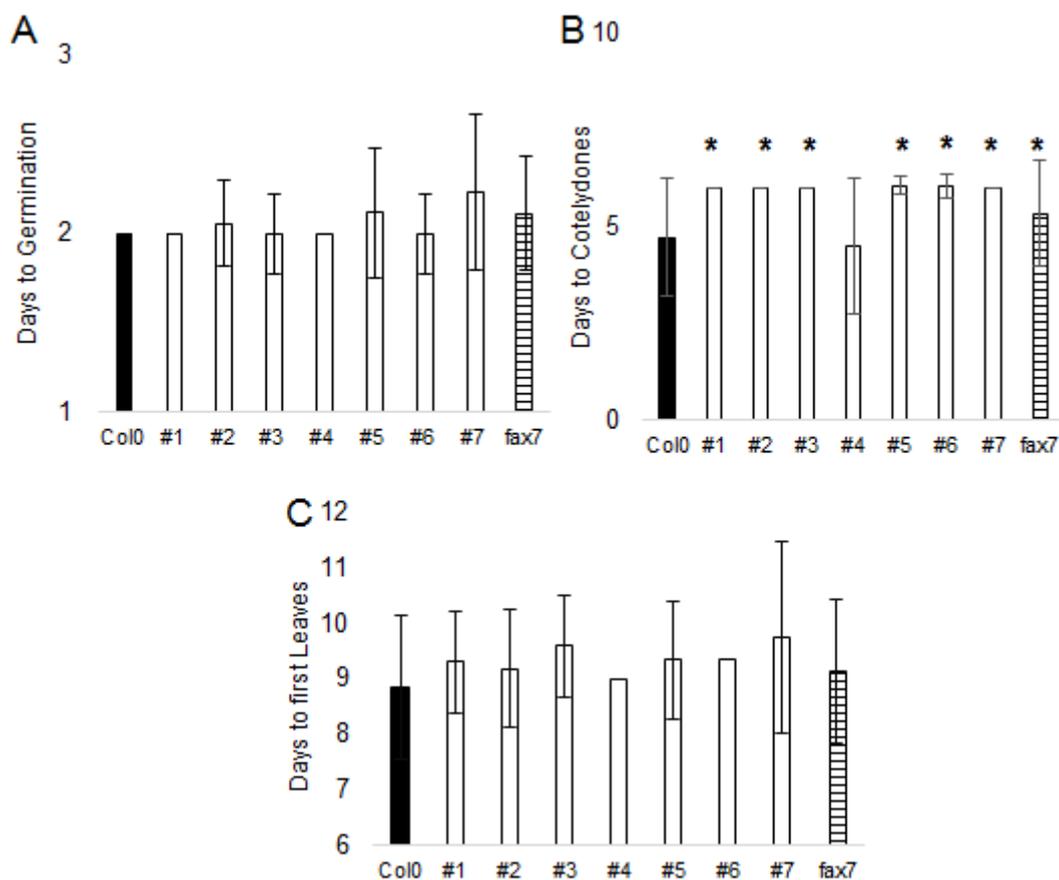
**Abb. 56: GFP-Targeting von FAX5, FAX6 und FAX7 in Blattepidermis von *N. benthamiana*.** Blätter von *N. benthamiana* wurden transient mit FAX5/pK7WGF2, FAX5/pK7FWG2, FAX6/pK7WGF2, FAX6/pK7FWG2, FAX7/pK7WGF2, FAX7/pK7FWG2 transformiert. Nach zwei bis drei Tagen wurde die untere Blattepidermis unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. A: Fluoreszenz des Genkonstruktes mit N-terminalem GFP (GFP-FAX) (Extinktion 488 nm / Emission 500-540 nm). B: Fluoreszenz des Genkonstruktes mit C-terminalem GFP (FAX-GFP) (Extinktion 488 nm / Emission 500-540 nm). Daten und Abbildung Dr. Melanie Krebs und Dr. Upendo Lupanga 2021, verändert.



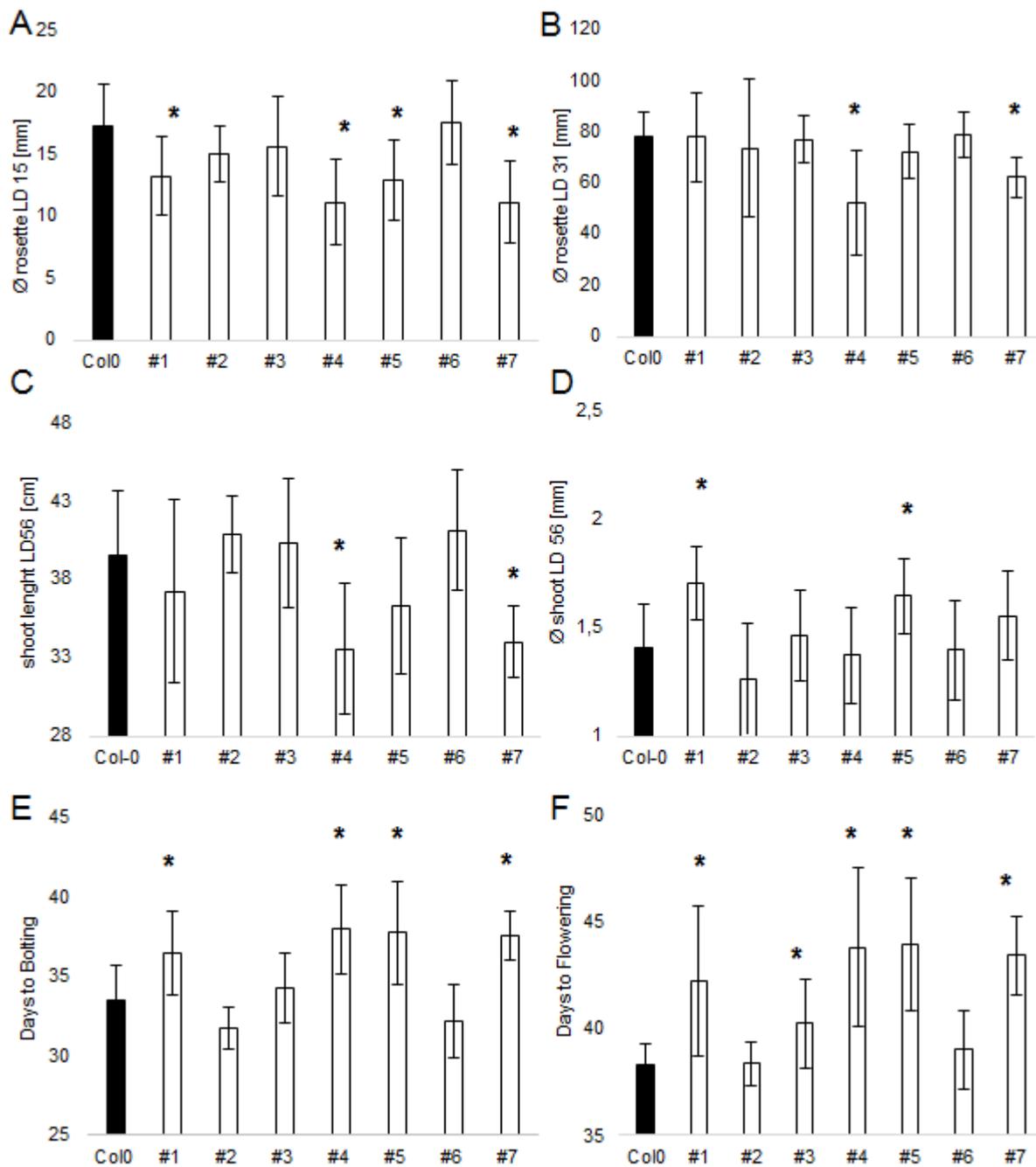
**Abb. 57: Schematische Darstellung des Vektors pH7GWIWG2 (A) und des resultierenden *Hairpin* PCR Fragmentes (B) zur Erstellung der RNAi-Mutanten. 35S Promotor. Anstelle des Introns (orange) wurde ein FAX4 Fragment inkloniert.**



**Abb. 58: Nachweis des FAX4-RNAi Konstruktes in den FAX4-RNAi Linien #1 - #7. (A) Amplifikation des FAX4-RNAi Konstruktes mittels konstruktsspezifischer Primer 35s fw und FAX4-RNAi rev (Produktgröße = 594 bp). (B) Amplifikation des FAX1 Fragments (als Ladekontrolle) mit den Primern Fax1 LP und Fax1 RP (Produktgröße = 684 bp). Als Kontrollen wurde das Plasmid (P) mit dem FAX4-RNAi Konstrukt, genomische DNA von Col-0 (C) und Wasser (H<sub>2</sub>O) eingesetzt. Marker: PstI-Verdau von Phage Lambda DNA.**



**Abb. 59: Keimungsanalyse der FAX4-RNAi Linien #1-#7 und der fax7 Knockout-Mutante im Vergleich zum Wildtyp Col-0.** (A) Tage bis zur Keimung. (B) Tage bis zur Entfaltung der Kotelydonen. (C) Tage bis zur vollständigen Ausbildung des ersten Blattpaares. Pro FAX4-RNAi Linie wurden 20 Samen gemittelt, für Col-0 30 Samen und für fax7 insgesamt 100 Samen aus Nachkommen der Linie fax7-2 #4. Die Pflanzen wurden steril auf Platte angezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte einer Linie und deren Standardabweichungen (Fehlerbalken); Sternchen =  $p < 5\%$ . Die Signifikanz wurde mit einem Standard T-Test errechnet. Simon Both, 2018, verändert.



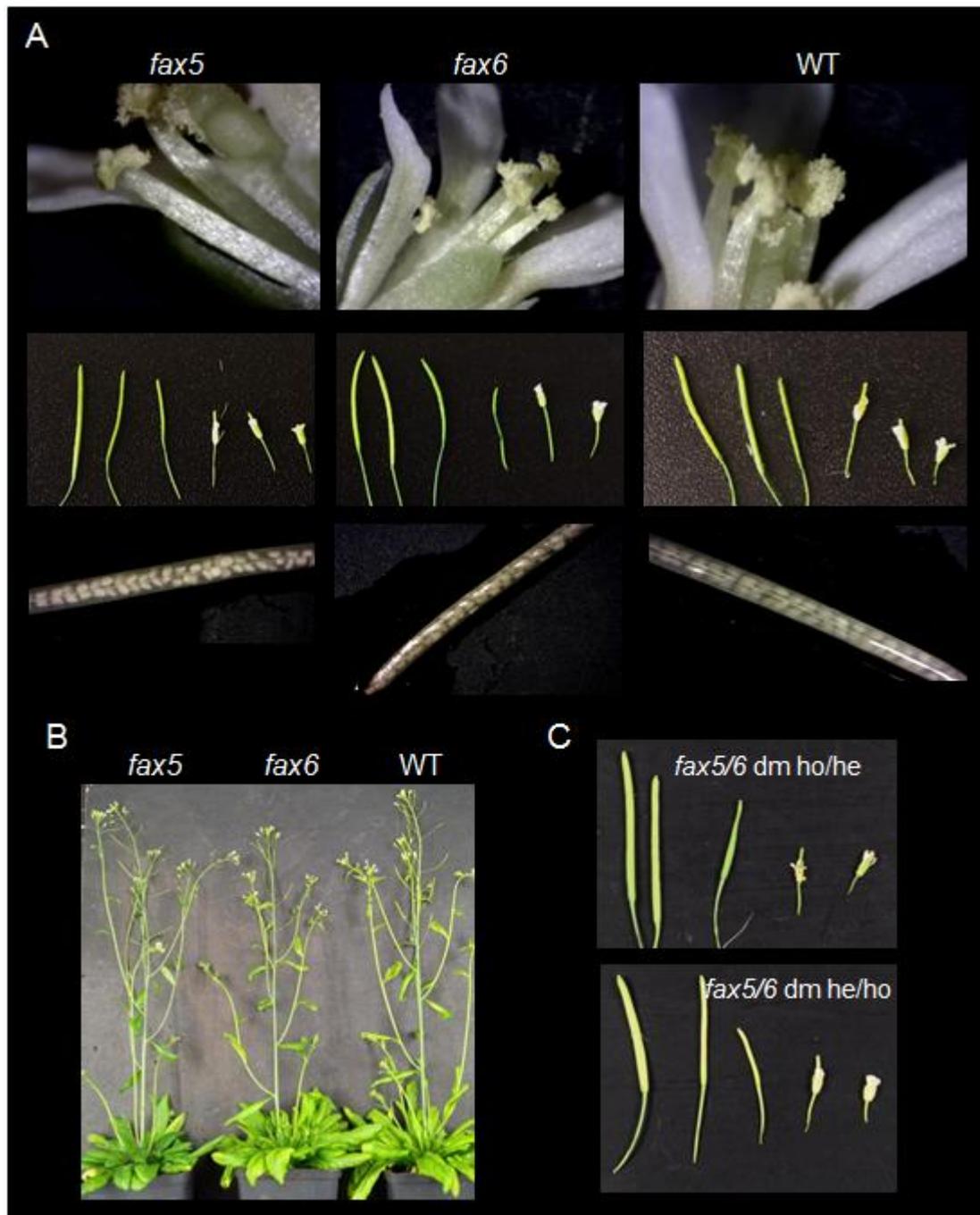
**Abb. 60: Auswertung der Phänotypisierung auf Erde der FAX4-RNAi Linien #1-#7 im Vergleich zum Wildtyp Col-0.** (A) Rosettendurchmesser am Lichttag 15 in mm. (B) Rosettendurchmesser am Lichttag 31 in mm. (C) Gesamtlänge des Haupttriebes in cm am Lichttag 56. (D) Durchmesser des Haupttriebes in mm am Lichttag 56. (E) Tage bis zur ersten Knospung. (F) Tage bis zur ersten Blüte. Gezeigt sind Mittelwerte. Pro Linie n=10. \*= Signifikanz bezogen auf den Wildtyp  $p < 5\%$  nach einem T-Test. Fehlerbalken stellt die Standardabweichung dar. Simon Both, 2018, verändert.



**Abb. 61: Phänotypische Analysen der FAX4-RNAi Linien #1 - #7 vergleichend zum Wildtyp Col-0.** (A) Repräsentative Aufnahmen der Rosetten an Lichttag 31. (B) Repräsentative Aufnahmen des Pflanzenhabitus an Lichttag 56. (C) Binokularaufnahmen der Schoten. (D) Binokularaufnahmen der Blüten im Wildtyp Col-0 und der FAX4-RNAi #4. Weißer Pfeil: Keine Rückbildung der Haarstrukturen bei FAX4-RNAi #4. (E) Binokularaufnahmen entfärbter Schoten im Wildtyp Col-0 und der FAX4-RNAi #4. Schwarze Pfeile: Defekt in der Samenbildung, Lücken in Schoten bei FAX4-RNAi #4.

**Tab. 14: Übersichtstabelle der Doppelmutantenkreuzung, sowie der resultierenden F1 Linien der *fax5/fax6* dm und die vermehrten Pflanzen aus F2 von Linie *fax5/fax6* dm #14 und #30 mit Genotyp.** Dargestellt sind die in F0 gekreuzten Varianten der homozygoten Einzel-*Knockout*linien *fax5* (*fax5-1* Geschwisterlinien #4 und #13), *fax6* (*fax6-1* #2) und *fax7* (*fax7-2* #4) (Narbe weiblich x Pollen männlich) mit Pflanzenbezeichnung. In Generation F1 die identifizierten *fax5/fax6* (he/he) Linien #1 - #35. In F2, vermehrte und genotypisierte *fax5/fax6* dm Mutanten der Linien #14 und #30.

F0		F1 Linien	F2 aus Linie #14	Genotyp in F2	F2 aus Linie #30	Genotyp in F2
Narbe (weiblich)	Pollen (männlich)					
<i>fax5/fax6</i> dm			<i>fax5/fax6</i> dm			
<i>fax5-1</i> #4 P2	<i>fax6-1</i> #2 P6	#7 - #17	#14_P1A F2	he/ho	#30_P12 F2	wt/he
<i>fax6-1</i> #2 P6	<i>fax5-1</i> #4 P2		#14_P13B F2	ho/he	#30_P29 F2	wt/wt
<i>fax5-1</i> #4 P5	<i>fax6-1</i> #2 P9		#14_P29 F2	wt/wt	#30_P17 F2	he/he
<i>fax6-1</i> #2 P9	<i>fax5-1</i> #4 P5		#14_P5 F2	he/wt	#30_P13 F2	wt/ho
<i>fax5-1</i> #13 P5	<i>fax6-1</i> #2 P12		#14_P1B F2	ho/he	#30_P2 F2	he (wt)/wt
<i>fax6-1</i> #2 P12	<i>fax5-1</i> #13 P5	#2 - #6	#14_P13A F2	wt/he	#30_P5 F2	he/wt (he)
<i>fax6-1</i> #2 P7	<i>fax5-1</i> #13 P4	#18 - #35	#14_P12B F2	ho/he	#30_P9 F2	wt/he (ho)
<i>fax6-1</i> #2 P10	<i>fax5-1</i> #13 P2	#1	#14_P7 F2	?		
<i>fax6/fax7</i> dm			#14_P11 F2	he/ho		
			#14_P10 F2	ho/he		
<i>fax7-2</i> #4 P3	<i>fax6-1</i> #2 P9		#14_P12A F2	ho/he		
<i>fax6-1</i> #2 P9	<i>fax7-2</i> #4 P3		#14_P19 F2	ho/he		
<i>fax7-2</i> #4 P1	<i>fax6-1</i> #2 P6		#14_P2 F2	wt/he		
<i>fax6-1</i> #2 P6	<i>fax7-2</i> #4 P1		#14_P14 F2	?		
<i>fax6-1</i> #2 P2	<i>fax7-2</i> #4 P8		#14_P18 F2	he/wt		
<i>fax5/fax7</i> dm			#14_P16A F2	wt/he		
<i>fax5-1</i> #13 P9	<i>fax7-2</i> #4 P6		#14_P20B F2	he/wt		
<i>fax7-2</i> #4 P6	<i>fax5-1</i> #13 P9		#14_P20A F2	he/ho		
<i>fax5-1</i> #13 P6	<i>fax7-2</i> #4 P4		#14_P16B F2	he/ho		
<i>fax7-2</i> #4 P4	<i>fax5-1</i> #13 P6					
<i>fax5-1</i> #13 P1	<i>fax7-2</i> #4 P3					



**Abb. 62: Phänotypische Analysen der *fax5* und *fax6* Einzelmutanten verglichend zum rücksegregierten Wildtyp *fax5/fax6* (wt/wt).** (A) Fotografische Darstellung der Blüten der *fax5*, *fax6* und WT Pflanzen (oben), der jeweiligen Schotenentwicklung (mitte) und entfärbter Schoten (unten). (B) Repräsentative Aufnahmen des Gesamthabitus nach 6 Wochen. (C) Schotenentwicklung in *fax5/fax6* ho/he und he/ho. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen.

## 14 Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

### Persönliche Daten

Name	Anne Könnel
Geburtstag und -ort	04.03.1993 in Pirmasens
Nationalität	Deutsch

### Ausbildung

**10/2017 – 08/2021 Doktorandin/PhD Student, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland**

ZHMB – Pflanzenbiologie, unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Katrin Philippar, innerhalb des **IRTG1830** (International Research Training Group).

**10/2015 – 08/2017 Masterabschluss/Master of Science, TU Kaiserslautern, Kaiserslautern, Deutschland**

Studiengang: Microbial and Plant Biotechnology

*Titel der Masterarbeit: "Vergleichende phänotypische, Transkriptom- und Sekretomanalysen von Botrytis cinerea und Botrytis fabae."*

Durchgeführt in der Abteilung Phytopathologie bei Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn

**10/2012 - 09/2015 Bachelorabschluss/Bachelor of Science, TU Kaiserslautern, Kaiserslautern, Deutschland**

Studiengang: Biowissenschaften

*Titel der Bachelorarbeit: "Die Rolle der Toxinbiosynthese von Botrydial und Botcinin bei der Infektion von Botrytis spp."*

Durchgeführt in der Abteilung Phytopathologie bei Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn

**08/2003 - 03/2012 Abitur, Sickingen-Gymnasium Landstuhl, Landstuhl, Deutschland**

Werdegang

**10/2017 – 08/2021 Wissenschaftliche Mitarbeiterin** am Lehrstuhl Pflanzenbiologie, unter der Leitung von Prof. Dr. Katrin Philippar, *Universität des Saarlandes*, Saarbrücken, Deutschland

**03/2021 – 08/2021 Lehrerin**, *BBS2 Wirtschaft und Soziales*, Kaiserslautern, Deutschland

**2019/2020 Mentorin im Mentoring Programm MentoMINT**, *Universität des Saarlandes*, Saarbrücken, Deutschland, ehrenamtlich

**08/2018 – 10/2018 Forschungsaufenthalt**, *University of Alberta*, Edmonton, Kanada

**Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen**

**Jährlich** - Präsentieren von Forschungsvorträgen und Postern innerhalb IRTG1830 Tagungen

**2018** - Canadian Society for Molecular Biosciences (CSMB) 61st Annual Conference Membrane Proteins in Health and Disease, Banff, Kanada

**2018** - North American SMALP Conference 2018, Banff, Kanada

**Betreuung von Bachelorarbeiten**, *TU Kaiserslautern*, Deutschland, Phytopathologie und *Universität des Saarlandes*, Deutschland, Pflanzenbiologie

**Koordination und Betreuung** von Praktika, *TU Kaiserslautern*, *Deutschland*, Pflanzenphysiologisches Grundpraktikum und *Universität des Saarlandes*, *Deutschland*, Botanisches Grundpraktikum, Fortgeschrittenen Praktikum im Bachelorstudium AP3, Seminar Grüne Gentechnik, Masterpraktikum ADV3

**Organisation und Koordination** eines **interdisziplinären Seminars** innerhalb der Forschungsgruppen der *Universität des Saarlandes* (Pflanzenbiologie, Mikrobiologie, Biochemie, Biophysik und eingeladenen Gäste)

Publikationen

**Bugaeva W.\*, Könnel A.\*, Peter J.\*, Mees J., Hankofer V., Schick C., Schmidt A., Banguela-Castillo A. and Philippar K. (2021).** FAX proteins in the inner envelope of chloroplasts can complement each other for fatty acid transport. *J. Ex. Bot.* (submitted), \* this authors contributed equally.

**Könnel A., Bugaeva W., Gügel I.L., Philippar K. (2019).** BANFF: bending of bilayer membranes by amphiphilic  $\alpha$ -helices is necessary for form and function of organelles. *Biochem. Cell Biol.* 97: 243-256. doi: 10.1139/bcb-2018-0150. PMID: 30208283.

**Müller N., Leroch M., Schumacher J., Zimmer D., Könnel A., Klug K., Leisen T., Scheuring D., Sommer F., Mühlhaus T., Schroda M., Hahn M. (2018).** Investigations on VELVET regulatory mutants confirm the role of host tissue acidification and secretion of proteins in the pathogenesis of *Botrytis cinerea*. *New Phytol.* 219:1062-1074. doi: 10.1111/nph.15221. PMID: 29790574.

## 15 Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Katrin Philippar für die Möglichkeit der Durchführung dieser Doktorarbeit bedanken. Vielen Dank für dieses vielseitige und spannende Projekt, das ich mit großem Interesse und Freude bearbeiten durfte. Danke, für das mir entgegen gebrachte Vertrauen und die vielen richtungsweisenden Ratschläge während der Bearbeitung dieses Projektes und die Möglichkeit als PhD Studentin innerhalb des IRTG1830 mit einem Forschungsaufenthalt in Kanada zu promovieren. Vielen Dank für die Chancen und Erfahrungen, die ich während meiner Promotionszeit sammeln konnte und die mich sicher zukünftig geprägt haben.

Ebenso ein herzlicher Dank, geht an Herrn Prof. Dr. Neuhaus, der die Zweitkorrektur dieser Dissertation übernommen hat. Vielen Dank!

Herzlich danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. Joanne Lemieux und ihrer Arbeitsgruppe, die mich während meines Forschungsaufenthaltes an der Universität in Edmonton in ihrem Labor herzlich aufnahmen, unterstützten und maßgeblich zum Erfolg meiner Arbeit beitrugen. Thank you!

Meinen Kooperationspartnern gilt ebenso ein großer Dank. Danke an die AG Prof. Dr. Johannes Herrmann an der TU Kaiserslautern, vor allem Dr. Janina Laborenz, das ich zu Gast sein durfte. Danke an Dr. Melanie Krebs und Dr. Upendo Lupanga an der Universität Heidelberg für die Unterstützung bei den Lokalisationsstudien. Und danke an die AG Prof. Dr. Peter Dörmann für die Durchführung der Lipidanalytik.

Ich möchte allen danken, die am IRTG1830 Programm beteiligt waren. Danke für die Unterstützung und Möglichkeiten. Es war eine tolle Zeit! Besonders danken möchte ich Frau Dr. Gabriele Amoroso. Liebe Gabi, danke, dass du immer mit Rat und Tat zur Seite standest und alles für uns organisiert hast.

Auch möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken. Vielen Dank für eure Unterstützung und Hilfsbereitschaft während dieses Projektes und, dass ich Teil des Teams sein durfte. Ihr habt alle zu dieser Arbeit beigetragen.

Danke an Dr. Jens Neunzig. Lieber Jens, danke für die Hilfestellung bei biochemischen Problemen oder Klonierungs- und Expressionsstrategien.

Besonders möchte ich bei Angelika Anna danken, die mich nicht nur mit helfen Händen bei zahlreichen Versuchen unterstützt hat, sondern auch immer ein offenes Ohr hatte. Liebe Angelika, ich werde dich, unsere Gespräche und deine ansteckend gute Laune sehr vermissen.

Danke auch an Lina Bugaeva und Janick Peter, die mit mir im selben Boot saßen und mit denen ich so manch frustrierenden Labortag überstanden habe. Danke für viele lustige Momente in und außerhalb unsers Doktorandenbüros, die in Erinnerung bleiben.

Ein großes Dankeschön auch an Julia Mees, Simon Both und Moritz Schablowski, die durch ihre Abschlussarbeiten und viele Hiwi-Stunden wissenschaftlich zu dieser Arbeit beigetragen haben. Lieber Moritz, danke für eine entstandene Freundschaft, viele lustige Momente, dein offenes Ohr und deine Zeit.

Ein herzlicher Dank geht auch an Dr. Anne Grethen, die mich mit biophysikalischer Expertise unterstützt hat. Liebe Anne, danke für die tolle gemeinsame Zeit in Kanada und eine entstandene Freundschaft.

Danke an meine Korrekturleser Isabel Keller, Louis Perciful und Dr. Michaela Leroch. Ihr habt Anregungen zur Gestaltung dieser Arbeit beigetragen und so manchen Fehler und vor allem überflüssige Leerzeichen aufgespürt.

Danke auch an Maja Šimunić, mit der ich gerne meine Mittags- und Kaffeepausen verbracht habe. Wir haben viel gelacht und über die Welt philosophiert.

Ein großer Dank gilt auch Friederike Altherr. Liebe Fritzi, danke für die jahrelange Freundschaft, viele Abendessen und dein offenes Ohr. Du warst immer für mich da und hast an mich geglaubt.

Zuletzt möchte ich mich aus tiefstem Herzen bei meiner ganzen Familie bedanken. Euer Rückhalt und eure Unterstützung haben alles erst ermöglicht. Danke für unzählige gemeinsame Spaziergänge, offene Ohren, Lebensweisheiten, ermutigende Worte und schöne Momente. DANKE! Besonders danke ich meinem Partner, Marco Unnold, der meine Launen ertrug, für Ablenkung in schwierigen Zeiten sorgte, immer zuhörte, sich in Geduld übte und zu jeder Zeit an mich glaubte. Von Herzen danke ich auch meinen Eltern, Heiko und Silke Könnel, die immer hinter mir stehen, für mich da sind und mich zu dem Menschen erzogen haben, der ich heute bin. Ich bin stolz eure Tochter zu sein! Ich liebe euch alle sehr!

## 16 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Ich erkläre darüber hinaus mit meiner Unterschrift, dass ich

- keine im Merkblatt "Hinweise zur Vermeidung von Plagiaten" der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät beschriebene Form des Plagiats begangen habe,
- alle Methoden, Daten und Arbeitsabläufe wahrheitsgetreu dokumentiert habe und
- keine Daten manipuliert habe.

---

Ort, Datum

Unterschrift