Molekulare Analyse der plasmodesmalen Assoziation des viralen Movementproteins MP17

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

vorgelegt von
Katrin Link
aus Nürnberg

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. Jörn Wilms
Erstberichterstatter: Prof. Dr. Uwe Sonnewald
Zweitberichterstatter: PD Dr. Ruth Stadler

Am Ende wird alles gut. Und wenn es nicht gut wird, ist es noch nicht das Ende.

Oscar Wilde

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

Link K, Vogel F, Sonnewald U (2011) PD trafficking of potato leaf roll virus movement protein in Arabidopsis depends on site-specific protein phosphorylation. Front Plant Sci **2**

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 1

Summary 3

1 Einleitung 5

1.1 Plasmodesmata 5

1.1.1 Aufbau von Plasmodesmata 5

1.1.2 Entstehung von Plasmodesmata 7

1.1.3 Transport durch PD 8

1.1.4 Regulation des plasmodesmalen SEL 10

1.1.5 Identifizierung von Plasmodesmata-Proteinen 14

1.2 Pflanzenviren 17

1.2.1 Transportstrategien pflanzlicher Viren 18

1.2.2 Interaktion mit Wirtsfaktoren 19

1.2.3 MP17 – das Movementprotein des *Potato leafroll virus* 20

1.3 Zielsetzung der Arbeit 22

2 Ergebnisse 24

2.1 Identifizierung der für die PD-Lokalisation von MP17 verantwortlichen Aminosäure-Motive 24

2.1.1 Generierung und Analyse von MP17-Deletionsmutanten 24

2.1.2 Analyse der Bedeutung der identifizierten Phosphorylierungsstellen 26

2.1.3. Einfluss der Lysinreste auf den Abbau von MP17 in Sinkgeweben 29

2.2 Genetische Identifizierung von Elementen des inter- und intrazellulären Makromolekültransportes 31

2.2.1 Beschreibung des Mutantenscreenings 31

2.2.2 Analyse der M3-Generation der identifizierten Mutanten 36

2.2.3 Analyse der Sourcemutante SO15A 38

2.2.4 Genetische Charakterisierung der Mutante SO15A 42

2.3 Untersuchung eines Cholintransporter-ähnlichen Proteins in Arabidopsis und dessen Einfluss auf die plasmodesmale Lokalisation von MP17 51

2.3.1 Bestätigung der *CHER1* Genidentität 51

2.3.2 Lokalisation von CHER1 55

2.3.3 Interaktion CHER1 und MP17 56

2.3.4 Auskreuzung von MP17 aus der Mutante SO15A 57

2.3.5 Komplementation SO15A 58

2.3.6 Metabolitmessungen 58

2.3.7 Keimlingsversuche 61

2.3.8 Differentiell regulierte endogene Transkripte in CHER1-Mutanten 63

3 Diskussion 66

3.1 Wodurch wird die PD-Lokalisation von MP17 vermittelt? 66

3.1.1 PD-Targeting der MP17-Deletionsvarianten 66

3.1.2 Phosphorylierung von MP17 ist essentiell für dessen PD-Lokalisation 67

3.1.3 MP17 – ein peripheres Membranprotein? 70

3.2 Genetische Identifizierung von Elementen des inter- und intrazellulären Makromolekültransportes 72

3.2.1 Identifizierung von Komponenten des plasmodesmalen Transports 72

3.2.2 Primärcharakterisierung und Marker-gestützte Kartierung der Sourcemutante SO15A 73

3.2.3 Eine Herunterregulierung des *CHER1* Transkriptlevels phänokopiert die Mutante SO15A 74

3.2.4 Die Mutation in CHER1 verhindert die Plasmamembranlokalisation des Proteins und führt zu einer veränderten Plasmamembranzusammensetzung 75

3.2.5 Cholin in Pflanzen 77

3.2.6 Mögliche Auswirkungen eines veränderten Cholingehaltes in der Pflanze 79

4 Material und Methoden 95

4.1 Material 95

4.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien 95

4.1.2 Oligonukleotide und Sequenzierungen 95

4.1.3 Vektoren und generierte Konstrukte 95

4.1.4 Bakterienstämme und Kultivierung 98

4.1.5 Pflanzenmaterial und Kultivierung 99

4.2 Methoden 101

4.2.1 Pflanzentransformation 101

4.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden 102

4.2.3 Extraktion und Analyse von Nukleinsäuren 102

4.2.4 Mutantenscreening und Marker-gestützte Kartierung 104

4.2.5 *Next generation sequencing* 105

4.2.6 Generation von *CHER1* amiRNA Pflanzen 105

4.2.7 Komplementation der CHER1-Mutanten 106

4.2.8 Western Blot Analyse 106

4.2.9 Physiologische Analysen und Zuckermessung 107

4.2.10 Keimlingsversuche 108

4.2.11 Messung des Cholingehaltes und der Phospholipide 108

4.2.12 Membranisolierung und Extraktion von Fettsäuren: 110

4.2.13 Plasmidkonstruktion für Lokalisierungsstudien 111

4.2.14 BIFC-Analysen 111

4.2.15 KLSM-Analysen 112

4.2.16 Alignment luteoviraler Movementproteine 112

4.2.17 Alignment und phylogenetischer Baum der Mitglieder der Cholintransporterfamilie 112

Literaturverzeichnis 114

Abkürzungsverzeichnis 136

Anhang 139

Danksagung 173

Zusammenfassung

Trotz der rigiden Zellwand, die sie umgibt, stellen Pflanzenzellen keine isolierten Einheiten dar, sondern sind über Zell-Zell Kontakte namens Plasmodesmata (PD) zu einem suprazellulären Netzwerk verbunden. Der Transport und die Zell-zu-Zell Kommunikation durch PD ist ein hochregulierter Prozess. Doch selbst nach mehr als 100 Jahren Forschung ist über die Proteine, die diese hochentwickelten Zell-Zell Kontakte definieren und die zugrunde liegenden Mechanismen nur wenig bekannt. Pflanzenviren haben sich dieses System für ihre Verbreitung durch die Pflanze zunutze gemacht, indem sie für spezialisierte Movementproteine (MP) kodieren und mit Wirtsfaktoren interagieren. Demnach stellt die funktionelle Analyse viraler MP ein wichtiges Werkzeug für die Identifikation von PD-Proteinen dar. In der vorliegenden Arbeit wurde das 17 kDa große Movementprotein (MP17) des *Potato leafroll virus* (PLRV) zur Analyse von PD verwendet. Im ersten Teil sollte die für die PD-Lokalisation verantwortliche Aminosäuresequenz, bzw. Domäne des Proteins identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden GFP-fusionierte MP17-Deletionsvarianten sowie MP17-Phosphorylierungs-mutanten generiert und lokalisiert. Die Analysen zeigten, dass das PD-Targeting von MP17 durch ein Zusammenspiel von drei verschiedenen Teilen des Proteins vermittelt wird: dem C-Terminus, der Phosphorylierung der Serinreste S71 und/oder S79 und einer N-terminalen Domäne. Der zweite Fokus der vorliegenden Arbeit galt der Identifikation von Elementen des Makromolekültransportes. MP17 lokalisiert spezifisch an verzweigte PD in Sourceblättern, jedoch nicht an die strukturell unterschiedlichen simplen PD in unausgereiftem Gewebe. Während der Seneszenz kommt es zu einem allmählichen Verlust der plasmodesmalen Assoziation von MP17, vermutlich aufgrund struktureller Veränderungen der Plasmodesmata in diesem Entwicklungsstadium. Beide Merkmale, Bindung an PD in Sourceblättern und Verlust der Bindung in seneszenten Blättern, bildeten die Grundlage für ein vorwärts gerichtetes genetisches Screening nach Arabidopsismutanten mit einer veränderten PD-Bindung von MP17, genauer einer Reduktion der PD-Bindung in Sourceblättern und einer verstärkten PD-Bindung in seneszenten Blättern. Durch eine Kombination aus klassischer Marker-gestützter Kartierung und *next generation sequencing* konnte für eine der im Sourcescreening identifizierten Mutanten (SO15A) eine Mutation in CHER1, einem Protein der Plasmamembran Cholintransporter-Familie, nachgewiesen werden. Die Mutation in der zweiten Transmembrandomäne beeinträchtigte die Plasmamembran-Lokalisation des Proteins und führte stattdessen zu einer Akkumulation im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Herunterregulierung der *CHER1* Transkriptmengen in der T-DNA Insertionslinie

cher1-4 sowie den generierten *artificial micro* RNA-Pflanzen für *CHER1* phänokopierte die Mutante SO15A. Alle CHER1-Mutanten sind durch eine extreme Wachstumsverzögerung, eine stark reduzierte PD-Lokalisation von MP17 sowie einen reduzierten Assimilatexport gekennzeichnet. Interessanterweise konnte eine Reduktion des Gehaltes an Phosphatidylcholin 759,0 um etwa 14 % in den CHER1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Col-0 detektiert werden, was mit einem entsprechenden Anstieg an Phosphatidyl-ethanolamin 718,7 einherging. Ebenso war der Level von Lysophosphatidylcholin 518,5, einem *lipid messenger*, signifikant verringert. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine veränderte Plasmamembranzusammensetzung für den charakteristischen Phänotyp der CHER1-Mutanten verantwortlich ist. In der Transkriptomanalyse konnte zudem eine Transkript-Herunterregulierung bei *downstream* Targets des *lipid messengers* Phosphatidsäure beobachtet werden, v.a. für Ethylen-abhängige Prozesse, Abwehr-assoziierte Prozesse, sowie in den Bereichen *signalling* und Vesikeltransport. Weiterhin fiel eine vermehrte Herunterregulierung von Genen der Sterolsynthese sowie von Genen, die potentiell an der Synthese von sehr langkettigen Fettsäuren (*very long chain fatty acids*, VLCFA), welche für die Synthese von Sphingolipiden benötigt werden, auf. Da sowohl Sphingolipide als auch Sterole Komponenten von *lipid rafts* in Pflanzen darstellen, könnte dies auf eine beeinträchtigte Ausbildung von *lipid rafts* in den CHER1-Mutanten hinweisen. Trotz der Tatsache, dass der genaue Zusammenhang zwischen dem Cholintransporter CHER1 und der PD-Lokalisation von MP17 noch ungeklärt ist, deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Mutation in CHER1 oder die Herunterregulierung des *CHER1* Transkriptlevels in einer veränderten Plasmamembran-zusammensetzung resultiert. Diese wiederum beeinflusst eine Vielzahl an Prozessen, darunter auch die PD-Lokalisation von MP17. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von Phospholipiden, besonders im Kontext der PD-Struktur und -Funktion und als Bindestellen für Plasmamembran- oder PD-assoziierte Proteine, was lange Zeit vernachlässigt wurde.

Summary

Despite the rigid cell wall surrounding plant cells, they do not represent isolated units but are connected to a supracellular network by the presence of cell-to-cell contacts called plasmodesmata (PD). The regulation of macromolecular trafficking and cell-to-cell communication through plasmodesmata is a tightly regulated process. But even after more than 100 years of research our knowledge about the proteins defining these sophisticated cell-to-cell contacts and the ongoing processes is still rudimentary. Plant viruses have hitchhiked this system to enable their spread throughout the plant by encoding for specialized movement proteins (MP) and interacting with the host cell machinery. Thus the functional analysis of viral movement proteins represents an essential tool to uncover proteins required for PD structure and function. This study made use of the 17 kDa movement protein (MP17) of the *Potato Leafroll virus* (PLRV). The first aim was the identification of the sequence or domain responsible for the PD-localisation of MP17:GFP. Fusion experiments with distinct deletion variants and site-directed mutagenesis of the identified phosphorylated serine residues of MP17 revealed that PD-targeting of MP17 is dependent on the C-terminus, phosphorylation of S71 and/or S79 and an N-terminal domain. The focus of the second part was the identification of elements involved in the macromolecular transport. MP17 specifically localises to branched PD in source tissues but not to the structural dissimilar simple PD in immature tissues. During senescence a gradual decrease of plasmodesmal association of MP17 can be observed possibly due to structural changes of PD in this developmental stage. Both features, association of MP17 to PD of source leaves and dissociation from PD of senescent leaves, built the basis for a forward genetic screening for Arabidopsis mutants with altered PD-binding of MP17, more precisely a reduction of PD-binding in source leaves and a gain of PD-binding in senescent leaves. Map-based cloning and next-generation sequencing of one of the mutants identified in the source screening, SO15A, revealed a mutation in the plasma-membrane choline transporter family protein CHER1. The mutation in the second transmembrane domain abolished plasma membrane localisation of the protein, which instead was retained in the endoplasmic reticulum (ER). The knockdown of *CHER1* transcript levels in the T-DNA insertion line *cher1-4* as well as in generated artificial micro RNA plants for *CHER1* phenocopied the mutant SO15A. All CHER1 mutants are characterised by an extreme stunted growth, strongly reduced binding of MP17 to PD of source leaves and a reduced assimilate export. Interestingly, the level of phosphatidylcholine 759,0 was significantly reduced by about 14 % in CHER1 mutants compared to wildtype Col-0, whereas levels of phosphatidylethanolamine 718,7

showed a corresponding increase. Additionally, levels of lysophosphatidylcholine 518,5 showed a significant decrease. This suggests that an altered plasma membrane composition may be responsible for the characteristic phenotype of CHER1 mutants. Transcriptome analysis revealed a down-regulation of potential phosphatidic acid involving processes like ethylene-mediated processes, vesicle trafficking, signalling and defense processes, indicating an impairment of lipid signalling. The down-regulation of genes involved in the synthesis of sterols and very long chain fatty acids needed for sphingolipid synthesis, both important constituents of plant lipid rafts, may indicate that the formation of lipid rafts might be impared in CHER1 mutants. Despite the fact that the exact mechanism of how the choline transporter influences PD-localisation of MP17 remains unclear, there is growing evidence that the mutation or down-regulation of *CHER1* transcript levels leads to an altered plasma membrane composition which influences a variety of processes including the PD-localisation of MP17. These findings highlight the emerging role of phospholipids, especially in the context of PD structure and function as well as potential binding sites for plasma membrane- and PD-associated proteins, which has been neglected for a long time.

1 Einleitung

1.1 Plasmodesmata

Im Unterschied zu tierischen Zellen sind Pflanzenzellen von einer rigiden Zellwand umgeben. Dennoch stellen sie keine isolierten Einheiten dar, sondern sind über sogenannte Plasmodesmata (PD) zu einem suprazellulären Netzwerk verbunden (Lucas und Lee, 2004). PD fungieren als Kontrollstellen für den passiven Transport von Photoassimilaten (Turgeon und Medville, 1998; Turgeon und Medville, 2004; Turgeon und Wolf, 2009) sowie für den selektiven Transport von Informationsmolekülen und Makromolekülen wie Transkriptionsfaktoren und RNA (Haywood et al., 2002; Lucas und Lee, 2004; Oparka, 2004; Kim und Zambryski, 2005; Maule, 2008; Lucas et al., 2009). Dadurch nehmen sie eine Schlüsselrolle für die Koordination von Pflanzenwachstum und -entwicklung, aber auch von Abwehrprozessen ein (Xu und Jackson, 2010; Lee und Lu, 2011). Jedoch birgt die durch PD gegebene symplastische Kontinuität auch Risiken für die Pflanze, da die Zell-Zell Kontakte Angriffspunkte für Pflanzenviren und andere Pathogene darstellen. So überrascht es nicht, dass Pflanzenviren verschiedenste Strategien entwickelt haben, um sich dieses System zunutze zu machen und somit ihre Verbreitung durch die Pflanze zu gewährleisten (Lee und Lu, 2011).

1.1.1 Aufbau von Plasmodesmata

Erste Informationen zum strukturellen Aufbau (siehe Abbildung 1) dieser Zell-Zell Verbindungen lieferten hauptsächlich Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen (Robards, 1971; Ding et al., 1992; Botha et al., 1993; Overall und Blackman, 1996; Waigmann et al., 1997). PD sind mit Plasmamembran ausgekleidete Poren in der Zellwand, die sowohl das Cytoplasma als auch die Membransysteme benachbarter Zellen miteinander verbinden. Die PD-Pore wird von einer Pektin-angereicherten Zellwand umgeben. Durch Kalloseablagerung an den Porenenden, der sogenannten *neck region*, der PD kann zusätzlich die Größe der Porenöffnung modifiziert werden (Radford et al., 1998; Levy et al., 2007). Das zentrale axiale Element, der Desmotubulus, besteht aus modifiziertem kortikalem endoplasmatischen Retikulum (ER), wobei das ER-Lumen auf einen Durchmesser von geschätzt 2 nm komprimiert wird (Robards und Lucas, 1990; Oparka et al., 1994; Kragler, 2013). Der Raum zwischen Desmotubulus und Plasmamembran wird als Cytoplasmaschlauch bezeichnet (Esau und Thorsch, 1985). Dieser wird durch speichenartige Strukturen, welche an der Plasmamembran und dem

Desmotubulus verankerte globuläre Proteine verbinden, in ca. 3 nm breite Mikrokanäle unterteilt (Ding et al., 1992; Overall und Blackman, 1996; Brecknock et al., 2011).

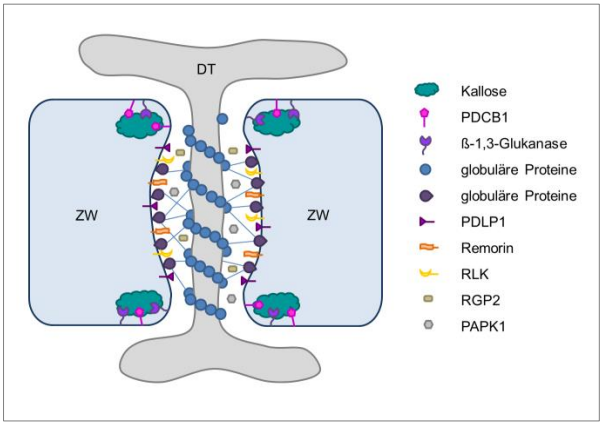

Abbildung 1: Struktureller Aufbau von PD. Abgebildet ist die Struktur simpler PD inklusive der Lokalisation bisher identifizierter PD-assoziierter Proteine (siehe Kapitel 1.1.5); modifiziert nach Benitez-Alfonso et al. (2010).

ZW = Zellwand
DT= Desmotubulus
PDCB1 = *PD-callose-binding protein 1*
PDLP1= *Plasmodesmata-located protein 1*
RLK= *Receptor-like kinase*
RGP2= *reversibly glycosylated polypeptide 2*
PAPK1= *Plasmodesmal-associated protein kinase*

Durch eine gezielte Kontraktion und Expansion dieser Elemente könnte dementsprechend eine Kontrolle des Makromolekültransportes über eine Regulation der basalen Ausschlussgröße der PD erfolgen. Diese wird auch als *size exclusion limit* (SEL) bezeichnet und beschreibt die maximale Größe von Molekülen, die PD passieren können. Overall und Blackman (1996) postulierten, dass der Desmotubulus von helikal angeordneten Aktinsträngen umwunden wird. Diese Hypothese wurde durch die Identifizierung von Aktin und Myosin innerhalb der PD unterstützt (White et al., 1994; Ding et al., 1996; Radford und White, 1998; Reichelt et al., 1999; Golomb et al., 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Depolymerisierung des Aktinskelettes unter Verwendung des Inhibitors Cytochalasin D zu einer Erhöhung des SEL führte (White et al., 1994; Ding et al., 1996). Diesen Effekt scheinen sich auch Pflanzenviren zunutze zu machen, um ihre Verbreitung von Zelle zu Zelle zu ermöglichen. So besitzen die Movementproteine des *Tobacco mosaic virus* (TMV MP30) und des *Cucumber mosaic virus* (CMV MP) die Fähigkeit, F-Aktin Stränge zu durchtrennen und somit das SEL zu erhöhen (Su et al., 2010). Durch Markierung von Aktinfilamenten mit einer GFP-Talin Fusion konnte eine Bewegung der Aktinfilamente durch PD jedoch ausgeschlossen werden (Crawford und Zambryski, 2000). Somit dient Aktin vermutlich eher als Strukturkomponente sowie als Gerüstprotein für einen Myosin-vermittelten Transport von Proteinen (Roberts und Oparka, 2003). Zudem wurde postuliert, dass Myosin VIII möglicherweise an der Verankerung und Organisation von Aktin beteiligt sei oder als Stütze für kortikale ER-Elemente fungieren könnte (Volkmann et al., 2003; Roberts, 2005). Tilsner et al. verweisen jedoch darauf, dass die räumliche Limitierung innerhalb der Pore sowohl Aktin als auch Myosin als PD-Komponente ausschließt (Tilsner et al., 2011). So wird der Durchmesser der Desmotubulus-assoziierten Proteine auf 2,5-4,5 nm

geschätzt, wohingegen Aktinfilamente einen Durchmesser von ca. 7 nm aufweisen (Holmes et al., 1990; Ding et al., 1992; Botha et al., 1993).
Es ist davon auszugehen, dass in Zukunft durch Methoden wie Computertomographie und hochauflösende Fluoreszenzlichtmikroskopie neue Einblicke in die PD-Zusammensetzung gewonnen werden können und die korrekte Lokalisation der identifizierten PD-Proteine genauer bestimmt werden kann (Bell und Oparka, 2011).

1.1.2 Entstehung von Plasmodesmata

Bezüglich der Art ihrer Entstehung kann zwischen primären Plasmodesmata und sekundären Plasmodesmata unterschieden werden (Ehlers und Kollmann, 2001). Primäre Plasmodesmata entstehen während der Zellteilung, wenn bei der Ablagerung des neuen Zellwandmaterials Stränge des kortikalen endoplasmatischen Retikulums in die entstehende Zellplatte eingeschlossen werden (Hepler, 1982; Staehelin und Hepler, 1996; Ehlers und Kollmann, 2001). Durch Umhüllung der neuen Zellwand mit Plasmamembran und Zusammenpressen des ER-Stranges entsteht schließlich die Plasmodesmata-Struktur (Jones, 1976). Als sekundäre Plasmodesmata werden Plasmodesmata bezeichnet, welche in existierenden Zellwänden neu gebildet werden. Hierfür werden zwei verschiedene Möglichkeiten diskutiert. Zum einen kann es bei der Zellwandexpansion zu einer lokalen Ausdünnung der Zellwand durch das Zusammenspiel von Expansinen, zellwandabbauenden Enzymen und Auxin-vermittelter Azidifizierung kommen. Durch den Turgordruck des Cytoplasmas in der Zelle wird die Zellwand weiter ausgedünnt und kortikales endoplasmatisches Retikulum in die Ausbuchtung eingelagert. Wird die Zellwand schließlich komplett durchtrennt, kommt es zu einer Umhüllung der Bruchstelle mit Plasmamembran und einer kompletten Einlagerung des ER (Jones, 1976; Lucas et al., 1993; Ehlers und Kollmann, 2001; Burch-Smith und Zambryski, 2012). Zum anderen können bereits bestehende simple Plasmodesmata als Template für die Bildung sekundärer Plasmodesmata, der sogenannten *twinned* PD, dienen. Dies könnte z.B. durch eine Längsteilung vorhandener Poren erfolgen, wobei zunächst ein zweiter Desmotubulus innerhalb der Pore entsteht und daraufhin die Ablagerung von neuem Zellwandmaterial die Teilung initiiert. Ebenso möglich wäre der Abbau von Zellwandmaterial nahe der Porenöffnung bereits existierender Plasmodesmata von beiden Seiten aus, einhergehend mit einer Vernetzung sich simultan bildender Desmotubuli (Faulkner et al., 2008).

Zum Zeitpunkt ihrer Entstehung sind sowohl primäre als auch sekundäre Plasmodesmata eher einfach strukturiert und bestehen aus einer linearen, zylindrischen Pore. Sie werden

deshalb als simple PD bezeichnet und sind hauptsächlich in unausgereiftem Pflanzengewebe, wie z.B. Embryonen (Burch-Smith und Zambryski, 2010), Sinkblättern (Oparka et al., 1999) und Wurzelmeristemen (Zhu et al., 1998) zu finden. Simple PD können sowohl alleine als auch in Paaren mit einem Abstand von weniger als 100 nm, den sogenannten *twinned* PD, oder in *pit fields*, d.h. Gruppierungen mehrerer PD, vorkommen (Faulkner et al., 2008). Im Laufe der Entwicklung können diese einfachen Poren jedoch zu verzweigten Strukturen mit mehreren Kanälen sowie einem zentralen Hohlraum modifiziert werden und so weisen vollentwickelte Gewebe wie z.B. Sourceblätter über-wiegend verzweigte PD auf (Ding et al., 1992; Ehlers und Kollmann, 1996; Oparka et al., 1999; Ehlers und Kollmann, 2001). Die Verzweigung kann dabei durch Verbindung benachbarter simpler PD (Roberts et al., 2001), Ablagerung von sekundärem Zellwand-material (Fry, 2001) oder Bildung neuer Desmotubulus-Strukturen (Kollmann und Glockmann, 1999) erfolgen.

1.1.3 Transport durch PD

Grundsätzlich wird zwischen einem ungerichteten (durch Diffusion) und einem gerichteten Transport durch PD unterschieden (Crawford und Zambryski, 2001). Durch den spezifischen Aufbau der Plasmodesmata ergeben sich für den ungerichteten Transport verschiedene Transportwege durch diese Zell-Zell Verbindungen. Der Transport kleinerer Moleküle, wie etwa Zucker, Aminosäuren und Ionen, erfolgt über Diffusion durch die Mikrokanäle des Cytoplasmaschlauches (Tucker et al., 1989). Dies wurde in ersten Studien insbesondere durch die Verwendung von niedermolekularen Farbstoffen in verschiedenen Geweben demonstriert (Goodwin, 1983; Tucker et al., 1989; Oparka et al., 1991; Duckett et al., 1994; Roberts et al., 1997). In einer neueren Studie wurde die Diffusionsrate durch PD in Wurzeln von Arabidopsis mittels Carboxyfluorescein und FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) untersucht, wobei ein Flux von 3,3-8,5 μms^{-1} ermittelt werden konnte (Rutschow et al., 2011). Aber auch lösliche Makromoleküle, wie z.B. das *green fluorescent protein* (GFP), können über PD von einer Zelle zur nächsten diffundieren. Die Verwendung von monomeren sowie multimeren Formen ermöglicht zudem die Analyse des plasmodesmalen SEL in verschiedenen Bedingungen und Geweben (Kim et al., 2005; Stadler et al., 2005). Entscheidend für die Passage von Molekülen durch PD ist vor allem deren hydrodynamischer Radius, der sogenannte *stokes radius*, der für GFP 2,82 nm beträgt (Terry et al., 1995). Versuche mit Reporter-farbstoffen an Trichomen in *Nicotiana benthamiana* konnten zeigen, dass auch dieser Transportweg eine gewisse Selektivität und Direktionalität nicht ausschließt, da nach einer

Injektion in die Trichombasiszelle eine Verteilung des Farbstoffes in die Trichomzellen erfolgte, nicht jedoch in die darunterliegende Epidermiszelle (Christensen et al., 2009). Eine weitere mögliche Route für den ungerichteten Transport stellt der Desmotubulus dar. Einerseits kann die Passage durch das Lumen des Desmotubulus erfolgen, was z.B. für Carboxyfluorescein und Fluoreszenz-gekoppelte Dextrane in *Nicotiana tabacum* und *Torenia fournieri* gezeigt werden konnte (Cantrill et al., 1999). Andererseits können Moleküle auch über die Desmotubulusmembran transportiert werden. Guenoune-Gelbart et al. (2008) postulierten, dass TMV MP30, ein integrales ER-Membran Protein, einen Komplex mit viraler RNA (vRNA) bildet und dass dieser Komplex über passive Diffusion in der ER-Membran als Folge des vorhandenen Konzentrationsgradienten zwischen infizierter und nicht infizierter Zelle durch Plasmodesmata gelangt. So überrascht es nicht, dass fluoreszierende Lipide sowie Phospholipidanaloga, die in der ER-Membran lokalisieren, durch PD diffundieren können. Im Gegensatz dazu ist eine Diffusion der PM-lokalisierten Lipide nur innerhalb der Zelle möglich, nicht jedoch über PD hinweg (Grabski et al., 1993). Dies spricht dafür, dass sich die Zusammensetzung der PD-Plasmamembran von der außerhalb liegenden Plasmamembran unterscheidet.

Makromoleküle wie RNA oder Proteine, die das basale SEL überschreiten, bewegen sich über einen gerichteten Transport durch PD von Zelle zu Zelle (Haywood et al., 2002; Oparka, 2004; Lucas et al., 2009; Kragler, 2013). Mikroinjektionsstudien lassen vermuten, dass der gerichtete Transport zwei verschiedene Prozesse beinhaltet (Haywood et al., 2002). Zuerst werden die zu transportierenden Proteine durch spezifische PD *pathway receptors* erkannt und zu den Zell-Zell Kontakten transportiert. Dort folgt die Erkennung der Proteine durch spezifische *docking*-Komplexe, welche die PD-Passage durch strukturelle Modifikationen des Proteins sowie durch Modifikation des plasmodesmalen SEL steuern (Haywood et al., 2002; Lucas und Lee, 2004; Oparka, 2004; Ruiz-Medrano et al., 2004; Kragler, 2013). Generell werden Proteine, die über PD transportiert werden, als *non cell autonomous proteins* (NCAPs) bezeichnet. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden viele endogene Makromoleküle beschrieben, die auf diese Weise zu ihrem Wirkungsort gelangen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Transkriptionsfaktoren, mRNAs und smallRNAs wie microRNAs und siRNAs (*small interfering* RNA), welche für die Koordination von Wachstum und Differenzierung und für die Reaktion auf äußere Einflüsse unabdingbar sind (zusammengefasst in Burch-Smith et al., 2011). Nicht zell-autonome Transkriptionsfaktoren sind beispielsweise KNOTTED1 (Lucas et al., 1995), SHOOTMERISTEMLESS und KNOTTED1-like homeobox protein 1 (Kim et al., 2003) aus der Familie der KNOX Transkriptionsfaktoren, der pflanzenspezifische Transkriptions-faktor LEAFY (Sessions et al., 2000), SHORTROOT aus der GRAS Familie (Helariutta et

al., 2000; Nakajima et al., 2001), der MYB-Transkriptionsfaktor CAPRICE (Wada et al., 2002) sowie die MADS Domänen Transkriptionsfaktoren AGAMOUS (Urbanus et al., 2010) und GLOBOSA (Perbal et al., 1996). Die strenge Regulation des PD-Transports zeigt sich daran, dass Transkriptionsfaktoren nur über eine bis wenige Zellen transportiert werden (Nakajima et al., 2001; Kim et al., 2002; Kim et al., 2003; Burch-Smith et al., 2011). Der Transport des Homeodomainproteins KNOTTED1 (KN1) durch PD beruht neben einer Vergrößerung der Pore auch auf dessen Entfaltung (Kragler, 2013). Die korrekte Faltung von KN1 im Anschluss an dessen PD-Passage wird durch einen TypII Chaperoninkomplex, welcher auch den KN1-Interaktionspartner CCT8 enthält, vermittelt (Xu et al., 2011). Diese Ergebnisse lassen eine Beteiligung von Chaperonen für den selektiven Transport von Makromolekülen vermuten (Haywood et al., 2002). In Übereinstimmung dazu konnten Aoki et al. (2002) zeigen, dass ein Chaperon der HSP70-Klasse aus dem Phloemexudat von *Cucurbita maxima* das SEL von PD erhöhen kann und durch PD transportiert wird. Ebenso wurde in Tabak das endogene Protein NtNCAPP1 (*Nicotiana tabacum* NON-CELL-AUTONOMOUS PATHWAY PROTEIN1) identifiziert, welches eine ER-Lokalisation aufweist und das PD-Trafficking vieler Phloem-proteine ermöglicht (Lee et al., 2003; Taoka et al., 2007). Auch Pflanzenviren werden durch einen selektiven Transport durch PD transportiert, worauf in Punkt 1.2 noch genauer eingegangen wird.

Trotz der steigenden Anzahl an identifizierten NCAPs, sind die Mechanismen ihres Transports durch PD weitestgehend ungeklärt. Mutantenanalysen und Domänenshuffling mit bekannten NCAPs lassen jedoch erahnen, dass die Motive, welche den interzellulären PD-Transport vermitteln, hochdivergent sind (Lucas et al., 1995; Aoki et al., 2002; Kim et al., 2005; Lough et al., 2006; Thomas et al., 2008; Gallagher und Benfey, 2009; Vatén et al., 2011; Kragler, 2013).

1.1.4 Regulation des plasmodesmalen SEL

Anfänglich wurden PD als mehr oder weniger statische Poren betrachtet, durch die ein eher passiver Makromolekültransport erfolgt. Im Laufe der Jahre wurde jedoch deutlich, dass PD dynamische Kanäle darstellen und dass der plasmodesmale Transport ein spezifischer, hochkontrollierter und -regulierter Prozess ist. Die wichtigsten Mechanismen sollen im Folgenden kurz erläutert werden (zusammengefasst von Sager und Lee, 2014).

Ein Parameter für die längerfristige, bzw. andauernde Regulation des Zell-zu-Zell Transportes ist die Veränderung der Plasmodesmata-Frequenz. Zum einen können PD wie unter Punkt 1.1.2 erwähnt auch *de novo* in post-zytokinetischen Zellwänden

entstehen und zum anderen kann es auch zu einem kompletten Verschluss durch Ablagerung von Kallose und zum Abbau existierender PD kommen. Beispielweise kommt es bei der Reifung und Differenzierung von Schließzellen zu einer symplastischen Isolierung, d.h. einem kompletten Verlust der PD, welche diese mit den angrenzenden Epidermiszellen verbinden (Willmer und Sexton, 1979; Wille und Lucas, 1984). In sich verlängernden Baumwollfasern ist die vorübergehende Inhibierung der plasmodesmalen Konnektivität für die Aufrechterhaltung des für die Elongation notwendigen Turgors unabdingbar (Ruan et al., 2001). Zusätzlich kann das plasmodesmale SEL auch durch strukturelle Veränderungen existierender PD, insbesondere durch die Integration von Verzweigungen und mehreren Kanälen, beeinflusst werden (Ehlers und Kollmann, 2001). So sind verzweigte PD-Strukturen, welche hauptsächlich in ausgereiften Geweben zu finden sind, durch ein reduziertes SEL gekennzeichnet, während simple PD in Sink-geweben eine erweitere PD-Pore aufweisen (Oparka et al., 1999; Crawford und Zambryski, 2000). Ein extremes Beispiel für die Modifizierung von PD stellt die Bildung von Siebporen dar. Diese entstehen ursprünglich aus primären PD durch eine Hyperakkumulation von Kallose und der darauffolgenden Entfernung des Desmotubulus mit erneutem Abbau der Kallose (Esau und Thorsch, 1984, 1985).

Im Gegensatz dazu erfordert die Reaktion auf Umwelteinflüsse oder physiologische Bedingungen eine schnelle Regulation des plasmodesmalen Transports. Eine Schlüsselrolle nimmt hierbei die gezielte Ablagerung von Kallose, einem ß-1,3-Glukan, in der PD *neck region* ein (Chen und Kim, 2009; Epel, 2009; Hofmann et al., 2010). Durch die konzertierte Aktion von Kallose-Synthasen und Glukanasen für die Synthese, bzw. für den Abbau, wird die Kalloseablagerung streng reguliert (Dong et al., 2008; Zavaliev et al., 2010; Rinne et al., 2011). In Arabidopsis gibt es insgesamt zwölf Gene, die für Glukan Synthasen (*Callose Synthase*, CALS) kodieren (Saxena und Brown Jr, 2000; Verma und Hong, 2001). Speziell für CALS3, CALS7 und CALS10 konnte eine Wirkung auf den molekularen Transport über PD oder Siebelemente demonstriert werden (Guseman et al., 2010; Barratt et al., 2011; Vatén et al., 2011; Xie et al., 2011). Der Abbau von Kallose erfordert die Beteiligung von ß-1,3-Glukanasen (Glykosyl Hydrolasen), von denen im Arabidopsis-Genom insgesamt etwa 50 vorhanden sind. Doch nur Glukanasen der Glycosylphosphatidylinositol-verankerten Glykosyl Hydrolase Famile 17 üben einen Einfluss auf die Kalloseablagerung an PD aus und sind an Prozessen wie z.B. der Brechung der Keimruhe oder dem lateralen Wurzelwachstum beteiligt (Levy et al., 2007; Rinne et al., 2011; Zavaliev et al., 2011; Benitez-Alfonso et al., 2013). Zusätzliche Komplexität ergibt sich durch die Beeinflussung der Kalloseablagerung durch weitere Faktoren. Beispielsweise resultiert die Überexpression der PD-assoziierten Proteine

PDCB1 und RGP2 in einer Hyperakkumulation von Kallose und einer Reduktion des SEL (Simpson et al., 2009; Zavaliev et al., 2010). Zudem offenbarten mehrere Studien einen Zusammenhang zwischen Kallose und der Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) wie Wasserstoffperoxid und Superoxid. So induzierte eine Aluminium- oder Cadmium-Exposition die ROS-Produktion und Kalloseablagerung, was eine reduzierte interzelluläre Verbreitung von symplastischen Farbstoffen bewirkte (Sivaguru et al., 2000; Ueki und Citovsky, 2005; Jones et al., 2006). Ebenso konnte der Einfluss von ROS durch Mutantenanalysen manifestiert werden. Mutanten, die in der Synthese des lipophilen Antioxidants Tocopherol betroffen waren, wiesen eine erhöhte Kalloseablagerung an PD und eine reduzierte PD-Permeabilität auf (Russin et al., 1996; Botha et al., 2000; Hofius et al., 2004). Weiterhin brachte ein *screening* nach Mutanten mit einer gestörten Phloementladung von freiem GFP unter Kontrolle des Geleitzell-spezifischen AtSUC2-Promotors (pSUC2:GFP) die Mutante *gat1* (*gfp arrested trafficking 1*) zum Vorschein, bei der das plastidäre Thioredoxin m3 (TRX-m3), ein ROS-detoxifizierendes Enzym, mutiert ist (Benitez-Alfonso et al., 2009). Dementsprechend konnten auch in der Mutante *gat1* erhöhte ROS-Level und eine Hyperakkumulation von Kallose detektiert werden (Benitez-Alfonso et al., 2009; Benitez-Alfonso und Jackson, 2009). Die Überexpression von TRX-m3 im Blattgewebe resultierte übereinstimmend dazu in einer erhöhten Verteilung von GFP (Benitez-Alfonso et al., 2009). In einem Mutantenscreening nach Arabidopsis-Embryonen mit einer vermehrten symplastischen Verteilung des Markers HPTS und somit einem erhöhten SEL, konnten die Gene *ISE1* und *ISE2* (*increased size exclusion limit*) identifiziert werden, welche für eine mitochondriale DEAD-box RNA Helikase und eine DEVH-box RNA Helikase kodieren (Kim et al., 2002; Kobayashi et al., 2007; Stonebloom et al., 2009; Burch-Smith und Zambryski, 2010). Eine Mutation dieser Gene führte zu einem erhöhten SEL und einer erhöhten Frequenz an verzweigten PD und *twinned* PD (Burch-Smith und Zambryski, 2010). Interessanterweise resultierte das Silencing von *ISE1* in einer Erhöhung der ROS-Konzentration (Stonebloom et al., 2009). In diesem Zusammenhang wurde in einer unabhängigen Studie eine Beteiligung ROS-produzierender Enzyme an Prozessen der Zellwand-Remodellierung postuliert (Liu et al., 2014). Die eben beschriebenen Mutantenanalysen illustrieren die Divergenz der Ergebnisse bezüglich der Bedeutung der ROS-Konzentration für die plasmodesmale Konnektivität. Möglicherweise scheint dabei der Ort der ROS-Produktion, also Mitochondrien versus Chloroplasten, einen unterschiedlichen Einfluss auszuüben, was die gegensätzlichen Effekte einer erhöhten ROS-Konzentration in *ise1*- und *gat1*-Mutanten erklären könnte. Die Dosis-abhängige Wirkung von H_2O_2 wurde in einer neueren Studie von Rutschow et al. (2011) demonstriert, welche

die Diffusionsrate durch PD in Wurzeln von Arabidopsis mittels Carboxyfluorescein und FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) ermittelten. Dabei bewirkte eine zweistündige Applikation von H_2O_2 in geringen Konzentrationen von 0,6 mM einen Anstieg der plasmodesmalen Konnektivität um den Faktor 2, wohingegen eine hohe H_2O_2-Konzentration von 6 mM diese fast vollständig zum Erliegen brachte.

Des Weiteren konnte auch eine Beteiligung von Pflanzenhormonen an der Regulation des plasmodesmalen SEL gezeigt werden. So bewirkt die Aktivierung des Salicylsäure-Biosyntheseweges das Verschließen der PD durch die Induktion von PDLP5, indem PDLP5 die Ablagerung von Kallose durch Aktivierung von Kallose-Synthasen über einen bisher unbekannten Mechanismus hervorruft (Lee et al., 2011; Wang et al., 2013; Sager und Lee, 2014). Weiterhin resultierte bei Arabidopsis-Keimlingen die Applikation von Salicylsäure in einem verstärkten Auftreten verzweigter PD-Strukturen (Fitzgibbon et al., 2013). Das Phytohormon Gibberelinsäure (GA) bewirkt den gegenteiligen Effekt und ist an der Erweiterung der PD-Pore beteiligt. Wie bereits erwähnt kommt es während der Dormanz zu einer kompletten Versiegelung der PD durch die Ablagerung von Kallose, was z.B. im apikalen Sprossmeristem in Birkenpflanzen durch eine inhibierte Ausbreitung des mikroinjizierten Farbstoffes LYCH visualisiert werden konnte (Rinne et al., 2001). Die Brechung der Dormanz durch Kältebehandlung führte zu einem Abbau der PD-Kallose, was mit einer Wiederherstellung der symplastischen Verbreitung des Farbstoffes einherging (Rinne et al., 2001). Eine spätere Studie konnte zeigen, dass durch die Kältebehandlung Gene der GA-Biosynthese induziert werden und dass daraufhin Gibberelin GA_3 die ß-1,3-Glukanasen der GH17 Familie induziert (Rinne et al., 2011). Es wird davon ausgegangen, dass diese Glukanasen während der Dormanz im apikalen Sprossmeristem in sogenannten *lipid bodies*, welche mit dem kortikalen ER assoziiert sind, lokalisieren. Bei der Brechung der Dormanz werden diese *lipid bodies* zu PD und an Siebplattenporen transportiert, wo die freigesetzten Glukanasen den Abbau der Kallose bewirken. Durch einen Anstieg der Temperatur wird schließlich Gibberelin GA_4 aktiviert, welches daraufhin weitere ß-Glukanasen induziert, was zu einem vollständigen Abbau der Kallose an PD in Zellen des apikalen Sprossmeristems führt (Rinne et al., 2001; Rinne et al., 2011; Sager und Lee, 2014).

Pysiologische Experimente ergaben, dass die PD-Permeabilität höherer Pflanzen durch Veränderungen des cytoplasmatischen Calciumgehaltes beeinflusst wird und ein Anstieg in cytosolischem freiem Calcium zu einem Verschließen der PD führt (Tucker, 1990; Tucker und Boss, 1996; Holdaway-Clarke et al., 2000). Die Annahme einer Calcium-abhängigen Regulation des plasmodesmalen SEL wird durch die PD-Lokalisation von Centrin, einem Calcium-regulierten kontraktilen Zytoskelettprotein, sowie Calreticulin,

einem Calcium-bindenden Protein, unterstützt (Baluška et al., 1999; Blackman et al., 1999; Baluška et al., 2001).

1.1.5 Identifizierung von Plasmodesmata-Proteinen

Wie bereits erwähnt, konnten die ersten PD-Elemente, hauptsächlich Strukturelemente wie Myosin und Aktin, durch Elektronenmikroskopie ermittelt werden. Diese wurden im weiteren Verlauf über Immunlokalisationsstudien bestätigt und näher charakterisiert (Olesen, 1979; Badelt et al., 1994; White et al., 1994; Overall und Blackman, 1996; Blackman und Overall, 1998; Blackman et al., 1999; Reichelt et al., 1999; Faulkner et al., 2008; Faulkner et al., 2009). Dadurch konnten einige PD-Grundbausteine identifiziert werden, eine genaue Bestimmung dieser Proteine war jedoch nicht möglich (Faulkner und Maule, 2011).

Ein Ansatz, der eben dies ermöglichen sollte, war die proteinbiochemische Isolation von PD-Proteinen aus Zellwandpräparationen aus Mais, Arabidopsis oder der Grünalge *Chara corallina* (Epel et al., 1995; Epel et al., 1996; Bayer et al., 2004; Faulkner et al., 2005; Bayer et al., 2006; Levy et al., 2007). In ersten Zellwandpräparationen aus Mais Mesokotyl und Arabidopsis konnten beispielsweise RGP2 (*reversibly glycosylated polypeptide 2*) und die ß-1,3-Glukanase AtBG_ppap als PD-Proteine identifiziert werden, wobei beide Proteine einen Einfluss auf die plasmodesmalen Kalloselevel ausüben (Sagi et al., 2005; Levy et al., 2007). So induziert die Überexpression des Arabidopsis-Homologs AtRGP2 in *Nicotiana tabacum* die Ablagerung von Kallose an PD, was mit einer reduzierten Verteilung von Photoassimilaten und einer verminderten TMV-Verbreitung einhergeht (Zavaliev et al., 2010). Ebenso sind AtBG-ppap *knockout*-Pflanzen durch eine verminderte Ausbreitung von GFP gekennzeichnet (Levy et al., 2007). Im weiteren Verlauf konnte die Anreicherung von PD-Fraktionen durch die Verwendung von Zellsuspensionssystemen aufgrund der einfacheren Disruption der Zellen optimiert werden. PD-angereicherte Zellwandfraktionen aus Tabak BY2-Zellen brachten u.a. NCAPP1 (NON-CELL-AUTONOMOUS PROTEIN PATHWAY 1) (Lee et al., 2003), Hsp70- und Hsp40-Proteine (Aoki et al., 2002) sowie die PD-assoziierte Proteinkinase PAPK1 (Lee et al., 2005) zum Vorschein. Interessanterweise konnte für PAPK1 die Phosphorylierung des TMV MP30 C-Terminus *in vitro* gezeigt werden (Lee et al., 2005). Bayer et al. (2006) gelang es, die Kontaminationen in ihren PD-angereicherten Zellwandfraktionen aus Arabidopsis Suspensionskulturen durch Intensivierung der Fragmentierung und der Waschschritte drastisch zu minimieren. Durch eine Kombination aus 2D-Flüssigchromatographie und Tandemmassenspektrometrie konnten insgesamt

792 Protein identifiziert werden, von denen mittels bioinformatischer Analysen 89 Proteine entweder als klassische Zellwandproteine oder als Zellwand-assoziierte Membranproteine klassifiziert wurden (Bayer et al., 2006). Im Anschluss wurde deren Lokalisation über N-, und C-terminale GFP-Fusionen analysiert. Diese Analysen brachten zwei neue Klassen an PD-Proteinen zum Vorschein, zum einen PDLP1 (*Plasmodesmata-located protein 1*; Thomas et al., 2008) und zum anderen PDCB1 (*PD-callose-binding protein 1*; Simpson et al., 2009). PDLP1 gehört zu einer pflanzenspezifischen Proteinfamilie von Typ-1-Transmembranproteinen. Im Anschluss an ein N-terminales Signalpeptid und zwei extrazelluläre DUF26 Domänen sind sie durch eine einzige Transmembrandomäne und einen kurzen cytoplasmatischen C-terminalen Schwanz gekennzeichnet, wobei die 21 Aminosäuren lange Transmembrandomäne das plasmodesmale Targeting vermittelt (Thomas et al., 2008). Die Überexpression von PDLP1 führt zu einer beeinträchtigten Diffusion von freiem GFP, wohingegen bestimmte Doppel-*knockouts* eine erhöhte Verteilung des Fluorophors aufweisen (Thomas et al., 2008). PDLP1 ist eines der wenigen Beispiele eines PD-lokalisierten Proteins, welches auch eine Rezeptorfunktion für Movementproteine von Tubuli-bildenden Viren ausübt (Amari et al., 2010). Über FRET-FLIM (*Förster Resonance Energy Transfer Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy*) konnten Amari et al. (2010) die direkte Interaktion von PDLP1 - und auch den anderen PDLPs - mit den Movementproteinen der Tubuli-bildenden Viren *Grapevine fanleaf virus* und *Cauliflower mosaic virus* an der Tubuli-Basis zeigen. In Übereinstimmung hierzu ist die Ausbildung der Tubuli und dadurch auch die Virusverbreitung in *pdlp1-pdlp2-pdlp3* Triplemutanten deutlich reduziert (Amari et al., 2010). PDCB1 gehört ebenfalls zu einer größeren Proteinfamilie und ist ein GPI-verankertes Protein, welches eine N-terminale extrazelluläre X8-Domäne mit Kallosebindeaktivität, sowie einen C-terminalen unstrukturierten Arm aufweist (Simpson et al., 2009). Es wird postuliert, dass PDCB eine Ankerfunktion zwischen der extrazellulären Plasmamembran und den Kalloseablagerungen in der Zellwand an PD ausübt, was auch auf eine Beteiligung an der Regulation des plasmodesmalen SEL schließen lässt. Dementsprechend resultiert die Überexpression von PDCB1 in einer Hyperakkumulation von Kallose und einer reduzierten Verbreitung von freiem GFP (Simpson et al., 2009). Fernandez-Calvino et al. (2011) kombinierten schließlich die Methoden von Bayer et al. (2006) und Levy et al. (2007), indem sie die Zellwand von Arabidopsis Suspensionszellkulturen vor der Präparation enzymatisch verdauten und anschließend sensitivere Detektionssysteme, genauer *nano-liquid chromatography* und *Orbitrap ion-trap tandem mass spectrometer*, einsetzten. Auf diese Weise konnten insgesamt 1341 Proteine identifiziert werden, wobei 35 % als Kontaminationen und 21 % als Membranproteine definiert wurden. Von 15

ausgewählten analysierten Proteinen aus der Gruppe der Membranproteine konnte bisher für drei Rezeptor-ähnliche Kinasen, ein Tetraspanin und ein Protein mit unbekannter Funktion eine Lokalisierung an PD detektiert werden (Fernandez-Calvino et al., 2011).

Neben den soeben beschriebenen vielversprechenden Proteomanalysen gab es auch noch andere Ansätze zur Identifizierung von plasmodesmalen Komponenten. Die generelle Bedeutung der Zell-Zell Kontakte stellt eine große Hürde für die genetische Identifizierung von PD-Komponenten dar, da davon auszugehen ist, dass das Ausschalten von Genen, die essentiell für die Struktur und Funktion von PD sind, letal ist. So konnten bislang durch vorwärts gerichtete genetische Mutantenscreenings keine direkten PD-Proteine identifiziert werden. Zwei Ansätze basierten auf einer Mutagenese von Markerlinien, welche GFP unter Kontrolle des Geleitzellen-spezifischen AtSUC2-Promotors exprimieren, mit anschließender Durchmusterung nach einem veränderten symplastischen Movement von GFP. Wenig et al. (2013) identifizierten die Mutante *main-1* (*maintenance of meristems*). Das kernlokalisierte Protein MAIN ist Mitglied einer bisher nicht charakterisierten pflanzenspezifischen Proteinfamilie und scheint ein essenzieller Faktor für den Erhalt der Meristeme und der Genomintegrität in meristematischen Zellen zu sein (Wenig et al., 2013). Ein unabhängiges Screening von Benitez-Alfonso et al. (2009) brachte eine weitere Mutante namens *gat1* (*gfp-arrested trafficking 1*) mit reduzierter Entladung von GFP und Mutation im plastidären Thioredoxin TRX-m3 zum Vorschein. Wie bereits unter Punkt 1.1.4 näher erläutert, war dies jedoch eher die Folge eines indirekten Effektes durch eine Veränderung des ROS-Levels. Gleiches gilt auch für die Mutante *ise1* (i*ncreased size exclusion limit 1*), welche eine erhöhte symplastische Verteilung des Markers HPTS aufwies und bei der eine mitochondriale DEAD-box RNA Helikase mutiert war (Kim et al., 2002; Kobayashi et al., 2007; Stonebloom et al., 2009; Burch-Smith und Zambryski, 2010). Ein Screening nach Regulatoren der Schließzellen-Strukturierung führte zur Isolierung der Mutante *chorus* (*chor*), die eine erhöhte makromolekulare Diffusionsrate zwischen Epidermiszellen zeigte (Guseman et al., 2010). Die durch CHOR kodierte Kallosesynthase GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8 (GSL8) ist an der Ablagerung von Kallose an der Zellplatte, den Zellwänden und an PD beteiligt. Dies lässt darauf schließen, dass eine Drosselung der symplastischen Konnektivität für die Stomata-Entwicklung erforderlich ist. Xu et al. (2011) entwickelten einen Screening-Ansatz für KNOTTED1 Trafficking-Mutanten. Hierfür wurde der Myb-Transkriptionsfaktor GLABROUS1, der für die Trichombildung in Epidermiszellen erforderlich ist, an die für das Trafficking verantwortliche C-terminale Homeodomäne von KNOTTED1 ($KN1^C$) und an GFP fusioniert und das Fusionsprotein GFP-GL1-$KN1^C$ in der Trichom-defizienten Mutante *gl1* exprimiert. Die Samen der erhaltenen Linie wurden einer EMS-Mutagenese

unterzogen. Für die in der Durchmusterung von Keimlingen der M2-Generation identifizierte Untereinheit des Typ II Chaperoninkomplexes, CCT8, wird eine Beteiligung an der Neufaltung von KN1 und anderen nicht-zellautonomen Proteinen im Anschluss an den Transport durch PD postuliert (Xu et al., 2011; Fichtenbauer et al., 2012).

Eine Methode, die bisher nur wenig vielversprechend zu sein scheint, ist die Durchmusterung von cDNA-Banken. Escobar et al. (2003) fusionierten beispielweise eine cDNA-Bank aus *Nicotiana benthamina* an GFP und analysierten die Lokalisierung in Tabak nach erfolgreicher Expression über einen TMV-basierten Expressionsvektor. Auf diese Weise konnte für zwölf Fusionsproteine eine Lokalisation an PD detektiert werden, so z.B. für das Ras-ähnliche Protein Rab11 (Escobar et al., 2003). Jedoch scheiterte die Bestätigung dieses Lokalisierungsmusters mit den Volllängen cDNAs (Faulkner und Maule, 2011).

Eine Übersicht der Lokalisation der wichtigsten bisher identifizierten PD-Proteine ist in Abbildung 1 zu erkennen.

1.2 Pflanzenviren

Pflanzenviren gehören neben Bakterien, Pilzen und Nematoden zu der Gruppe der Hauptpflanzenpathogene. Sie nehmen jedoch eine Sonderstellung ein, da sie ausschließlich im Symplasten der Pflanze zu finden sind (Schoelz et al., 2011). Eine erfolgreiche Verbreitung in der Pflanze basiert bei nicht Phloem-begrenzten Viren zunächst auf einem effizienten Zell-zu-Zell Transport vom Infektionsort zu den benachbarten Zellen der Epidermis und des Mesophylls innerhalb des lokal infizierten Blattes. Die systemische Ausbreitung erfolgt schließlich mit dem Phloemstrom von Sourcegeweben zu Sinkgeweben (Leisner und Turgeon, 1993). Der Eintritt in das Phloem ausgehend vom Mesophyll erfordert jedoch den Transport des Virusgenoms über verschiedene Zelltypen - den Bündelscheidenzellen, Phloemparenchymzellen und Geleitzellen - hinweg. Diese können sich in Form, Anzahl und Verteilung der PD deutlich unterscheiden (Turgeon und Wolf, 2009; Ehlers und van Bel, 2010; Fitzgibbon et al., 2010). Um ihre Verbreitung in der Pflanze zu gewährleisten, haben Pflanzenviren ein hochentwickeltes System etabliert. Zum einen kodieren sie für spezialisierte Transportproteine, welche auch als Movementproteine (MP) bezeichnet werden. Diese besitzen die Fähigkeit, virale RNA/DNA zu binden sowie zu PD modifizieren. Zum

anderen rekrutieren Pflanzenviren auch endogene Proteine für ihren inter- und intrazellulären Transport.

1.2.1 Transportstrategien pflanzlicher Viren

Pflanzenviren sind mit einem Durchmesser der Viruspartikel von 10-200 nm viel zu groß, um über passiven Transport durch eine unmodifizierte PD-Pore zu gelangen (Scholthof, 2005). Deshalb haben die verschiedenen Virusfamilien für ihren Transport unterschiedliche Strategien entwickelt, von denen die wichtigsten im Folgenden kurz erläutert werden sollen. Generell kann zwischen einem Tubuli-unabhängigen Transport und einem Tubuli-vermittelten unterschieden werden. Einige Virusfamilien, wie z.B. Tobamoviren mit dem *Tobacco mosaic virus* (TMV) als bekanntesten Vertreter, benötigen für den Tubuli-unabhängigen Transport nur ein einzelnes hochspezialisiertes MP, welches das Virusgenom direkt bindet und einen Nukleoproteinkomplex bildet. Durch die Lokalisation des MP an PD und Modifikation des plasmodesmalen SEL wird schließlich der Transport des Nukleoproteinkomplexes in die Nachbarzellen ermöglicht (Ghoshroy et al., 1997; Lazarowitz und Beachy, 1999). Die stabile Expression des TMV MP30 resultierte dementsprechend in einer Erhöhung des SEL von 1 kDa auf 10 kDa in Tabakmesophyllzellen (Wolf et al., 1989). Alternativ dazu kodieren einige Virusfamilien, wie z.B. Carmoviren oder Hordeiviren, für zwei, bzw. drei Movementproteine, welche demzufolge als *double gene block* oder *triple gene block* bezeichnet werden, und unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Das TGBp1 Protein von Hordeiviren ist beispielsweise an der Bildung des Nukleoproteinkomplexes beteiligt. Dieser assoziiert an die integralen Membranproteine TGBp2 und TGBp3 und gelangt über TGBp3-vermitteltes Targeting an PD. Dort bewirken TGBp2 und TGBp3 vermutlich durch die Interaktion mit PD-Rezeptorproteinen eine Vergrößerung der Pore mit anschließendem Transport des TGBp1-vRNA Komplexes durch die Pore (McGeachy und Barker, 2000; Morozov und Solovyev, 2003; Lim et al., 2008; Jackson et al., 2009; Niehl und Heinlein, 2011). Der Zell-zu-Zell Transport anderer Virusfamilien erfordert zusätzlich zu einem oder mehreren MP noch die Beteiligung weiterer Proteine. Potexviren wie der *Potato virus X* benötigen zusätzlich zum TGB noch das Capsidprotein (CP) für ihre Verbreitung (Chapman et al., 1992; Verchot-Lubicz, 2005). Ebenso ist die Ausbreitung von Bromoviren wie dem *Brome mosaic virus* und dem *Cucumber mosaic virus* CP-abhängig (Takeda et al., 2004; Sasaki et al., 2005). Closteroviren, wie z.B. der *Beet yellows virus* (BYV), benötigen sogar mehrere Proteine für ihren interzellulären Transport, darunter auch ein HSP70-Homolog (Karasev et al., 1992; Medina et al., 1999; Peremyslov et al., 1999; Alzhanova et al.,

2001; Dolja et al., 2006). Ein Extrembeispiel stellen Potyviren dar, die kein spezielles Movementprotein aufweisen und deren Transport auf einem Zusammenspiel von mindestens vier multifunktionalen Proteinen basiert (Revers et al., 1999; Wen und Hajimorad, 2010; Vijayapalani et al., 2012). Geminiviren setzen zudem ein *nuclear shuttle protein* ein, welches das ssDNA-Genom zum Zwecke der Replikation in den Kern transportiert. Im Anschluss werden DNA-NSP Komplexe in das Cytoplasma transportiert, wo sie mit dem MP interagieren und zu PD transportiert werden (Niehl und Heinlein, 2011; Fondong, 2013; Hanley-Bowdoin et al., 2013).

Im Gegensatz zu den eher gemäßigten Veränderungen der PD-Struktur bei den eben beschriebenen Transportvarianten, ist der Tubuli-vermittelte Transport durch eine drastische strukturelle Modifikation der PD-Pore gekennzeichnet. So kommt es zu einer MP-induzierten Ausbildung tubulärer Strukturen über die komplette Pore hinweg, was mit einer Deletion des Desmotubulus einhergeht. Diese Tubuli ermöglichen eine Virusverbeitung in Form von Virionen mit einem Durchmesser von bis zu 50 nm (Schoelz et al., 2011). Diese Transportform ist bei RNA-Viren wie auch bei DNA-Viren zu finden (Perbal et al., 1993; Storms et al., 1995; Pouwels et al., 2004; Sánchez-Navarro et al., 2010).

1.2.2 Interaktion mit Wirtsfaktoren

Sowohl der intrazelluläre Transport von MP und MP-RNA Komplexen zu den PD als auch der interzelluläre Transport derselben durch die Pore erfordert eine Interaktion mit Wirtsfaktoren. In diesem Zusammenhang konnten eine Vielzahl verschiedenster Interaktionen durch diverse Methoden gezeigt werden (zusammengefasst von Niehl und Heinlein, 2011). Pflanzenviren machen sich häufig Elemente des Zytoskeletts für ihre Verbreitung zunutze. So belegen zahlreiche Studien die Bedeutung von Aktin (McLean et al., 1995; Prokhnevsky et al., 2005; Wright et al., 2007; Harries et al., 2009; Harries et al., 2009; Genoves et al., 2010; Su et al., 2010; Feng et al., 2013) und Mikrotubuli (Heinlein et al., 1995; McLean et al., 1995; Boyko et al., 2000; Boyko et al., 2000; Boyko et al., 2000; Boyko et al., 2002; Ashby et al., 2006; Ferralli et al., 2006; Seemanpillai et al., 2006; Boyko et al., 2007; Sambade et al., 2008; Ouko et al., 2010) sowie deren Motorproteinen Myosin (Prokhnevsky et al., 2005; Avisar et al., 2008; Harries et al., 2009; Amari et al., 2011; Yuan et al., 2011; Agbeci et al., 2013) und Kinesin/Dynein (von Bargen et al., 2001; Paape et al., 2006) für die Virusverbreitung. Ebenso scheinen Interaktionen mit der Transportmaschinerie des Vesikeltraffickings (Huang et al., 2001; Laporte et al., 2003; Kaido et al., 2007; Lewis und Lazarowitz, 2010; Kramer et al., 2011; Carluccio et al., 2014) sowie dem Chaperonsystem (Soellick et al., 2000; von Bargen et al., 2001; Hofius

et al., 2007; Lu et al., 2009; Shimizu et al., 2009; Krenz et al., 2010; Fichtenbauer et al., 2012; Krenz et al., 2012; Mathioudakis et al., 2012; Du et al., 2013; Gorovits et al., 2013) eine zentrale Rolle für den Transport zu spielen. Die Wechselwirkung mit Kinasen kann für das *trafficking* viraler Movementproteine notwendig sein, da deren volle Funktionsfähigkeit häufig auf einer, bzw. mehreren Phosphorylierungen basiert (Lee et al., 2005; Lee, 2008). Kürzlich konnte die Interaktion zwischen dem Raft-Protein Remorin und TGB1, dem PVX Movementprotein, gezeigt werden, was die generelle Bedeutung der Lipidzusammensetzung der PD-Pore unterstreicht (Raffaele et al., 2009; Perraki et al., 2014).

Eine Sonderstellung unter allen bekannten Interaktionen zwischen viralen Proteinen und Wirtsfaktoren nehmen jedoch die Mitglieder der PDLP1-Familie ein, da diese bisher die einzigen PD-lokalisierten Proteine darstellen, die als Rezeptoren für Tubuli-bildende virale Movementproteine fungieren (Thomas et al., 2008; Amari et al., 2010). Amari et al. (2010) demonstrierten die Interaktion von PDLP1 - und auch den anderen Mitgliedern der PDLP-Familie - mit den Movementproteinen des *Grapevine fanleaf virus* sowie des *Cauliflower mosaic virus* und die Bedeutung dieser Interaktion für die Ausbildung der tubulären Strukturen.

1.2.3 MP17 – das Movementprotein des *Potato leafroll virus*

Für die Analyse der inter- und intrazellulären Transportmaschinerie wurde in dieser Arbeit das 17 kDa große Movementprotein (MP17) des *Potato leafroll virus* (PLRV; Familie *Luteoviridae*, Genus *Polerovirus*) verwendet. PLRV verfügt über ein 5,8 kb großes einzelsträngiges (+) RNA Genom, welches für acht offene Leserahmen kodiert (Taliansky et al., 2003). MP17 wird von ORF4 exprimiert und erfüllt die drei Schlüsselqualifikationen viraler MP. Über Immunogold-Experimente und GFP-Fusionen in Tabak konnte gezeigt werden, dass MP17 in Sourceblättern an verzweigte Plasmodesmata lokalisiert und zu einer Erhöhung des SEL der PD zwischen Tabakmesophyllzellen führt (Hofius et al., 2001). Weiterhin wurde bestätigt, dass MP17 in der Lage ist, seine eigene virale RNA zu binden (Tacke et al., 1991). In *Arabidopsis thaliana* führt die konstitutive Expression von MP17 oder MP17 mit C-terminaler GFP-Fusion (MP17:GFP) unter der Kontrolle des CaMV-Promotors in der Arabidopsis-Linie mit der stärksten Expression (Col-16) zu einem Kohlenhydratexportblock, der sich phänotypisch durch eine Wuchsretardierung und der Ausbildung von chlorotischen Sourceblättern äußert (Kronberg et al., 2007). MP17 lokalisiert ausschließlich an verzweigte PD-Strukturen (Abbildung 2), welche überwiegend in Sourcegeweben zu finden sind (Hofius et al., 2007; Kronberg et al., 2007; Vogel et al.,

2007). Im Unterschied dazu bindet das Movementprotein des *Tobacco mosaic virus* (MP30) auch an simple PD-Strukturen, die aus einer einzigen, unverzweigten Pore bestehen und in noch unentwickelten Sinkgeweben dominieren (Burch-Smith et al., 2011). Aufgrund der fehlenden Bindung von MP17 an diese PD-Typen, erfolgt in Sinkgeweben der Abbau von MP17 über das 26S-Proteasom. Während der Seneszenz kommt es zu einer allmählichen Verringerung der plasmodesmalen Assoziation von MP17, was wahrscheinlich auf strukturelle Veränderungen der PD in diesem Entwicklungsstadium zurückzuführen ist (Kronberg et al., 2007). Durch die Verwendung von chemischen Inhibitoren konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass der Transport von MP17 zu PD die Beteiligung von Aktinfilamenten sowie dem ER-Golgi-Transportsystem erfordert (Vogel et al., 2007).

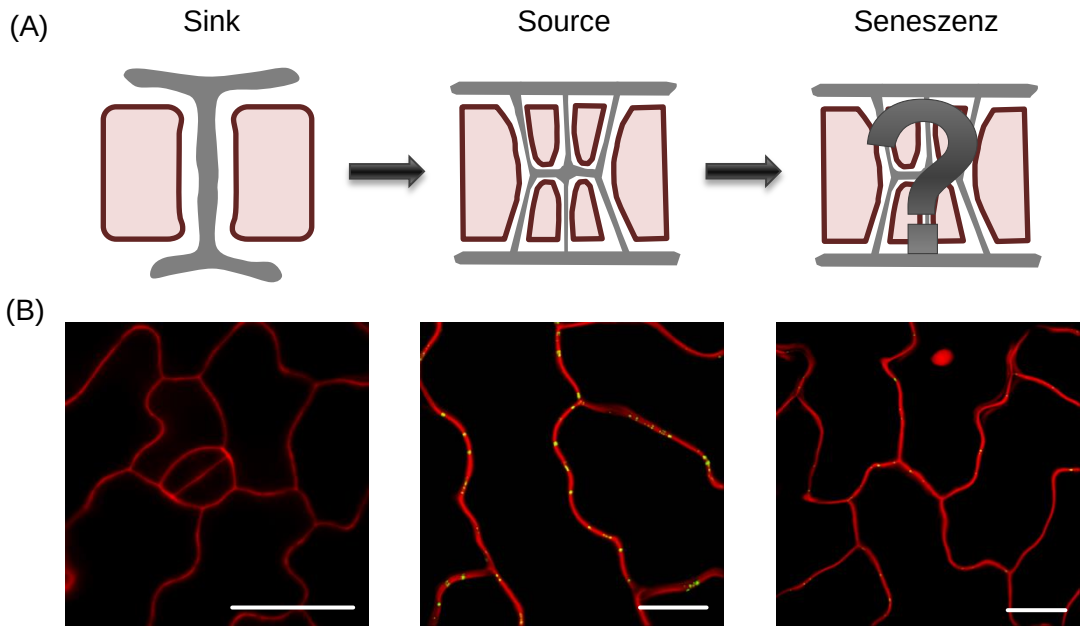

Abbildung 2: Zusammenhang zwischen Plasmodesmatastruktur und der PD-Lokalisation von MP17. (A) Die obere Reihe zeigt eine schematische Darstellung der Plasmodesmatastruktur in den verschiedenen Entwicklungsstadien, wobei Zellwände rot und Desmotubulusstrukturen grau dargestellt sind. In Sinkgeweben sind überwiegend simple PD in Form einer einfachen Pore zu finden. Mit zunehmendem Blattalter erfolgt ein Shift zu verzweigten PD-Strukturen. Während der Seneszenz erfolgen vermutlich weitere strukturelle Veränderungen. (B) Repräsentative KLSM-Aufnahmen der MP17-Lokalisation an PD für die drei Entwicklungsstadien in der Arabidopsis-Linie Col-16. MP17:GFP Fluoreszenz ist grün dargestellt, die Zellwände wurden durch Propidiumiodid rot gefärbt; Größenstandard entspricht 20 µm (Sink), 17 µm (Source) und 24 µm (Seneszenz).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Der pflanzliche Makromolekültransport ist ein komplexer Prozess. Die beteiligten Komponenten und Mechanismen sind jedoch auch nach jahrelanger Forschung noch weitestgehend ungeklärt. Pflanzenviren haben sich dieses Transportsystem der Pflanzen für ihre Verbreitung von Zelle zu Zelle zunutze gemacht, indem sie endogene Wirtsfaktoren für den Transport viraler RNA verwenden und modifizieren. Die Lokalisation viraler Movementproteine an PD macht diese zu besonders geeigneten Werkzeugen, um bislang unbekannte Plasmodesmataproteine, für die Virusverbreitung erforderliche Interaktionen mit Wirtsfaktoren sowie Mechanismen des pflanzlichen Makromolekültransportes zu entschlüsseln.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die molekulare Analyse der plasmodesmalen Assoziation des viralen Movementproteins MP17 des PLRV durch verschiedene Ansätze erfolgen.

1) Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem plasmodesmalen Targeting von MP17. Zunächst sollte durch die Herstellung von N-, und C-terminalen MP17 Deletionsmutanten die verantwortliche Domäne für die Lokalisation von MP17 an Plasmodesmata identifiziert und im Anschluss deren Struktur bestimmt werden. Über besondere Merkmale, wie etwa Ansammlungen von Ladungen oder hydrophobe Bereiche, und Interaktionsstudien könnten somit möglicherweise weitere PD-Komponenten identifiziert werden. Bisherige Analysen konnten für MP17 zudem eine Phosphorylierung *in planta* an vier Serinresten nachweisen. Aus diesem Grund sollte anhand einer gerichteten Mutagenese überprüft werden, ob die Phosphorylierung von Serin-/Threoninresten auch für die Lokalisation und Funktion von MP17 von Bedeutung ist. Weiterhin sollte die Rolle der Lysinreste für den Abbau von MP17 in Sinkgeweben ermittelt werden.

2) Der Hauptaugenmerk der Arbeit lag allerdings auf der Identifizierung von Plasmodesmatakomponenten und Wirtsfaktoren, die das Targeting von MP17 an PD beeinflussen. Das Ziel bestand darin, zum einen sogenannte *change of function* Mutanten, d.h. Mutanten mit veränderten plasmodesmalen Bindungs- und Transporteigenschaften, zu identifizieren, sowie zum anderen putative MP17-Rezeptoren, bzw. PD-assoziierte MP17-Bindungspartner zu isolieren. In diesem Zusammenhang erfolgte eine Durchmusterung von EMS-mutagenisierten Samen der Arabidopsis-Linie Col16, welche MP17:GFP konstitutiv unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert, nach

(I) Sourcemutanten, die sich durch eine Reduktion, beziehungsweise einen kompletten Verlust, der MP17:GFP Fluoreszenz in Sourceblättern auszeichnen

(II) Seneszenzmutanten, die eine unverändert starke plasmodesmale Assoziation von MP17:GFP in seneszierenden Blättern aufweisen.

2 Ergebnisse

2.1 Identifizierung der für die PD-Lokalisation von MP17 verantwortlichen Aminosäure-Motive

2.1.1 Generierung und Analyse von MP17-Deletionsmutanten

Bisherige Studien konnten zeigen, dass für Proteininteraktionen vor allem nicht-globuläre, unstrukturierte Bereiche innerhalb eines Proteins von Bedeutung sind, die sich häufig durch das Vorhandensein kurzer, linearer Peptidmotive, wie etwa der SH3-Bindestelle, auszeichnen (Linding et al., 2003). Zur Identifizierung von linearen Motiven, d.h. putativen Signalsequenzen, die für die PD-Lokalisation von MP17 verantwortlich sein könnten, wurde für MP17 mit Hilfe der Internetplattform GlobPlot 2.3 (http://globplot.embl.de/cgiDict.py) eine Vorhersage für die Anordnung von globulären Domänen und unstrukturierten Bereichen erstellt. Wie in Abbildung 3 ersichtlich, weist der Hauptteil des Proteins eine globuläre Domänenstruktur auf, wohingegen die insgesamt drei identifizierten unstrukturierten Bereiche, im Folgenden als DDI, DDII und DDIII bezeichnet (DD = *disordered domain*), vor allem am N- und C-Terminus zu finden sind.

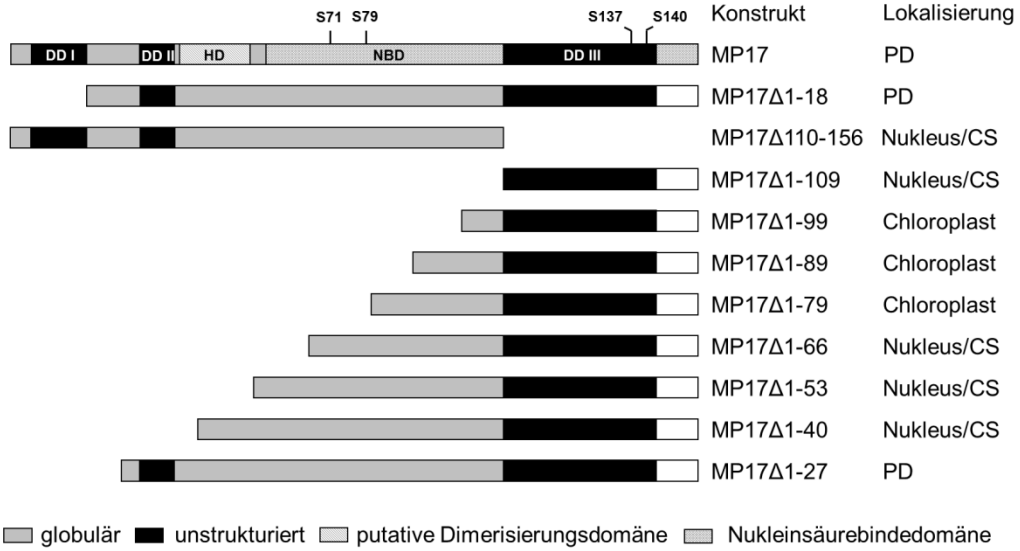

Abbildung 3: Generierung von MP17-Deletionsvarianten. Schematische Übersicht der MP17 Proteinstruktur in Anlehnung an „GlobPlot“, wobei vorhergesagte globuläre Domänen in grau und unstrukturierte Bereiche (*disordered domains*, DD) in schwarz dargestellt sind. Die Position der drei unstrukturierten Bereiche, DDI (AS 5-18), DDII (AS 30-37) und DDIII (AS 110-143), sowie der vier phosphorylierten Serinreste, der putativen Homodimerisierungsdomäne (HD, AS 38-54) und der Nukleinsäure-Bindedomäne (NBD, AS 57-156) sind im unmutierten MP17 ersichtlich. Die intrazelluläre Lokalisation der jeweiligen C-terminalen GFP-Fusion ist rechts neben den Konstrukten aufgelistet.

Darauf basierend wurden zunächst zwei MP17-Deletionsmutanten erzeugt, bei denen durch entsprechende Primerwahl zum einem 18 Aminosäuren am N-Terminus (MP17Δ1-18) und zum anderen 57 Aminosäuren am C-Terminus (MP17Δ110-156) deletiert wurden, was den vorhergesagten unstrukturierten Bereichen DDI und DDIII entsprach (siehe Abbildung 3). Während MP17Δ1-18 weiterhin an PD lokalisierte, führte die Deletion der C-terminalen 57 Aminosäuren zu einer Akkumulation des Fusionsproteins im Cytoplasma und im Zellkern (Abbildung 4B und C).

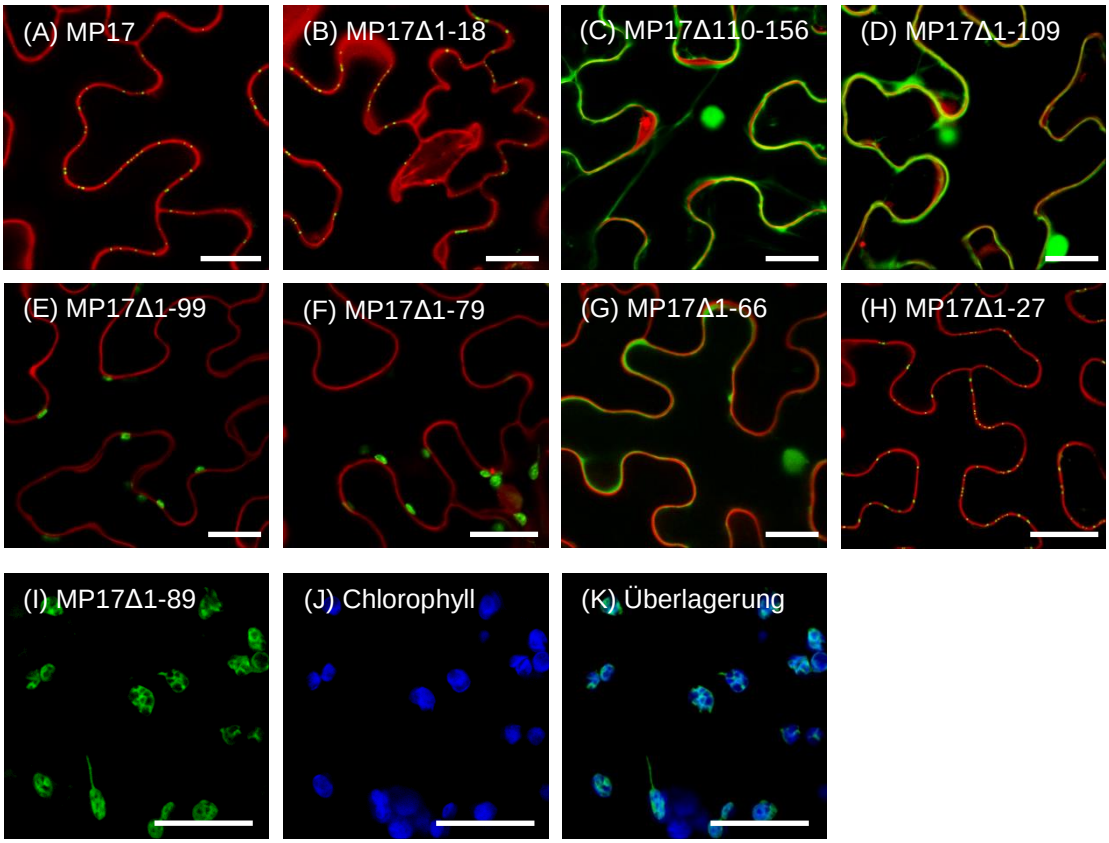

Abbildung 4: Intrazelluläre Lokalisierung der MP17-Deletionsvarianten. Konfokale Aufnahmen der C-terminalen GFP-Fusionen der MP17-Deletionsvarianten nach transienter Expression in *N. benthamiana*; (A-H) Überlagerung der MP17:GFP Fluoreszenz (grün) mit Propidiumiodid gefärbten Zellwänden (rot) in Epidermiszellen. (I-K) Einzelaufnahmen der MP17:GFP Fluoreszenz der Deletionsvariante MP17Δ1-89 (I) und der Chlorophyllautofluoreszenz (J, blau) sowie Überlagerung der beiden Kanäle (K) in Mesophyllzellen. Größenstandard repräsentiert 20 µm

Um zu untersuchen, ob dieser Bereich alleine für die Lokalisation an PD ausreicht, wurde nur der C-Terminus (MP17Δ1-109) an GFP fusioniert. Jedoch lokalisierte auch diese GFP-Fusion im Cytoplasma und im Zellkern (Abbildung 4D). Nachdem dies auch durch einen Verlust der Tertiärstruktur aufgrund der Deletion des Hauptteils des MP oder durch das Vorhandensein von Signalsequenzen innerhalb der vorhergesagten globulären Domäne verursacht werden könnte, wurden im weiteren Verlauf drei weitere Konstrukte erzeugt, bei denen der MP17 C-Terminus um jeweils 10, 20 oder 30 Aminosäuren aus

dem vorhergesagten globulären Bereich verlängert wurde (MP17Δ1-99, MP17Δ1-89 und MP17Δ1-79; siehe Abbildung 3). Überraschenderweise führten alle drei Extensionen zu einer Chloroplasten-Lokalisation des jeweiligen Fusionsproteins (Abbildung 4E, F, I-K). Dieses Ergebnis konnte mit Hilfe des Internettools „ChloroP“ (http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/) bestätigt werden, welches das Vorhandensein eines Chloroplasten-Transitpeptides in den N-Termini dieser MP17-Deletionsvarianten mit einem Score von 0,543 für MP17Δ1-99, von 0,545 für MP17Δ1-89 sowie von 0,522 für MP17Δ1-79 vorhersagte. Die nächsten drei Verlängerungen führten wiederum zu einer erneuten Akkumulation der Fusionsproteine im Cytoplasma und im Zellkern (Abbildung 4G, MP17Δ1-66, MP17Δ1-53 und MP17Δ1-40). Eine Wiederherstellung der plasmodesmalen Lokalisation trat erst für die Deletionsvariante MP17Δ1-27 (Abbildung 4H) auf, welche den zweiten vorhergesagten unstrukturierten Bereich, DDII, beinhaltete. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PD-Lokalisation von MP17 vermutlich nicht auf eine einzige kurze Signalsequenz zurückzuführen ist.

2.1.2 Analyse der Bedeutung der identifizierten Phosphorylierungsstellen

Weitere Studien ergaben, dass posttranslationale Modifizierungen, wie etwa Phosphorylierungen, die Plasmodesmata-Lokalisation von viralen MP und somit die Virusverbereitung beeinflussen können (Citovsky et al., 1993; Matsushita et al., 2000; Waigmann et al., 2000; Matsushita et al., 2002; Karger et al., 2003; Módena et al., 2008). In Vorarbeiten konnten über LC-ESI-MS/MS Analysen bereits vier phosphorylierte Serinreste - S71, S79, S137 und S140 - innerhalb der MP17 Proteinsequenz identifiziert werden (Vogel, 2009; Link et al., 2011). S71 und S79 liegen in der globulären Domäne in der Mitte des Proteins, wohingegen S137 und S140 im unstrukturierten Bereich am C-Terminus lokalisieren. Um die Bedeutung dieser Phosphorylierungen für die PD-Lokalisation von MP17 zu ermitteln, erfolgte ein sogenannter Alanin-Scan der identifizierten Serinreste. Hierbei wurden die beiden Serinpaare einschließlich aller angrenzenden Serine und Threonine, die putative Ersatz-Phosphorylierungsstellen darstellen, gegen Alanin ausgetauscht (Schema siehe Abbildung 5). Die Lokalisierung der MP17-Phosphorylierungsmutanten wurde anschließend mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie (KLSM) überprüft. Die Alaninsubstitution von S137 und S140 am C-Terminus (MP17A136-143) hatte keinen Einfluss auf das plasmodesmale Targeting von MP17 (Abbildung 5). Im Gegensatz dazu führte der Austausch von S71 und S79 gegen Alanin (MP17A69-81) zu einem vollständigen Verlust der plasmodesmalen Lokalisation und stattdessen zu mobilen Aggregaten im Cytoplasma. Dies konnte ebenso für die Doppel-

Alanin-Mutante (MP17AaII), bei der beide Serinpaare durch Alanin ersetzt wurden, beobachtet werden.

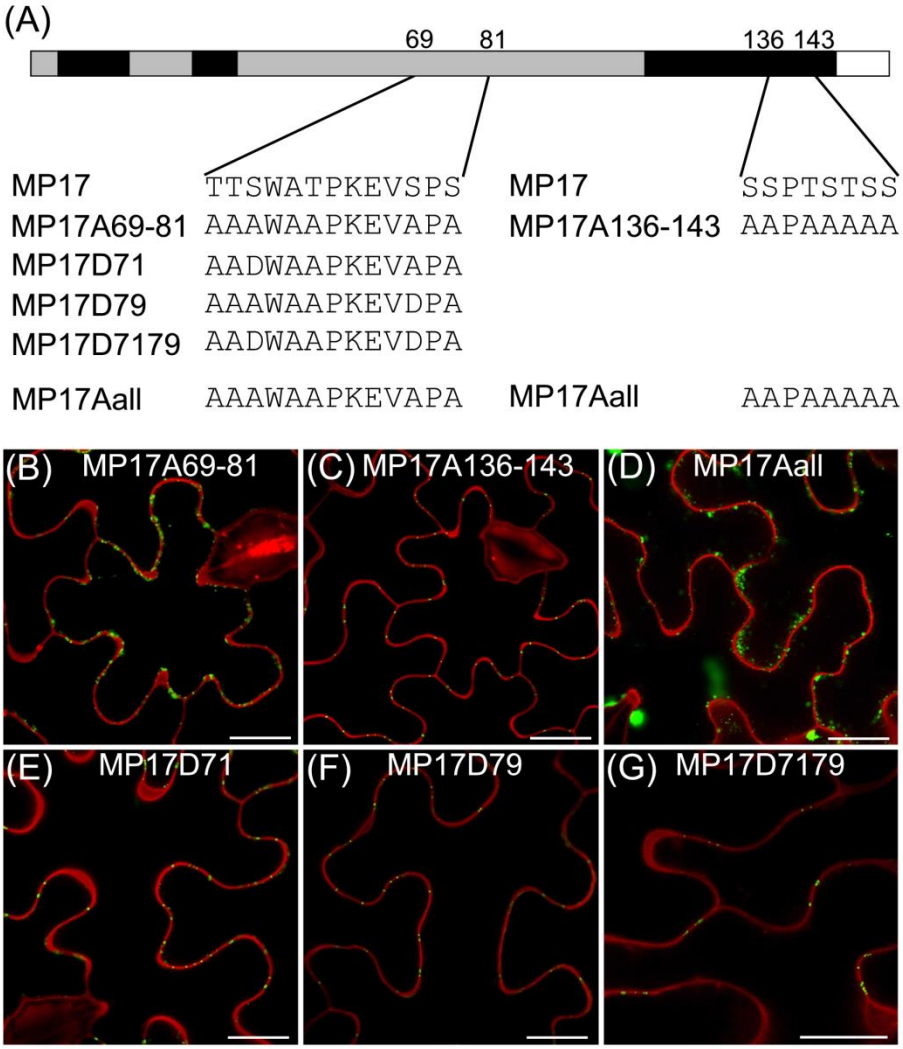

Abbildung 5: Einfluss der Serin-Phosphorylierungen auf das PD-Targeting von MP17. (A) Art und Position der eingeführten Aminosäureaustausche in den MP17-Phosphorylierungsmutanten innerhalb des MP17-Wildtypproteins; (B-G) Konfokale Aufnahmen der jeweiligen MP17-Phosphorylierungsmutante nach transienter Expression in *N. benthamiana*; gezeigt sind Überlagerungen der MP17:GFP Fluoreszenz (grün) mit Propidiumiodid gefärbten Zellwänden (rot) in Epidermiszellen. Größenstandard entspricht 20 µm;

Andere Phosphorylierungsstudien konnten zeigen, dass eine Serin-Phosphorylierung durch das Einfügen eines Asparaginsäurerestes und somit einer negativen Ladung imitiert werden kann (Waigmann et al., 2000). Diese Eigenschaft wurde für eine unabhängige Bestätigung der identifizierten Phosphorylierungsstellen und deren Bedeutung für die Lokalisation verwendet. Basierend auf den MP17-Mutanten MP17A69-81 sowie MP17AaII wurden S71 (MP17D71), S79 (MP17D79) oder beide gleichzeitig (MP17D7179) durch Asparaginsäure (D) ersetzt. Sowohl durch die Asparaginsäuresubstitution MP17D71 als

auch durch MP17D79 wurde die plasmodesmale Lokalisation von MP17 wiederhergestellt (Abbildung 5). Dementsprechend lokalisierte auch MP17D7179 an PD.

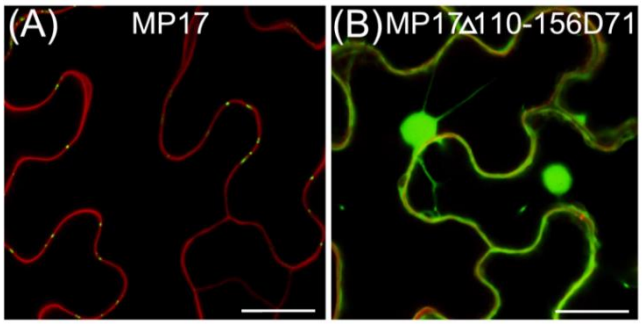

Abbildung 6: Asparaginsäuresubstitution von S71 kompensiert nicht den Verlust des C-Terminus. Konfokale Aufnahmen der C-terminalen GFP-Fusion von (A) MP17 und (B) MP17Δ110-156D71 nach transienter Expression in *N. benthamiana*; gezeigt sind Überlagerungen der MP17:GFP Fluoreszenz (grün) mit Propidiumiodid gefärbten Zellwänden (rot) in Epidermiszellen. Größenstandard entspricht 20 µm;

Somit konnte gezeigt werden, dass die durch Phosphorylierung generierte negative Ladung von S71 oder S79 in der globulären Domäne für die PD-Lokalisation von MP17 essentiell ist. In diesem Zusammenhang eröffnete sich die Option, dass die um den C-Terminus verkürzte MP17-Variante MP17Δ110-156 aufgrund einer Fehlfaltung nicht mehr als Substrat von der entsprechenden Kinase erkannt werden kann und infolgedessen wegen der fehlenden negativen Ladung mislokalisiert und nicht aufgrund einer generellen Bedeutung des C-Terminus. Um dies zu überprüfen, wurde in dieser Deletionsvariante S71 durch Asparaginsäure ersetzt (MP17Δ110-156D71), was jedoch zu einer unveränderten Lokalisation im Cytoplasma und im Zellkern führte (Abbildung 6).

```
barley yellow dwarf virus          MAMVRADADRESLG---EGLLSERSQWLWSLPTAQPGAED-AEDQLVLGE 46
cereal yellow dwarf virus          MAMVRADADRESLG---EGLLSERSQWLWSLPTAQPGAED-AEDQLVLGE 46
beet chlorosis virus               ---MEEDDHAGKHD-----ALGALSQWLWSKPLGQHNADLDDDEEVITGQ 42
beet western yellows virus         ---MEEDDHAGKHD-----ALSALSQWLWSKPLGQHNADLDDDEEVITGQ 42
beet mild yellowing virus          ---MEEDDHVGKRD-----ALSALSQWLWSKPLGQHNADLDDDEEAITGQ 42
cotton leaf roll dwarf virus       ---MEEDDHVG-AT-----GVGKISQWLWSKPLGTHNAEDDEDEEVVIGQ 41
soybean dwarf virus                MSQYNDDALVGQQD-----ALHEFSSWLFQRPPADHNAEDDNDDEGEVIE 45
sweet potato leaf speckling virus  MALVNAHEEGETRG-----ALQEVSQWLWSQPLGTPGADD-VEDEVVEQL 44
potato leaf roll virus             MSMVVYNNQGGEEGNPFAGALTEFSQWLWSRPLGNPGAED-VEEEAIAAQ 49
                                         .             :   *.**:. * .  .*:   :::

barley yellow dwarf virus          EELQDSEEQAVGRHLFSQRTHSLATPLEVSPSGRLYQTIRHSRMEYSRPT 96
cereal yellow dwarf virus          EELQDSEEGAVARHLFSQRTHSRATPLEVSPSGRLYQTIRHSRMEYSRPT 96
beet chlorosis virus               EELFLPEEQAQARHLFSRKTISREVPAEQSRSGRVYQTAQHSLMEYSRPT 92
beet western yellows virus         EELFLPEEQAQARHLFSRKTISREVPVEQSRSGRVYQTAQHSLMEYSRPT 92
beet mild yellowing virus          EELFLPEEQVRARHLFSQKTISREVPADQSRSGRVYQTARHSLMECSRPT 92
cotton leaf roll dwarf virus       EDAFLEDQELQARHLFSQKTVSREVPQDQSRSGRLYQIARHSAMECSRPT 91
soybean dwarf virus                EEAIFPEDQARLTHSCFQRTASMVVPREVSLSGRLYQNASHSLMEYSRPT 95
sweet potato leaf speckling virus  DELHFPEDEAYAKLSYSQRTTSRAVPQEVSPSGRLFQSASLSKVEYSRPS 94
potato leaf roll virus             EELEFPEDEAQARHSCLQRTTSWATPKEVSPSGRVYQTVRHSRMEYSRPT 99
                                   ::    ::         ::* *  .* : * ***::*    * :* ***:

barley yellow dwarf virus          MNIRSQIVSYSSSARPLPQQPVPSLMSWTPIAKHLHLGQQSTSSRSPKLV 146
cereal yellow dwarf virus          MSIRSQVVSYSSSARPLPQQPVPSLMNWTPIAKSLRSHQPTISSQSPKLV 146
beet chlorosis virus               MSIKSRWSFWSSSPKPLPKTPVPSLTSWTHTVDSTPFPRPSISSGSQSPG 142
beet western yellows virus         MSIKSRWSFWSSSPKPLPKTPVPSLTSWTHTVGSTPFPQPSISSGSQSPG 142
beet mild yellowing virus          MSIKSQWSFWSSSPKPLPKIPVPSLTSWTHTVNSVPFHQLSTSSGLQSPG 142
cotton leaf roll dwarf virus       MNIRSQWSYWSSSPRPLQHPPVPSLTKWIHTVNCQPYPPRLTNSESPRTG 141
soybean dwarf virus                MNIRSRVSYYSSSPRPLPPRQAPSLMSLTHTASTPKFNRYSINSVSQRAV 145
sweet potato leaf speckling virus  MSIRSQTSYFSSSARPLQRPAVLSLMNWTPIVKYHPSPPPSTSSQLRKAV 144
potato leaf roll virus             MSIRSQASYFSSSARPLPPPPAPSLMSWTPIAKYHPSPTSTSSKLRRAA 149
                                   *.*:*:   :***.:**    . ** .    .         .*

barley yellow dwarf virus          RAASQRR------------------------------------ 153
cereal yellow dwarf virus          RGASQRR------------------------------------ 153
beet chlorosis virus               GGRLQRLTSTGRIGTTLPRTNSGSSTKAMVLHR---------- 175
beet western yellows virus         GGRLQRLTSTGRIGTTLPRTNSGSSTKAMVLHR---------- 175
beet mild yellowing virus          GGHLQRLTSTGRTGTTLPRTNSGSSTKAMVLHR---------- 175
cotton leaf roll dwarf virus       GSNLRRLSSMDRNGMTPPRTSSESYIKAMVPRR---------- 174
soybean dwarf virus                RRDSPQELSTASNGMIPVKINSRSTIRGTETPRSQAPSRSRSMS 189
sweet potato leaf speckling virus  RGRSPRG------------------------------------ 151
potato leaf roll virus             PKLIKRG------------------------------------ 156
                                         :
```

Abbildung 7: Sequenzanalyse verschiedener luteoviraler Movementproteine. Die im PLRV MP17 identifizierten Phosphorylierungsstellen sind in gelb hervorgehoben.

Eine Sequenzanalyse von MP17 und acht weiteren luteoviralen Movementproteinen brachte zum Vorschein, dass S71 und S79 hochkonserviert sind, während S137 nur im PLRV MP17 und S140 nur in einigen MP vorliegt (Abbildung 7).

2.1.3. Einfluss der Lysinreste auf den Abbau von MP17 in Sinkgeweben

MP17 bindet nur an verzweigte Plasmodesmata in Sourcegeweben, nicht aber an die strukturell unterschiedlichen einfachen Plasmodesmata in Sinkgeweben, wo es durch das 26S-Proteasom abgebaut wird. In seneszenten Blättern kommt es zu einem allmählichen Verlust der plasmodesmalen Lokalisation von MP17, vermutlich aufgrund struktureller Veränderungen der Plasmodesmata im Verlauf der Seneszenz. In der MP17-Sequenz finden sich fünf Lysinreste (K), die ubiquitinyliert werden könnten (siehe Abbildung 8).

Abbildung 8: Aminosäuresequenz von MP17; Die insgesamt fünf Lysinreste (K) sind in türkis hervorgehoben.

Um die Bedeutung der verschiedenen Lysine für die Proteinstabilität und den Abbau durch das 26S-Proteasom zu untersuchen, wurden K76 alleine (K1) sowie K132, K144, K151 und K154 zusammen (K2) gegen Arginin ausgetauscht und in den Endvektor pK7FWG2 eingebracht, wodurch eine C-terminale GFP-Fusion der Lysinmutanten erzeugt wurde. Nach Agrobakterien-vermittelter transienter Expression in *Nicotiana benthamiana* wurde die Lokalisierung der Lysinmutanten über KLSM untersucht (Abbildung 9). Hierbei konnte beobachtet werden, dass K1:GFP in Sinkblättern und jungen Pflanzen im Zellkern und in cytoplasmatischen Aggregaten lokalisiert. Die Lokalisation an PD in Sourceblättern wurde dagegen nicht beeinflusst. Das gleiche Fluoreszenzmuster zeigte sich auch für K2:GFP. Im Gegensatz dazu konnten nach transienter Expression von MP17:GFP in Sinkblättern und jungen Pflanzen nur wenige kleine Aggregate detektiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch den Aminosäureaustausch Lysin gegen Arginin der Abbau von MP17 deutlich beeinträchtigt wird.

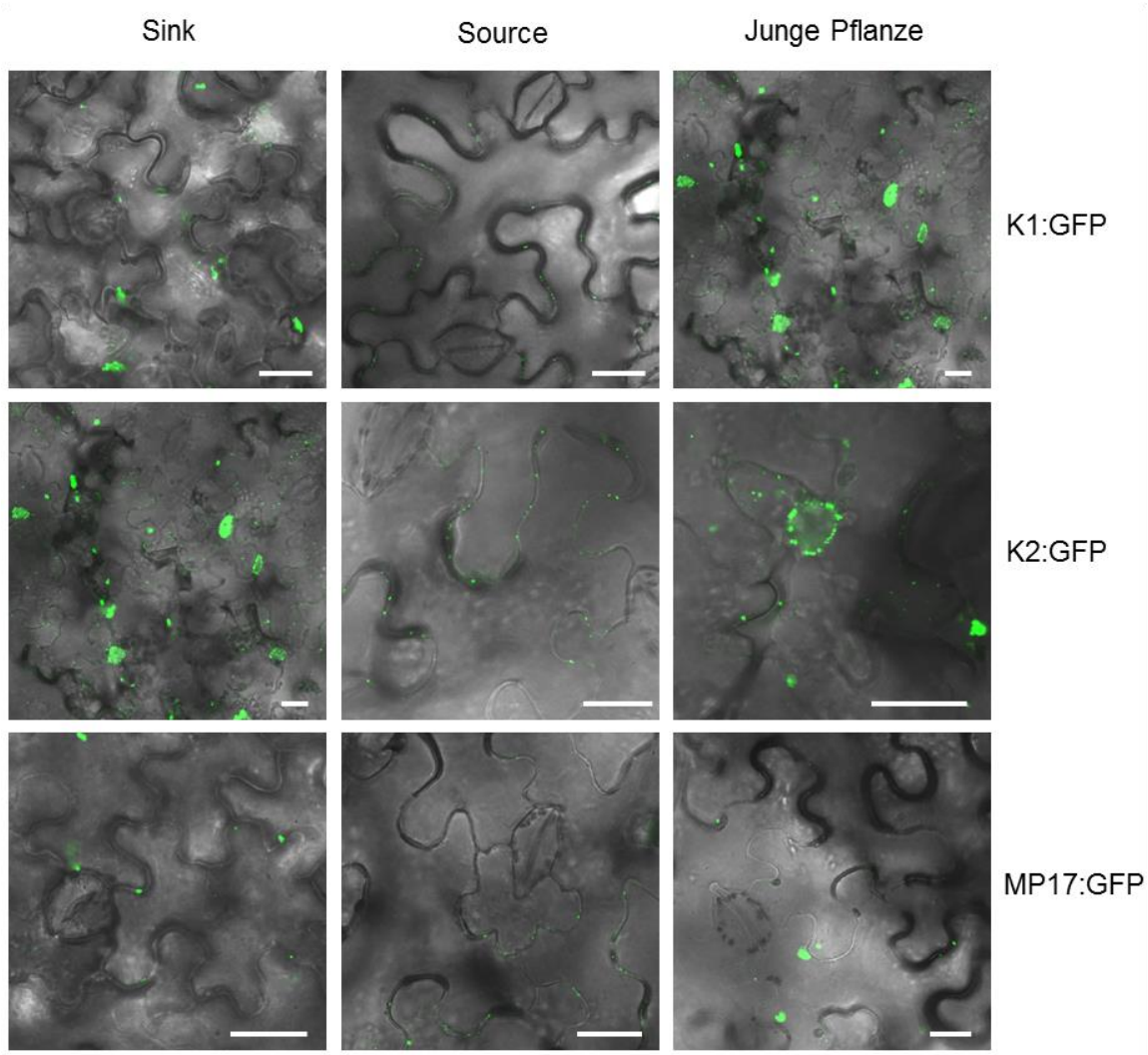

Abbildung 9: Lokalisation von K1:GFP, K2:GFP sowie MP17:GFP nach transienter Expression in *N.benthamiana*. Epidermiszellen von *N.benthamiana* 48h nach Infiltration in Sinkblätter (Blatt 1-3), Sourceblätter (Blatt 4-6) und junge Pflanzen (Zweiblattstadium); dargestellt ist MP17:GFP Fluoreszenz in Überlagerung mit Durchlichtbildern. Größenstandard entspricht 20 µm.

2.2 Genetische Identifizierung von Elementen des inter- und intrazellulären Makromolekültransportes

2.2.1 Beschreibung des Mutantenscreenings

Durch die Lokalisation an PD stellt das Movementprotein des *Potato leafroll virus*, PLRV MP17, ein geeignetes Werkzeug dar, um Plasmodesmataproteine und Elemente des pflanzlichen Makromolekültransportes zu identifizieren. Ethylmethylsulfonat (EMS) führt als chemisches Mutagen zu Einzelbasenaustauschen sowie kleinen Deletionen in der DNA und begünstigt somit die Entstehung von „*change of function*"-Mutationen. Aus diesem Grund erfolgte auch für die *Arabidopsis thaliana*-Linie Col-16, welche MP17:GFP konstitutiv unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors exprimiert, eine EMS Mutagenese. Die geschätzt 34.848 primär mutagenisierten Pflanzen (M1-Generation) wurden zunächst in 24 Parentalgruppen eingeteilt. Nach einer Anzucht von 1453 -/+ 58 Pflanzen pro Parentalgruppe wurden deren Samen vereinigt (LEHLE SEEDS; Round Rock, TX, USA). Im Vorfeld dieser Arbeit wurden für die genetische Identifizierung von Komponenten des inter- und intrazellulären Makromolekültransportes mit diesen EMS-mutagenisierten Samen bereits zwei verschiedene Mutantendurchmusterungen durchgeführt. Daniel Hofius (Hofius, 2003) beschränkte sich bei seiner Suche auf Mutanten, die eine Reversion des Mutanten-Phänotyps aufwiesen, und konnte von insgesamt 84.000 analysierten Pflanzen 31 mögliche Suppressormutanten selektieren. Im Rahmen verschiedener Doktorarbeiten erfolgten daraufhin weiterführende Analysen ausgewählter Mutanten (Hofius, 2003; Kronberg, 2008; Vogel, 2009; Thran, 2012). Letztendlich konnten dabei aber vor allem Elemente der *gene silencing* Maschinerie identifiziert werden (Vogel et al., 2011; Thran et al., 2012). Wie schon in Kapitel 1.2.3 erwähnt, hat MP17 die Eigenschaft, dass es nur an verzweigte Plasmodesmata in Sourcegeweben lokalisiert, nicht aber an simple PD in Sinkgeweben (Hofius et al., 2001; Kronberg et al., 2007). Mit zunehmender Seneszenz kommt es allmählich zu einem Verlust der plasmodesmalen Lokalisation von MP17, was vermutlich auf strukturelle Veränderungen der PD während der Seneszenz zurückzuführen ist (Kronberg et al., 2007). Diese Eigenschaft des viralen Movementproteins machte man sich für ein weiteres Screening zunutze (Vogel, 2009). So wurden etwa 6000 EMS-mutagenisierte MP17:GFP Arabidopsispflanzen über Stereofluoreszenzmikroskopie und KLSM auf Mutanten mit Akkumulation von MP17:GFP in Sinkblättern durchmustert. Auf diese Weise konnten letztlich zehn Sinkmutanten identifiziert werden, die durch kein oder wenig Chlorophyll

und eine ausgeprägte Wachstumsretardierung gekennzeichnet waren. Aufgrund ihrer Sterilität konnten diese allerdings nicht weiter untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Durchmusterung der EMS-mutagenisierten Samen mittels Stereofluoreszenzmikroskopie und KLSM nach Besonderheiten in den zwei verbleibenden Entwicklungsstadien. In zwei Runden wurden insgesamt 3840 Pflanzen auf eine veränderte plasmodesmale Lokalisation von MP17 hin durchmustert. So diente der erste Durchlauf der Suche nach Sourcemutanten, die sich durch eine deutliche Reduktion der MP17:GFP Fluoreszenz in Sourceblättern auszeichnen. Ziel des zweiten Durchlaufs war dagegen die Identifizierung von Seneszenzmutanten, die eine unverändert starke plasmodesmale Assoziation von MP17:GFP in seneszierenden Blättern aufweisen. Für diesen Ansatz wurden zunächst die vorliegenden Samen der M2-Generation der 24 verschiedenen Parentallinien und der Kontrollen Col-0, Col-16 sowie Col-9 und Col-14, die im Vergleich zu Col-16 weniger MP17:GFP exprimieren, auf Erde ausgesät (Kronberg et al., 2007). Nach einer Stratifikation für drei Tage bei 4°C wurden die ausgesäten Samen in Kurztagbedingungen überführt und im Alter von 14 Tagen in 40 Multiflorplatten à 104 Töpfchen pikiert. Dabei wurde jede Multiflorplatte mit drei Col-0, drei Col-16 sowie einem Col-9 und einem Col-14 Keimling bestückt, wodurch pro Parentalgruppe 160 Pflanzen analysiert werden konnten. Die weitere Anzucht der Pflanzen bis zum Abschluss der konfokalen Analysen erfolgte unter Kurztagbedingungen.

2.2.1.1 Screening der Sourceblätter

Wie schon erwähnt erfolgte im ersten Durchlauf eine Durchmusterung der Sourceblätter, die im Normalfall eine stark ausgeprägte MP17:GFP Fluoreszenz aufweisen. Hierbei galt es Mutanten zu isolieren, bei denen die Fluoreszenz deutlich reduziert war. Über eine Primärdurchmusterung der sechs Wochen alten Pflanzen am Stereofluoreszenzmikroskop (MZ16F, Leica, Bensheim) und anschließender Verifikation mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie konnten schließlich drei verschiedene Gruppen an Sourcemutanten identifiziert werden (siehe Tabelle 1), für die exemplarische KLSM-Aufnahmen in Abbildung 10 dargestellt sind. Die größte Gruppe zeigte einen kompletten Verlust der MP17:GFP Fluoreszenz in Sourceblättern und umfasste 40 Pflanzen, von denen etwa die Hälfte durch ein Wildtyp-ähnliches Wachstum charakterisiert war. Weiterhin konnte eine zweite Gruppe von fünf Mutanten identifiziert werden, die eine starke Reduktion der MP17:GFP Fluoreszenz aufwies, sowie eine dritte Gruppe bestehend aus sechs Mutanten mit schwach reduzierter MP17:GFP-Fluoreszenz. Die Mutanten der letzten beiden Gruppen fielen durch eine starke Wuchsretardierung auf.

Tabelle 1: Ergebnis des Sourcescreenings

Gruppe	Merkmal	Bezeichnung der Mutante: SO +	Anzahl
I	Keine GFP-Fluoreszenz	3A, 4A, 4C, 4E, 5A, 6A, 6B, 7A, 8A, 8B, 9A, 9C, 10A, 11A, 12A, 13B, 14A, 14B, 14C, 15A, 15B, 17A, 17F, 18A, 18B, 18C, 18D, 19A, 19B, 20A, 20B, 20D, 21A, 21B, 22A, 22B, 23A, 23B, 23C, 23D	40
II	Reduzierte Fluoreszenz		
	stark reduziert	12D, 13A, 13E, 20C, 24A	5
	schwach reduziert	4G, 9B, 9D, 17B, 17C, 20E	6
III	Unveränderte Fluoreszenz		3789

Bei der Benennung der Individuen stehen die jeweilige Zahl für die parentale Gruppe (1-24), aus der die Mutante stammt, und der jeweilige Buchstabe für die chronologische Reihenfolge identifizierter Pflanzen innerhalb einer parentalen Gruppe. Weiterhin wurden die Mutanten des Sourcescreenings mit dem Kürzel SO zu Beginn der Bezeichnung versehen.

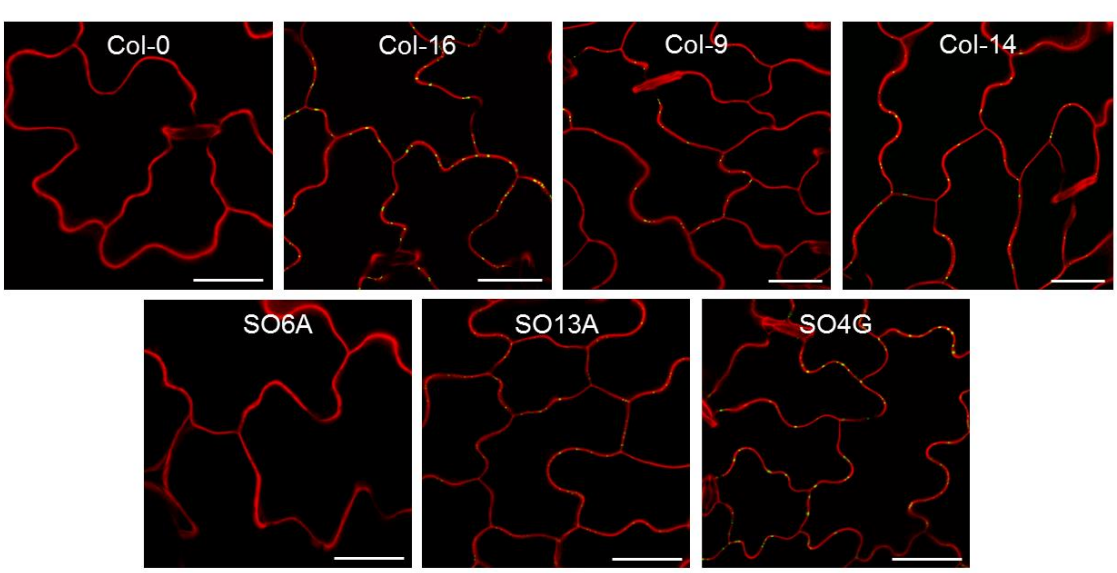

Abbildung 10: Repräsentative konfokale Aufnahmen für die drei verschiedenen Gruppen des Sourcescreenings; MP17:GFP Fluoreszenz ist in grün dargestellt, die Zellwände wurden durch Propidiumiodid rot gefärbt; in der oberen Reihe sind die KLSM-Aufnahmen der Kontrollen dargestellt, die untere Reihe zeigt repräsentative Bilder für jede Gruppe. Größenstandard für Col-0 = 28 µm, Col-16 = 30 µm, Col-9 = 25 µm, Col-14 = 26 µm, SO6A = 30 µm, SO13A = 26 µm und SO4G = 30 µm.

2.2.1.2 Screening der seneszenten Blätter

Nach insgesamt acht Wochen Kultivierung unter Kurztagbedingungen erfolgte direkt im Anschluss an die Analyse der Sourceblätter eine Durchmusterung der gleichen Pflanzen

auf Abweichungen der M17:GFP Fluoreszenz in seneszenten Blättern. In diesem Blattstadium kommt es in der nicht mutagenisierten Col-16 Linie zu einem allmählichen Verlust der plasmodesmalen Lokalisation von MP17:GFP verbunden mit dessem proteasomalen Abbau. Dies könnte möglicherweise auf strukturelle Veränderungen der PD während der Seneszenz zurückzuführen sein. Ziel dieses Durchganges war also die Isolierung von Mutanten, bei denen in seneszenten Blättern eine stärkere MP17:GFP Fluoreszenz als in den jeweiligen Sourceblättern der gleichen Pflanze nachweisbar war. Durch Analyse der seneszenten Blätter unter dem Stereofluoreszenzmikroskop und anschließend mittels KLSM wurden letztendlich zwei verschiedene Gruppen an Seneszenzmutanten entdeckt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ergebnis des Seneszenzscreenings

Gruppe	Merkmal	Bezeichnung der Mutante: SE +	Anzahl
I	GFP-Fluoreszenz SE>SO	5A, 10A, 20A	3
II	keine Fluoreszenz in SO, normal in SE	14E, 17A	2

Die erste Gruppe zeichnete sich durch das eben beschriebene Merkmal aus und umfasste drei Mitglieder, von denen stellvertretend für eine Mutante die konfokalen Aufnahmen in Abbildung 11A dargestellt sind. Die beiden Mutanten der Gruppe II zeigten keine GFP-Fluoreszenz in Sink-, und in Sourceblättern, während in seneszenten Blättern eine deutliche MP17:GFP Fluoreszenz detektiert werden konnte (Abbildung 11B). Um zu überprüfen, ob diese Beobachtung lediglich auf eine Verzögerung der Blattentwicklung zurückzuführen war, wurden die Trichome der Seneszenzmutante SE14E über KLSM näher analysiert, da bei älteren Sinkblättern an Trichombasiszellen MP17:GFP Fluoreszenz detektierbar sein müsste. Wie in Abbildung 11C dargestellt ist, konnte bei SE14E auch an Trichombasiszellen keine MP17:GFP Fluoreszenz beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass in diesen beiden Mutanten die Struktur der PD in seneszenten Blättern verändert ist, beziehungsweise abweichend PD-Rezeptoren vorhanden sind, die eine Assoziation von MP17:GFP an PD erlauben.

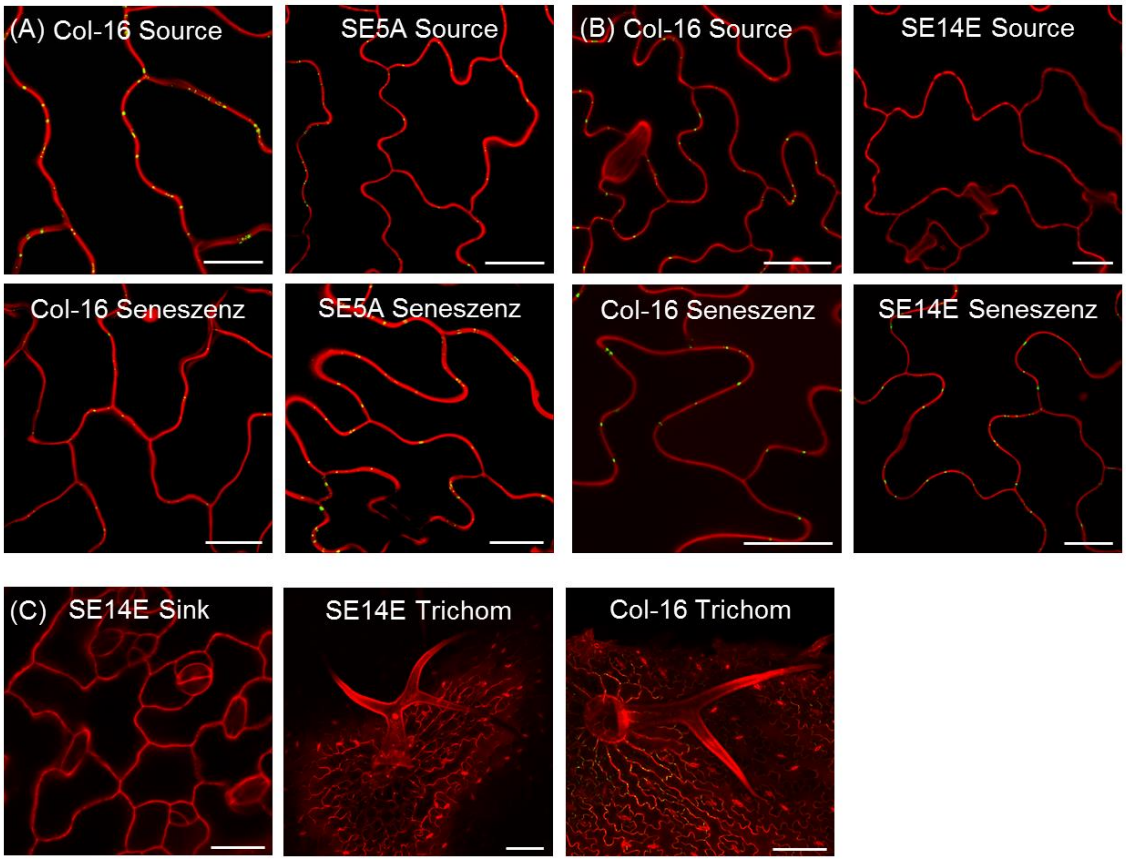

Abbildung 11: Repräsentative konfokale Aufnahmen der Seneszenzmutanten. Abgebildet sind Sourceblätter und seneszente Blätter der Seneszenzmutante SE5A (A) und SE14E (B); MP17:GFP Fluoreszenz ist grün dargestellt, die Zellwände wurden durch Propidiumiodid rot gefärbt; (C) Die Analyse der Sinkblätter der Mutante SE14E brachte die Abwesenheit von MP17:GFP Fluoreszenz an Trichomen zum Vorschein; Größenstandard: (A) Col-16 Source: 17 µm, Col-16 Seneszenz: 24 µm, SE5A Source und Seneszenz: 17 µm; (B) Größenstandard entspricht 20 µm; (C) SE14E Sink: 19 µm; Trichombilder: 100 µm.

Mittels Northern und Western Blot Analyse konnte der Verlust des Transkriptes sowie des Proteins in Sourceblättern der Seneszenzmutanten SE14E und SE17A bestätigt werden (Abbildung 12).

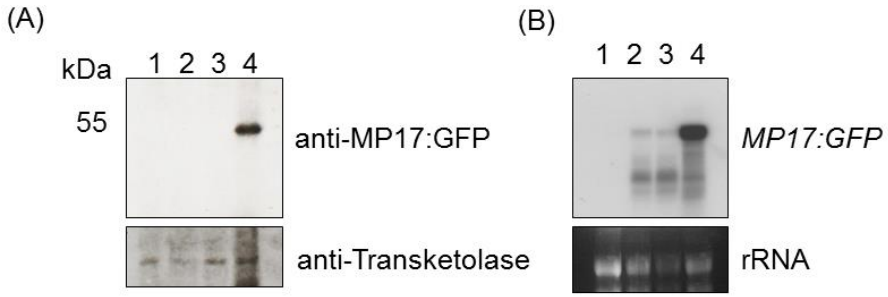

Abbildung 12: Analyse der Proteinlevel und der Transkriptlevel der Seneszenzmutanten. (A) Western Blot Analyse von Sourceblättern der Seneszenzmutanten SE14E und SE17A; MP17:GFP wurde durch ein anti-MP17 Antiserum nachgewiesen; als Kontrolle diente die Detektion der Transketolase über einen anti-Transketolase Antikörper. Es wurden jeweils 30 µl Proteinextrakt von Arabidopsis Col-0 (Spur 1), SE14E (Spur 2), SE17A (Spur 3) sowie Col-16 (Spur 4) aufgetragen; das molekulare Gewicht des detektierten Proteins wurde anhand des mitgeführten Proteinstandards PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas) ermittelt; (B) Northern Blot Analyse von Sourceblättern der Seneszenzmutanten SE14E und SE17A*; MP17:GFP* Transkript wurde durch eine mit 4 µl ^{32}P-CTP radioaktiv markierte Sonde nachgewiesen. Es wurden jeweils 15 µg RNA von Arabidopsis Col-0 (Spur 1), SE14E (Spur 2), SE17A (Spur 3) sowie Col-16 (Spur 4) aufgetragen; als Ladekontrolle diente die mit Ethidiumbromid visualisierte rRNA;

2.2.2 Analyse der M3-Generation der identifizierten Mutanten

2.2.2.1 Analyse der Seneszenzmutanten

Für die weitere Analyse der M3-Generation wurden von den jeweiligen Kandidaten (im Weiteren als Linien bezeichnet) 28 Individuen ausgebracht. Nach elf Wochen Kultivierung unter Kurztagbedingungen wurde mittels Stereofluoreszenzmikroskopie sowie KLSM ermittelt, ob der gleiche Phänotyp in den Nachkommen auftrat und falls dies der Fall war, ob uniform oder segregierend. Hierbei konnte für alle Linien jedoch nur in einem Teil der Nachkommen der ursprüngliche Phänotyp beobachtet werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Segregation des Phänotyps in der M3-Generation der Seneszenzmutanten

Linie	Merkmal M2	M2 Phänotyp in M3	Segregation
SE5A	Fluoreszenz SE > SO	ja	32 %
SE10A	Fluoreszenz SE > SO	ja	37 %
SE20A	Fluoreszenz SE > SO	nur ca. 5 Samen, keine Keimung	
SE14E	Fluoreszenz nur SE	ja	18 %
SE17A	Fluoreszenz nur SE	ja	18 %

Die Linie SE14E sollte aufgrund ihres außergewöhnlichen Phänotyps trotz der Segregation weiter bearbeitet werden. Um Hintergrundmutationen zu eliminieren, welche das oben beschriebene Segregationsverhältnis verursachen könnten, erfolgte zunächst eine Rückkreuzung der Linie SE14E in Col-16. Die resultierende Linie NMSE14E wurde daraufhin im Rahmen der Masterarbeit von Katharina Schmitt näher charakterisiert. Doch auch für diese Linie konnte sowohl in der F2-, als auch in der F3-Generation eine ungewöhnliche Segregation des Phänotyps beobachtet werden. Die weiteren Analysen ließen vermuten, dass die Ausbildung des Phänotyps auf einem Zusammenspiel verschiedener Effekte beruht. So könnte der Abbau von MP17 in den Sourceblättern durch Stress-sensitives posttranskriptionelles *gene silencing* verursacht werden, während eine zweite unabhängige Mutation die entwicklungsspezifisch gesteuerte Aufhebung des ersten Effektes und somit verstärkte Fluoreszenz in seneszenten Blättern zur Folge haben könnte (Katharina Schmitt, unveröffentlicht). Da diese Aufspaltung eine Kartierung der Mutationen nahezu unmöglich macht, wurde die Bearbeitung der Seneszenzmutanten an dieser Stelle abgebrochen.

2.2.2.2 Analyse der Sourcemutanten

Für die Validierung der Sourcemutanten wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren. Zunächst sollten die Mutanten der Gruppe II, die im Screening durch eine starke Reduktion der MP17:GFP Fluoreszenz aufgefallen waren, weiter analysiert werden. Hierfür wurden acht Wochen alte Nachkommen der Linien SO12D, SO13A, SO13E und SO24A auf eine reduzierte plasmodesmale Akkumulation von MP17:GFP hin untersucht. Lediglich in der Linie SO24A konnte in allen Nachkommen der Phänotyp der M2-Generation detektiert werden, wenn auch in unterschiedlicher Intensität. So zeigten 10 % eine starke, 64 % eine mittlere und 25 % eine schwache Reduktion der MP17:GFP Fluoreszenz an PD (Tabelle 4). Alle Nachkommen wiesen uniform einen Col-16 ähnlichen Phänotyp auf.

Tabelle 4: Segregation des Phänotyps in der M3-Generation der Sourcemutanten

Linie	Merkmal M2	M2 Phänotyp in M3	Segregation
SO12D	starke Reduktion in SO	nicht bestätigt	
SO13A	starke Reduktion in SO	nicht überlebt	
SO13E	starke Reduktion in SO	nicht bestätigt (nur 2 Pflanzen)	
SO24A	starke Reduktion in SO	ja	10 % stark reduziert 64 % mittel reduziert 25 % schwach reduziert

Um die Menge an MP17:GFP Protein zu quantifizieren, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt (Abbildung 13A). Allerdings spiegelte sich der mittels KLSM beobachtete Fluoreszenzunterschied nicht in der Proteinmenge wider. Ebenso konnte für die *MP17:GFP* Transkriptmenge mittels Northern Blot kein deutlicher Unterschied zwischen Col-16 und der Linie SO24A festgestellt werden (Abbildung 13B).

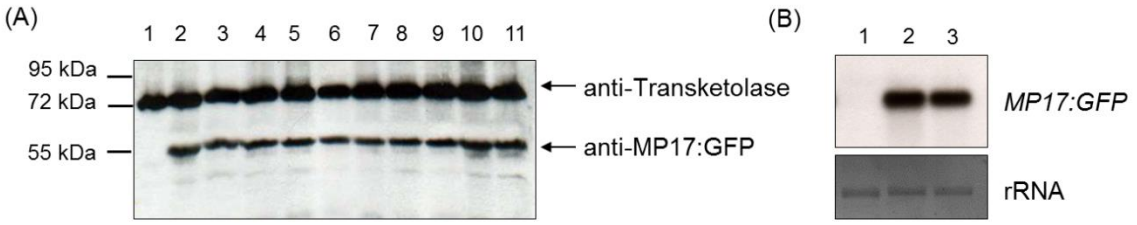

Abbildung 13: Analyse der MP17 Proteinlevel und Transkriptlevel in Sourceblättern der Sourcemutante SO24A. (A) Western Blot Analyse; MP17:GFP wurde durch ein anti-MP17 Antiserum bei etwa 54 kDa nachgewiesen, sowie Transketolase als Ladekontrolle durch einen anti-Transketolase Antikörper bei etwa 72 kDa. Es wurden jeweils 30 µl Proteinextrakt von Arabidopsis Col-0 (Spur 1), Col-16 (Spur 2) und SO24A Gruppe I #1, 7 und 20 (Spur 3,4,5), Gruppe II #2, 6 und 12 (Spur 6, 7, 8) und Gruppe III #14, 18 und 24 (Spur 9, 10, 11) aufgetragen; das molekulare Gewicht des detektierten Proteins wurde anhand des mitgeführten Proteinstandards *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas) ermittelt. (B) Für die Northern Blot Analyse wurden jeweils 2,5 µg Gesamt-RNA von Arabidopsis Col-0 (Spur 1), Col-16 (Spur 2) und SO24A (Spur 3) auf einem RNA-Gel aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine Nitrocellulosemembran wurde *MP17:GFP* Transkript durch Hybridisierung mit einer mit 4 µl ^{32}P-CTP radioaktiv markierten DNA-Sonde nachgewiesen; als Ladekontrolle diente Ethidiumbromid-gefärbte rRNA.

Zur gleichen Zeit wurde im Rahmen der Dissertation von Moritz Thran die Gruppe I des Sourcescreenings analysiert. Es war davon auszugehen, dass der komplette Verlust der Fluoreszenz in den 40 Mutanten entweder auf einen Defekt im Transgen oder auf *gene silencing* zurückzuführen war, weshalb diese für die Identifikation von Plasmodesmataproteinen nicht in Frage kamen. Allerdings konnte während dieser Analysen eine weitere Mutante, SO15A, identifiziert werden, die sich durch eine drastisch reduzierte Reduktion der MP17:GFP Proteinakkumulation an PD auszeichnete, weshalb sie im ursprünglichen Mutantenscreening der Sourceblätter fälschlicherweise der Gruppe I zugeteilt wurde. Diese zeichnete sich in den Analysen der M3-Generation durch eine drastische Wuchsretardierung, sehr stark reduzierte MP17:GFP Fluoreszenz in Kotyledonen und Sourceblättern und einer fehlenden Segregation aus (Thran, 2012). Diese Mutante wurde aufgrund ihres interessanten Phänotyps im weiteren Verlauf näher charakterisiert.

2.2.3 Analyse der Sourcemutante SO15A

2.2.3.1 Phänotypische Untersuchung

Die Mutante SO15A zeichnete sich durch eine extreme Wuchsretardierung im Vergleich zum Wildtyp und sogar zur Linie Col-16 aus (Abbildung 14A). Dies wäre wiederum für eine Mutante, bei der der plasmodesmale Transport beeinträchtigt wäre, auch zu erwarten.

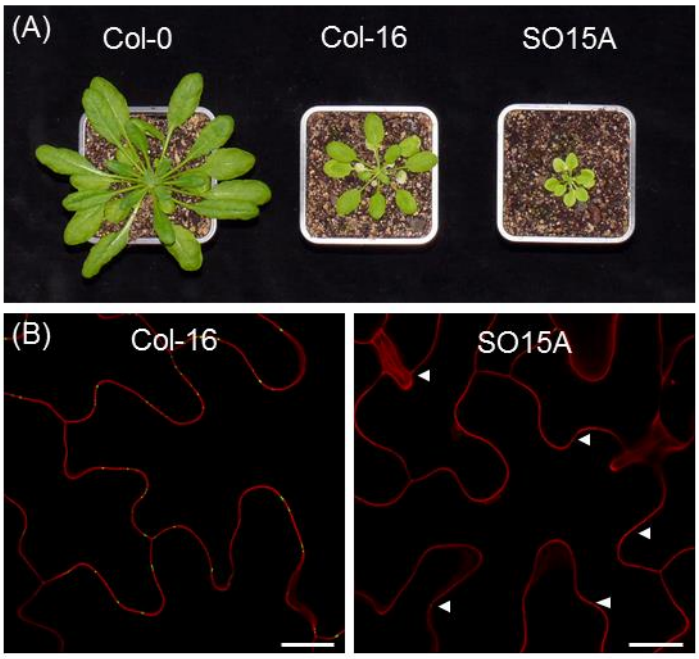

Abbildung 14: Phänotyp der Sourcemutante SO15A.
(A) Makroskopischer Phänotyp der Mutante SO15A. Abgebildet sind 8 Wochen alte Pflanzen der M3-Generation der Sourcemutante SO15A sowie des Wildtyps Col-0 und der nicht-mutierten Kontrolllinie Col-16. Die Mutante SO15A ist durch eine deutliche Wuchsretardierung sowie eine leichte Gelbfärbung der Blätter charakterisiert.

(B) KLSM-Analyse von Sourceblättern der Mutante SO15A; analysiert wurden Sourceblätter der M3-Generation von SO15A im Vergleich zur Linie Col-16; MP17:GFP Fluoreszenz ist grün dargestellt, die Zellwände wurden durch Propidiumiodid rot gefärbt; Standard entspricht 20 µm;

Weiterhin wiesen die Blätter dieser Mutante eine hellgrüne Farbe auf, was sich je nach Anzucht sogar bis hin zu einer Gelbfärbung, bzw. einem Albinophänotyp ausweiten kann. Wie bereits berichtet, ist die Akkumulation der MP17:GFP Fluoreszenz an PD in Sourceblättern in der Linie SO15A drastisch reduziert (siehe Abbildung 14B). Diese Reduktion zeigte sich unter dem Stereofluoreszenzmikroskop ebenso in Kotyledonen.

2.2.3.2 Transkript-und Proteinmenge

Um zu überprüfen, ob die Stabilität und/oder die Expression des *MP17:GFP* Transkriptes in SO15A verändert ist, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Wie in Abbildung 15A ersichtlich, konnte für die Sourcemutante SO15A in der M4-Generation das *MP17:GFP* Transkript in gleicher Bandenstärke wie für die Linie Col-16 detektiert werden. Somit konnte also eine veränderte Expressionshöhe als Ursache für die reduzierte MP17:GFP Fluoreszenz an PD ausgeschlossen werden. Die Menge an Fusionsprotein wurde mittels einer Western Blot Analyse quantifiziert (Abbildung 15B). Durch den verwendeten anti-GFP Antikörper konnte MP17:GFP in der Linie Col-16 und in der M4-Generation der Sourcemutante SO15A bei etwa 54 kDa detektiert werden, wobei die Proteinmenge in der Mutante SO15A nur geringfügig vermindert war.

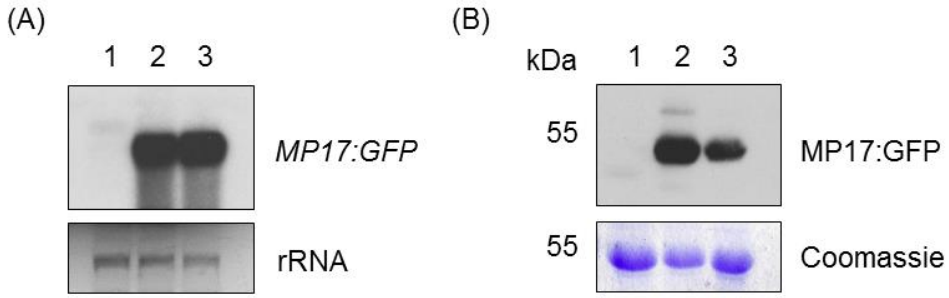

Abbildung 15: Analyse der *MP17:GFP* Transkriptmenge und MP17:GFP Proteinmenge in der Sourcemutante SO15A. (A) Nachweis des *MP17:GFP* Transkriptes über Northern Blot; 2,5 µg RNA der Linien Col-0 (Spur 1), Col-16 (Spur 2) und SO15A (Spur 3) wurden auf einem RNA-Gel aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine Nitrocellulosemembran wurde das *MP17:GFP* Transkript durch Hybridisierung mit einer mit 4 µl ^{32}P-CTP radioaktiv markierten DNA-Sonde nachgewiesen; als Ladekontrolle diente Ethidiumbromid-gefärbte rRNA; (B) Nachweis der MP17:GFP Proteinmenge über Western Blot Analyse. Es wurden jeweils 30 µl Proteinextrakt aus Blattproben gleicher Fläche der Linien Col-0 (Spur 1), Col-16 (Spur 2) und SO15A (Spur 3) auf einem SDS-Gel aufgetrennt. MP17:GFP wurde durch ein anti-GFP Antiserum bei etwa 54 kDa nachgewiesen. Coomassie-Färbung von RUBISCO auf einem zweiten, gleich beladenen SDS-Gel diente als Ladekontrolle.

2.2.3.3 Primärcharakterisierung

Im Rahmen des Vertiefungsmoduls von Katharina Schmitt erfolgte eine ausführliche Primärcharakterisierung der Mutante SO15A. Aufgrund des ausgeprägten Phänotyps wurden zunächst das Rosettenfrischgewicht und die Blattzahl bestimmt. Durch die extrem starke Wuchsretardierung war das Rosettenfrischgewicht der Mutante mit 50 mg im

Vergleich zu 370 mg bei Col-16 deutlich reduziert. Dies spiegelte sich auch in der Blattanzahl wider. So wies die Mutante im Durchschnitt 13 Blätter pro Pflanze auf, Col-16 dagegen 21 und Col-0 sogar 32 Blätter (siehe Abbildung 16A und B). Nachdem die Keimlinge der Mutante SO15A durch extrem kurze Wurzeln auffielen, wurde anschließend das Wurzelwachstum der drei Linien in einem „*vertical growth assay*“ näher analysiert. Wie in Abbildung 16C ersichtlich, lag die Wurzellänge von Col-0 und Col-16 nach fünf Tagen bei etwa 3,5-4,0 mm, die der Mutante bereits leicht verkürzt bei 1,8 mm. Nach 14 Tagen war ein deutlicher Unterschied zwischen den drei untersuchten Linien erkennbar. Die Wurzellänge von Col-16 war im Vergleich zum Wildtyp um 10 mm reduziert, die der Mutante sogar um 20 mm (Abbildung 16C).

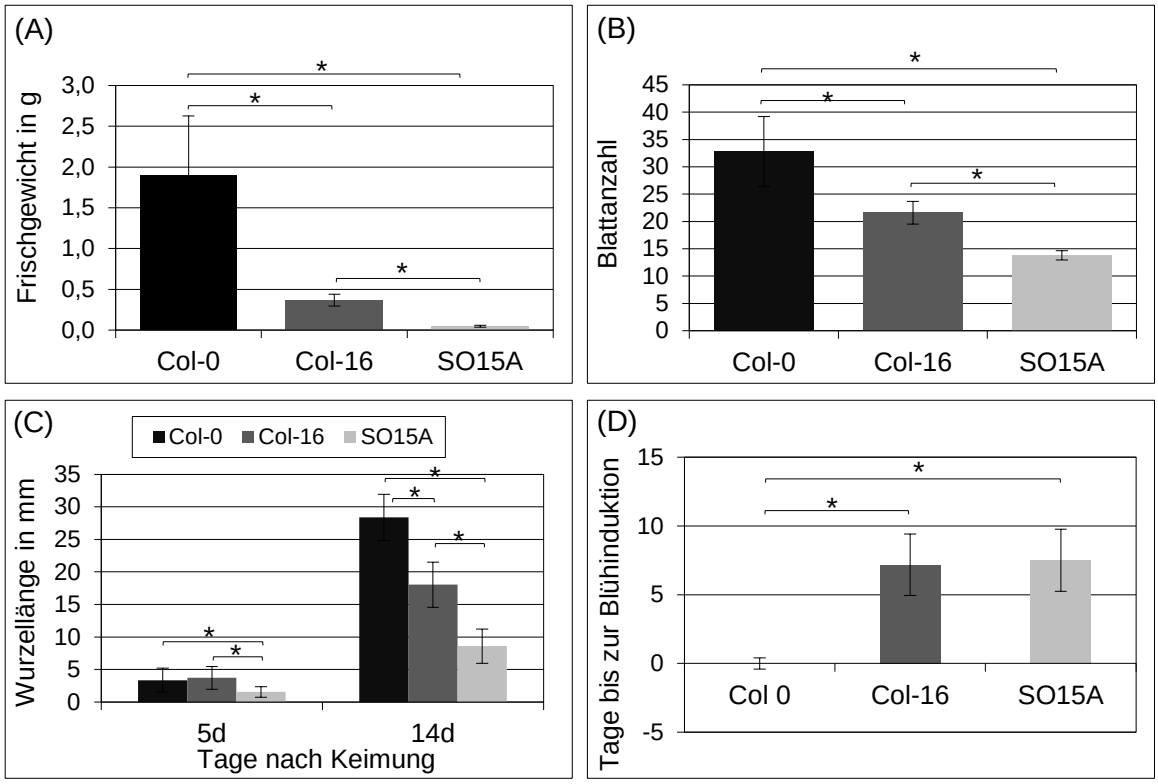

Abbildung 16: **Primärcharakterisierung der Mutante SO15A.** Rosetten-Frischgewicht (A) und Blattanzahl (B) der Sourcemutante SO15A; Mittelwerte +/- Standardabweichung von je fünf sieben Wochen alten Pflanzen; die Signifikanz der Unterschiede von Col-16 und SO15A zu Col-0 wurde mit einem modifizierten T-Test nach Student überprüft [*= p ≤ 0,05]; (C) Vertikales Wurzelwachstum in der Mutante SO15A. Das Wurzelwachstum wurde nach 5 (5d) und 14 (14d) Tagen vertikalem Wachstum auf MS-Platten bestimmt. Abgebildet sind Mittelwerte +/- Standardabweichung. Signifikanz wurde mit einem modifizierten T-Test nach Student überprüft [*= p ≤ 0,05]; Anzahl der untersuchten Keimlinge bei der Messung nach 5 Tagen: 47 für Col-0, 72 für Col-16 und 55 für SO15A; Anzahl der Keimlinge bei der Messung nach 14 Tagen: 24 für Col-0, 61 für Col-16 und 43 für SO15A (D) Bestimmung der Blühinduktion; bei je sechs Pflanzen wurde der Tag bestimmt, an dem die erste geöffnete Blüte zu beobachten war; angegeben sind Mittelwerte +/- Standardabweichung, wobei der WT-Mittelwert als Nullwert definiert wurde; *= p ≤ 0,05, bestimmt mit einem modifizierten T-Test nach Student;

Um zu untersuchen, ob sich die beschriebenen Veränderungen im Wachstum auch auf die Blühinduktion auswirken, wurden Col-0, Col-16 und SO15A Pflanzen sieben Wochen

unter Kurztagbedingungen kultiviert, in Langtagbedingungen transferiert und der Tag der ersten geöffneten Blüte bestimmt. Für Col-0 konnte im Durchschnitt nach 16 Tagen die erste geöffnete Blüte beobachtet werden, dieser Zeitpunkt wurde als „Nullwert“ definiert. Abbildung 16D zeigt, dass sowohl bei Col-16 als auch bei der Mutante SO15A im Durchschnitt sieben Tage später die erste geöffnete Blüte zu beobachten war.

Die Linie Col-16 akkumuliert aufgrund des durch MP17:GFP induzierten Kohlehydratexportblocks in Sourceblättern deutlich mehr lösliche Zucker und Stärke als der Wildtyp Col-0 (Kronberg et al., 2007). Deshalb galt zu untersuchen, ob auch in der Mutante SO15A der Gehalt an löslichen Zuckern und Stärke beeinflusst wird. Die Analyse des Stärkegehalts in den untersuchten Linien ergab, dass Col-16 aufgrund des Kohlenhydratexportblocks mehr als doppelt so viel Stärke im Vergleich zu Col-0 akkumuliert (Abbildung 17). Dies wurde von der Linie SO15A sogar noch geringfügig übertroffen. Ebenso war der Gehalt an löslichen Zuckern (Glukose, Fruktose und Saccharose) in der Mutante SO15A im Vergleich zu Col-0 signifikant erhöht und erreichte ähnliche Werte wie Col-16 (Abbildung 17).

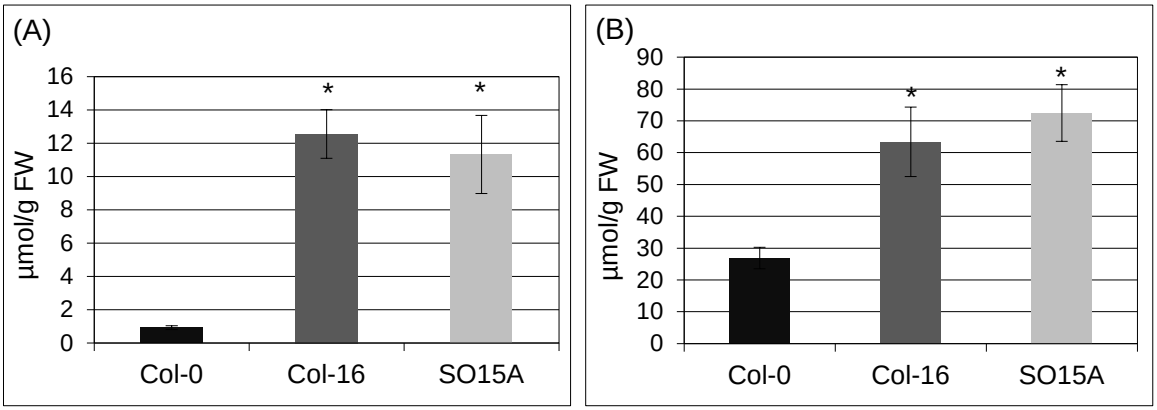

Abbildung 17: Gehalt an löslichen Zuckern (A) und Stärke (B). Mittelwerte an löslichen Zuckern (Summe aus Glukose, Fruktose und Saccharose) und Stärke wurden über einen optisch-enzymatisch gekoppelten Test für sechs Individuen pro Linie (Alter 5 Wochen) ermittelt. Standardbalken repräsentieren Standardfehler; *: P≤ 0,05 bestimmt mit einem modifizierten T-Test nach Student;

Um auszuschließen, dass die starke Wuchsretardierung auf eine fehlerhafte Photosynthese zurückzuführen ist, wurde die Intaktheit des Photosystems II (PSII) mittels Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz untersucht. Für die Mutante SO15A konnte jedoch keine Beeinträchtigung der photosynthetischen Aktivität festgestellt werden, da ein zu Col-0 und Col-16 vergleichbares F_v/F_m–Verhältnis bestimmt wurde (Abbildung 18).

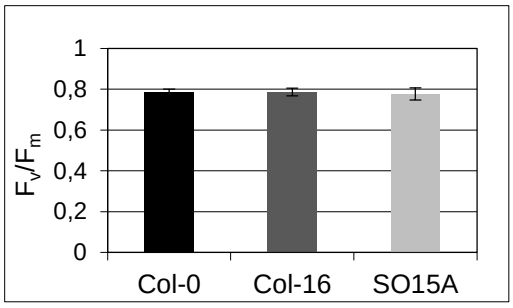

Abbildung 18: Photochemische Effizienz des PSII; gegeben als F_v/F_m-Verhältnis für Wildtyp, Col-16 und die Mutante SO15A; dargestellt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 82-89 Keimlingen (n=82-89);

2.2.4 Genetische Charakterisierung der Mutante SO15A

2.2.4.1 Marker-gestützte Kartierung

Die Identifizierung der Mutation, die für den Phänotyp in SO15A verantwortlich ist, sollte mittels der sogenannten Marker-gestützten Kartierung erfolgen (Lukowitz et al., 2000; Jander et al., 2002). Das Prinzip beruht auf dem Vorhandensein natürlich vorkommender genetischer Polymorphismen zwischen Arabidopsis Ökotypen, d.h. geographisch getrennten Varianten von Arabidopsis. Diese lassen sich in sogenannte SSLP- (*simple sequence length polymorphism*), SNP- (*single nucleotide polymorphism*) oder CAPS- (*cleaved amplified polymorphic sequences*) Marker einteilen. SSLP-Marker bedienen sich kurzer repetitiver Sequenzen, z.B. einem (AT)-Dinukleotid. Da sich die Anzahl der Wiederholungen zwischen verschiedenen Ökotypen unterscheidet, liefert eine PCR-Amplifikation des genomischen Bereichs, der den zu testenden Marker umspannt, unterschiedlich lange PCR-Produkte (Bell und Ecker, 1994; Powell et al., 1996). SSLP-Marker können aber auch Insertionen, bzw. Deletionen von einzelnen bis hin zu tausenden Basenpaaren sein. SNPs sind dagegen Einzelbasenaustausche und treten dementsprechend sehr viel häufiger auf. Die Detektion erfolgt über Sequenzierung der jeweiligen Genomabschnitte (Schmid et al., 2003). Wird durch einen SNP eine Restriktionsschnittstelle verändert oder generiert, so spricht man von einem CAPS-Marker. Der Nachweis eines CAPS-Markers erfolgt mittels PCR-Amplifikation des entsprechenden genomischen Abschnitts und anschließendem Verdau des PCR-Produkts, das daraufhin bei der Gelelektrophorese unterschiedliche Bandenmuster ergibt (Konieczny und Ausubel, 1993). Voraussetzung für die Kartierung ist also zunächst die Einkreuzung der Mutation (aus Ökotyp 1, in unserem Fall Col-0) in einen anderen Ökotypen (Ökotyp 2, in unserem Fall Landsberg *erecta*). In Vorarbeiten wurde zu diesem Zweck die transgene Linie LerNM8S erzeugt, die das *MP17:GFP* Transgen an der gleichen genomischen Stelle wie Col-16 im Landsberg *erecta* Hintergrund trägt (Kronberg,

2008). Durch achtmaliges Rückkreuzen in den Landsberg *erecta* (L*er*) Wildtyp wurde der Anteil an Col-0 Genmaterial minimiert.

Anhand der Ökotyp-spezifischen Marker lässt sich der genetische Hintergrund (Ökotyp) eines Genabschnittes exakt bestimmen, da die Marker in der Nähe des gesuchten Lokus mit dem gewünschten Phänotyp segregieren. Nachdem die Mutante SO15A dem Col-0 Hintergrund entstammt, sollten im Genombereich um die Mutation also lediglich Marker für Col-0 vorliegen, was als genetische Kopplung bezeichnet wird. Mit steigender Entfernung zur Mutation verringert sich diese genetische Kopplung. Durch *crossing over* während der Meiose bei der Selbstung der F1-Generation kommt es dann zu einer zufälligen Verteilung (Segregation) des genetischen Materials. Für nicht gekoppelte Marker liegt die Wahrscheinlichkeit für eine Segregation bei etwa 50 %. Mit zunehmender Kopplung eines Genabschnitts reduziert sich die Wahrscheinlichkeit eines Austauschs beim *crossing over*.

2.2.4.1.1 Einkreuzung der Mutante SO15A in LerNM8S

Für die Marker-gestützte Identifizierung der Phänotyp-auslösenden Mutation in der Sourcemutante SO15A wurde diese zunächst mit LerNM8S gekreuzt. Der Phänotyp sieben Wochen alter Pflanzen der F1-Generation der Kreuzungslinie (LNMSO15A) entsprach im Wesentlichen dem Phänotyp von Col-16 und LerNM8S im Vergleich zu der deutlichen Wuchsretardierung von SO15A (siehe Abbildung 19A). Zum Nachweis der erfolgreichen Einkreuzung von LerNM8S in die Sourcemutante SO15A, erfolgte die PCR-Amplifikation des SSLP-Markers ciw2 (Lukowitz et al., 2000) von genomischer DNA aus Pflanzen der F1-Kreuzung sowie der Ausgangslinien als Kontrolle.

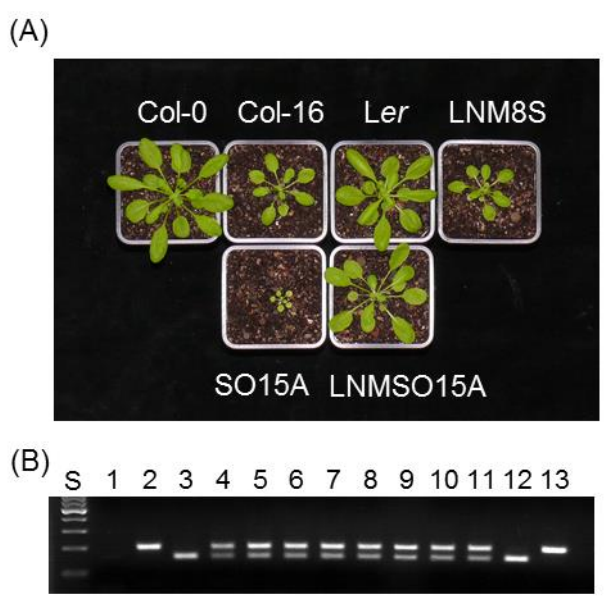

Abbildung 19: Einkreuzung der Mutante SO15A in LerNM8S
(A) Wuchsphänotyp von 7 Wochen alten Pflanzen der F1-Generation der Kreuzung LNMSO15A; Pflanzen der F1-Generation der Kreuzung der Sourcemutante SO15A mit LerNM8S weisen einen Col-16-, bzw. LerNM8S-ähnlichen Wuchs auf. Als Kontrollen sind jeweils eine Col-0 und L*er*-Pflanze abgebildet**.**

(B) PCR-Analysen von Proben genomischer DNA mit dem Ökotyp-spezifischen SSLP-Marker ciw2; ciw2 liefert ein kürzeres Produkt für Landsberg *erecta* [160 bp] als für Col-0 [200 bp]; S: DNA-Längenstandard; 1: H_2O, 2/13: Col-0, 3/12: L*er*, 4-11: LNMSO15A #1-8

Wie Abbildung 19B zeigt, waren alle Pflanzen der F1-Kreuzung heterozygot bezüglich dieses Markers, da jeweils sowohl ein Col-0 als auch ein L*er*-spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte. Dies bestätigte eine erfolgreiche Kreuzung von SO15A mit LerNM8S. Weiterhin konnte bei der Analyse der MP17:GFP Fluoreszenz in Sourceblättern der F1-Generation unter dem Stereofluoreszenzmikroskop eine Col-16 ähnliche Fluoreszenzstärke beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

2.2.4.1.2 Grobkartierung

Nach Selbstung der F1-Generation wurden für die Grobkartierung 251 Individuen der F2-Generation der Linie LNMSO15A #8 begutachtet, um den Genort der Mutation eingrenzen zu können. Hierfür wurden diese zunächst auf eine Reduktion der plasmodesmalen Lokalisation von MP17:GFP in Kotyledonen gescreent. In einem zweiten Durchgang wurden dann die selektionierten Kandidaten erneut auf eine Reduktion der MP17:GFP Fluoreszenz an PD in Sourceblättern untersucht. Letztendlich konnten 55 von 251 analysierten Pflanzen identifiziert werden, die ebenso wie die Mutante SO15A eine starke Wuchsretardierung aufwiesen, was einem Verhältnis von Col-16- zu SO15A-Phänotyp von 3,44:1 entspricht. Die auf diese Weise selektierten 55 Pflanzen sollten dementsprechend homozygot für die Mutation sein. Nach Isolierung der genomischen DNA von allen Individuen, wurden zunächst 20 genomische DNAs mit 21 SSLP-Markern (von insgesamt 22 vorgeschlagenen Markern nach Lukowitz et al., 2000; Abbildung 20) getestet.

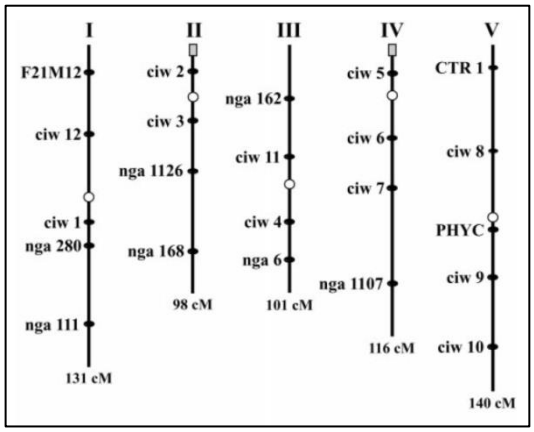

Abbildung 20: Schematische Verteilung von 22 SSLP-Markern über die fünf Arabidopsis-Chromosomen (Lukowitz et al., 2000).

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse dieser ersten Grobkartierung für alle getesteten Marker, deren Lage auf dem jeweiligen Chromosom in der Spalte links daneben ersichtlich ist. Neben der Anzahl der insgesamt analysierten Pflanzen (GES) ist die Anzahl der Pflanzen, bei denen ausschließlich ein Col-0- oder L*er*-spezifisches Produkt oder beide gleichzeitig (HEZ) nachweisbar waren, angegeben. Die Anzahl der Rekombinationen für den

jeweiligen Marker entspricht der Summe aus der Anzahl an heterozygoten Pflanzen mit PCR-Produkt für Col-0 und L*er* plus der zweifachen Anzahl an Pflanzen, welche nur ein L*er*-Produkt ergaben. Die Rekombinationsfrequenz errechnet sich aus der Anzahl von Rekombinationen geteilt durch die doppelte Anzahl genotypisierter Pflanzen und sollte für einen nicht gekoppelten Marker theoretisch bei 0,5 liegen.

Tabelle 5: Grobkartierung von SO15A. Mittels PCR wurde für Individuen der F2-Generation der Linie LNMSO15A für die jeweiligen SSLP-Marker verteilt über die Chromosomen [Chr 1-5] der Genotyp bezüglich Col-0 oder L*er* bestimmt; die Anzahl der Rekombinationen [REK] wurde als die Summe der Anzahl an heterozygoten Pflanzen [HEZ] mit gleichzeitig L*er*- und Col-0-spezifischen PCR-Produkten und der zweifachen Anzahl von Pflanzen mit ausschließlich L*er*-spezifischem Produkt berechnet; die Rekombinationsfrequenz [RF] ergab sich aus der Division von REK durch die doppelte Anzahl an untersuchten Pflanzen [GES];

Chr	Marker	GES	Col-0	L*er*	HEZ	REK	RF
1	F21M12	20	10	3	7	13	0,325
1	ciw12	20	4	6	10	22	0,550
1	ciw1	20	7	3	10	16	0,400
1	nga280	20	9	3	8	14	0,350
1	nga111	20	8	4	8	16	0,400
2	ciw2	20	5	6	9	21	0,525
2	ciw3	18	3	7	8	22	0,610
2	nga1126	18	6	5	7	17	0,470
2	nga168	20	7	6	7	19	0,475
3	nga162	19	18	0	1	1	0,026
3	ciw11	20	15	1	4	6	0,150
3	ciw4	19	7	3	9	15	0,390
3	nga6	20	2	6	12	24	0,600
4	ciw5	20	8	4	8	16	0,400
4	ciw6	20	5	7	8	22	0,550
4	ciw7	19	4	7	8	22	0,570
4	nga1107	19	3	6	10	22	0,580
5	CTR1	20	8	1	11	13	0,325
5	ciw8	20	6	3	11	17	0,425
5	PHYC	19	5	3	11	17	0,450
5	ciw9	20	6	5	9	19	0,475

Um natürliche Variationen der Rekombination auszugleichen, wurde angenommen, dass ein Marker bei einer Rekombinationsfrequenz von unter 0,3 mit dem Mutanten-Phänotyp gekoppelt ist. Dies traf für nga162 und ciw11, zwei aneinander angrenzende Marker auf

dem oberen Arm von Chromosom 3, zu. Demnach sollte in diesem Bereich die gesuchte Mutation liegen.

Um die Position der Mutation einzugrenzen, wurden weitere Marker unter Verwendung der Arabidopsis Mapping Platform (http://amp.genomics.org.cn/) erstellt und diese für alle 55 selektierten Individuen getestet. Hierbei waren zwischen den Markern 3-AB022220-2047 und 3-AB026636-2493 keine Rekombinationen mehr nachweisbar (Tabelle 6). Da in diesem Bereich, der etwa 1 Mbp genomischer Sequenz entspricht, mit dem bisherigen Pflanzenpool keine Ökotyp-spezifischen Rekombinationen mehr gefunden werden konnten, musste für die folgende Feinkartierung die Anzahl der Pflanzen auf etwa 2000 Pflanzen vergrößert werden. Durch die höhere Wahrscheinlichkeit Pflanzen zu isolieren, die Rekombinationen in einem geringeren Abstand zur Mutation aufweisen, sollte der Bereich weiter eingegrenzt werden.

Tabelle 6: Grobkartierung von SO15A. Test zusätzlicher Marker auf Chromosom 3 und deren Position in Basenpaaren [bp] in dem teilweise gekoppelten Bereich; GES = Anzahl an untersuchten Pflanzen; Col-0 = nur Col-0-spezifisches PCR-Produkt detektierbar; L*er* = ausschließlich L*er*-spezifisches PCR-Produkt nachweisbar; HEZ = heterozygot, beide Produkte vorhanden; REK = HEZ + 2xL*er*, Anzahl der Rekombinanten; RF = REK/2xGES, Rekombinationsfrequenz.

Marker	Position	GES	Col-0	L*er*	HEZ	REK	RF
3-AC016827-0956	2243047	54	40	1	13	15	0,139
nga162	4608277	55	53	0	2	2	0,018
3-AB022220-2047	4801108	55	54	0	1	1	0,009
3-AP000370-2145	5032563	55	55	0	0	0	0,000
3-AB017071-2266	5315290	55	55	0	0	0	0,000
3-AC001645-2352	5518698	54	54	0	0	0	0,000
3-AB022217-2402	5634662	55	55	0	0	0	0,000
3-AB022217-2433	5707030	53	53	0	0	0	0,000
3-AB026636-2493	5847694	52	51	0	1	1	0,009
3-AB022219-2564	6014083	55	54	0	1	1	0,009
3-AB025634-3261	7649966	54	46	0	8	8	0,074
3-AP000382-3764	8829586	55	44	2	7	11	0,100
ciw11	9774308	46	32	3	11	17	0,185

2.2.4.1.3 Feinkartierung

Für die Feinkartierung der Sourcemutante SO15A wurden 1993 Individuen der F2-Generation der Kreuzung LNMSO15A nach dem gleichen Prinzip wie bei der Grobkartierung gescreent. Auf diese Weise konnten 387 Individuen mit SO15A-ähnlicher Wuchsretardierung identifiziert werden, was einem Verhältnis von 4,0:1 von Pflanzen mit Col-16- zu SO15A-Phänotyp entspricht. Nach der Isolierung der genomischen DNA mit der Tissue Lyser-Methode, wurde diese mit den beim Grobmapping erhaltenen Randmarkern M5 (3-AB022220-2047) und M11 (3-AB026636-2493) analysiert (Tabelle 7). Für den Marker M5 an Position 4801108 bp konnten insgesamt vier heterozygote Pflanzen ermittelt werden, für den an Position 5847694 bp angrenzenden Marker M11 dagegen 18 weitere heterozygote Pflanzen. Daraufhin wurden die übrigen dazwischen liegenden Marker mit allen identifizierten Heterozygoten getestet, wobei einzig der Marker M6 bei 5032536 bp keine Rekombination mehr aufwies (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Feinkartierung von SO15A. Test zusätzlicher Marker auf Chromosom 3 und deren Position in Basenpaaren [bp] in dem teilweise gekoppelten Bereich; GES = Anzahl an untersuchten Pflanzen; Col-0 = nur Col-0-spezifisches PCR-Produkt detektierbar; L*er* = ausschließlich L*er*-spezifisches PCR-Produkt nachweisbar; HEZ = heterozygot, beide Produkte vorhanden; REK = HEZ + 2xL*er*, Anzahl der Rekombinanten; RF = REK/2xGES, Rekombinationsfrequenz.

Marker	Position	GES	Col-0	L*er*	HEZ	REK	RF
3-AB022220-2047	4801108	385	381	0	4	4	0,0052
3-AP000370-2145	5032563	385	385	0	0	0	0,0000
3-AB017071-2266	5315290	385	383	0	2	2	0,0026
3-AC001645-2352	5518698	384	378	0	6	6	0,0078
3-AB022217-2402	5634662	382	376	0	6	6	0,0079
3-AB022217-2433	5707030	384	371	0	13	13	0,0169
3-AB026636-2493	5847694	385	367	0	18	18	0,0234

Um die Position der Mutation näher zu bestimmen, wurden weitere Marker unter Verwendung der IN/DEL-Datenbank der Firma Monsanto erstellt und eingesetzt (http://www.arabidopsis.org/browse/Cereon/index.jsp; Jander et al., 2002). Zwischen den Markern 470473 und CER456061, ein Bereich von etwa 400 kb auf Chromosom 3, waren schließlich keine Rekombinationen mehr nachweisbar (Tabelle 8). Da jedoch in der IN/DEL-Datenbank keine weiteren Marker in diesem Bereich vorhanden waren und das Internettool MarkerTracker (http://bbc.botany.utoronto.ca/markertracker/ index.spy) zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung stand, konnte das Feinmapping über die bisher verwendete Methode nicht fortgeführt werden.

Tabelle 8: Feinkartierung von SO15A; Test zusätzlicher Marker auf Chromosom 3 und deren Position in Basenpaaren [bp] in dem teilweise gekoppelten Bereich; GES = Anzahl an untersuchten Pflanzen; Col-0 = nur Col-0-spezifisches PCR-Produkt detektierbar; L*er* = ausschließlich L*er*-spezifisches PCR-Produkt nachweisbar; HEZ = heterozygot, beide Produkte vorhanden; REK = HEZ + 2xL*er*, Anzahl der Rekombinanten; RF = REK/2xGES, Rekombinationsfrequenz.

Marker	Position	GES	Col-0	L*er*	HEZ	REK	RF
3-AB022220-2047	4801108	385	381	0	4	4	0,0052
470487	4825425	385	382	0	3	3	0,0039
470473	4862259	385	383	0	2	2	0,0026
CER454153	5024647	384	384	0	0	0	0,0000
3-AP000370-2145	5032563	385	385	0	0	0	0,0000
CER456061	5264625	385	383	0	2	2	0,0026
3-AB017071-2266	5315290	385	383	0	2	2	0,0026
3-AC001645-2352	5518698	384	378	0	6	6	0,0078
3-AB022217-2402	5634662	382	376	0	6	6	0,0079
3-AB022217-2433	5707030	384	371	0	13	13	0,0169
3-AB026636-2493	5847694	385	367	0	18	18	0,0234

2.2.4.2 *Next-generation sequencing*

Durch die Feinkartierung konnte für die Sourcemutante SO15A der Bereich, welcher die Mutation tragen sollte, auf etwa 400 kb genomische Sequenz eingegrenzt werden, was laut TAIR 171 Loci entspricht. Da diese Anzahl an Genen für die weitere Charakterisierung deutlich zu groß war, wurde in Kooperation mit der Humangenetik in Erlangen mittels *next generation sequencing* eine Sequenzierung des kompletten Genoms der Mutante SO15A durchgeführt. Die Sequenzierung der genomischen DNA deckte insgesamt nur circa 70 % des Gesamtgenoms ab, d.h insgesamt wurde eine deutlich niedrigere Sequenzabdeckung als erwartet erreicht. Für den 400 kb-Bereich aus dem Feinmapping wurde jedoch im Durchschnitt eine 30-fache Sequenzabdeckung erzielt, was für die folgende SNP-Analyse mehr als ausreichend war. Hierbei wurde die erhaltene Sequenz aus SO15A mit der bei TAIR (https://www.arabidopsis.org/index.jsp) veröffentlichten Sequenz für Col-0 verglichen. In den 400 kb auf Chromosom 3 zwischen Position 4862259 bp und 5264624 bp konnten insgesamt 198 SNPs (siehe Anhang Tabelle 19) identifiziert werden. Die Mutation, die den Phänotyp in SO15A auslöst, muss jedoch homozygot vorliegen, was für nur 35 der 198 SNPs der Fall war (siehe Tabellenspalte „heterozygot“; FALSCH, wenn homozygot). Von diesen 35 SNPs lagen sechs SNPs nicht in Exons (lila unterlegt). Um auszuschließen, dass möglicherweise

Introns und somit der Spleißvorgang oder auch regulatorische Elemente betroffen sein könnten, wurde die genau Position über das Internettool „Sequence Viewer“ der Homepage TAIR (http://www.arabidopsis.org/) überprüft. Alle sechs SNPs lagen in intergenischen Bereichen, konnten also vernachlässigt werden. Von den verbleibenden 29 SNPs wurden insgesamt 22 SNPs bereits bei einer SNP-Analyse zwischen Col-0 mit Bur-0 und Tsu-1 (Ossowski et al., 2008), welche mit TAIR abgeglichen ist (in Tabelle grau unterlegt) beschrieben. Diese wurden deshalb ebenfalls nicht berücksichtigt. Die hellblau unterlegten drei SNPs erhielten bei TAIR Treffer in „*transposable element genes*“, waren also auch vernachlässigbar. Von den vier restlichen Kandidaten (türkis unterlegt) fiel SNP#147 weg, da es sich hierbei um eine stumme Mutation (Leucin bleibt erhalten) handelt, wodurch SNP#144, SNP#168 und SNP#196 als potentiell Phänotyp-auslösende SNPs in der Mutante SO15A übrig blieben. Die Sequenzabdeckung an der jeweiligen Position ist in Abbildung 21 dargestellt.

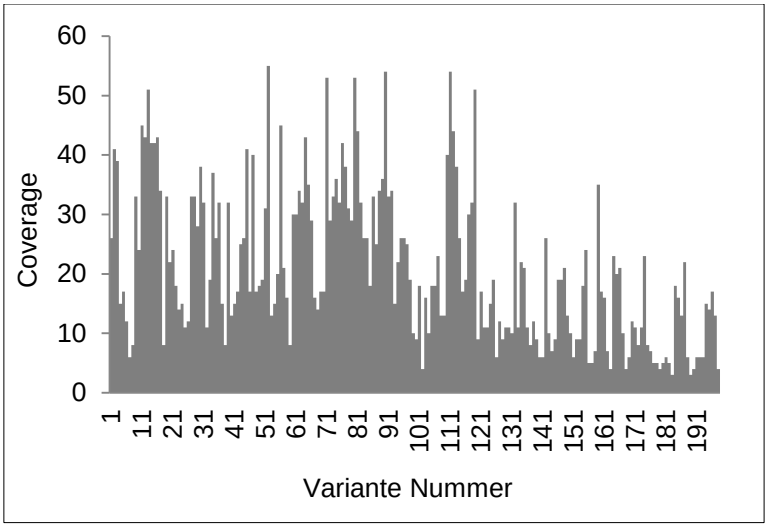

Abbildung 21: Sequenzabdeckung für alle detektierten SNP-Varianten im 400 kb Bereich aus dem Feinmapping von SO15A; aufgetragen ist die Coverage (y-Achse) für jede der 198 SNP-Varianten (x-Achse) in diesem Bereich;

Die durch TAIR ermittelten Gene, in denen die drei verbleibendem SNPs liegen, sind in Tabelle 9 zusammengefasst, inklusive der durch das Internettool Arabidopsis Subcellular Proteomic Database vorhergesagten Lokalisation (http://suba.plantenergy.uwa.edu.au; SUBA). Hierbei war der Cholintransporter der am wahrscheinlichsten in Frage kommende Kandidat. Zum einen war es das einzige Protein, für das eine Plasmamembran-Lokalisation vorhergesagt wurde. Zum anderen wurde beschrieben, dass 99 % der durch EMS hervorgerufenen Mutationen G/C zu A/T-Transitionen sind, da EMS eine Alkyierung von Guanin bewirkt (Greene et al., 2003). Genau dies wäre nur für den besagten SNP #196 der Fall. Um auszuschließen, dass die drei identifizierten Kandidaten-SNPs bereits in Col-16 vorhanden sind, erfolgte eine PCR-Amplifikation und Sequenzierung von genomischer DNA in einen Bereich von ca. 500 bp um den jeweiligen SNP in Col-16 und

SO15A. Diese Analyse ergab, dass SNP#144 und SNP#168 weder in Col-16 noch in SO15A vorhanden waren. Nur SNP#196 tauchte in Übereinstimmung mit dem Ergebnis des *next generation sequencing* in der Mutante SO15A auf, jedoch nicht in Col-16. Das verbleibende Kandidatengen war demnach *AT3G15380*, welches für das Cholintransporter-ähnliche Protein CHER1 kodiert.

Tabelle 9: Zusammenfassung der drei durch *next generation sequencing* identifizierten Kandidatengene; dargestellt sind die jeweilige SNP-Nummer, die genaue Position auf Chromosom 3 in bp, der Lokus, das betroffene Gen, die Mutation und die durch Arabidopsis Subcellular Proteomic Database (SUBA; http://suba.plantenergy.uwa.edu.au) vorhergesagte Lokalisation.

SNP #	Position	Lokus	Gen	Mutation	vorhergesagte Lokalisation
144	4940915	AT3G14700	SART-1 family	GCC zu CCC, Alanin zu Prolin	Cytosol
168	4963078	AT3G14780	Transposase	TTT zu GTT, Phenylalanin zu Valin	Nucleus
196	5194520	AT3G15380	Plasma-membrane choline transporter family protein	GGA zu GAA, Glycin zu Glutamat	PM

2.3 Untersuchung eines Cholintransporter-ähnlichen Proteins in Arabidopsis und dessen Einfluss auf die plasmodesmale Lokalisation von MP17

2.3.1 Bestätigung der *CHER1* Genidentität

2.3.1.1 Analyse der T-DNA Insertionslinie *cher1-4*

Zur Bestätigung der *CHER1* Genidentität wurde die T-DNA Insertionslinie SALK_065853C untersucht. Die Homozygotie der T-DNA Insertion wurde über zwei PCR-Amplifikationen, zum einen für den Nachweis der T-DNA Insertion und zum anderen für den Nachweis des WT-Allels, bestätigt (Abbildung 22B). Um zu überprüfen, ob die Transkriptmenge von *CHER1* in den homozygoten Individuen reduziert ist, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Transkriptmenge von *CHER1* in den homozygoten Individuen für SALK_065853C im Vergleich zu den Kontrollen Col-0 und Col-16 deutlich reduziert war (siehe Abbildung 22C). Dies spiegelte sich auch im Phänotyp der T-DNA Insertionslinie SALK_065853C, welche im Folgenden als *cher1-4* bezeichnet wird, wider. So konnte eine starke Wachstumsretardierung beobachtet werden (siehe Abbildung 22D). Diese war weniger stark ausgeprägt als bei der Mutante SO15A, was aber wohl darauf zurückzuführen ist, dass die T-DNA Insertionslinie auf einem Col-0 Hintergrund basiert, die Mutante SO15A jedoch auf der Linie Col-16, die ohnehin schon einen kleineren Wuchs aufweist. Weiterhin wies *cher1-4* ebenso wie die Mutante SO15A hellgrüne Blätter und einen eher buschigen Wuchs auf. Um zu klären, warum es sich bei *cher1-4* nur um einen *knockdown*, nicht aber um einen kompletten *knockout* handelt, wurde der exakte Lokus der T-DNA näher bestimmt. Anhand der bei NASC angegebenen flankierenden Sequenz der T-DNA sowie mit Hilfe des Internettools NASCe! AtEnsembl *A.thaliana* ContigView (http://atensembl.arabidopsis.info/Arabidopsis_thaliana_TAIR/contigview) wurde die Position der T-DNA Insertion im ersten Intron von *At3g15380* bestimmt. Über PCR-Amplifikation des entsprechenden genomischen Bereichs aus Col-0 und *cher1-4* konnte dies bestätigt werden. Es lässt sich vermuten, dass durch die etwa 4,5 kb große T-DNA Insertion der Spleißvorgang beeinträchtigt wird, was den *knockdown* von *At3g15380* in der T-DNA Insertionslinie *cher1-4* hervorruft. Die schematische Repräsentation der Genstruktur von *At3g15380* ist in Abbildung 22A skizziert.

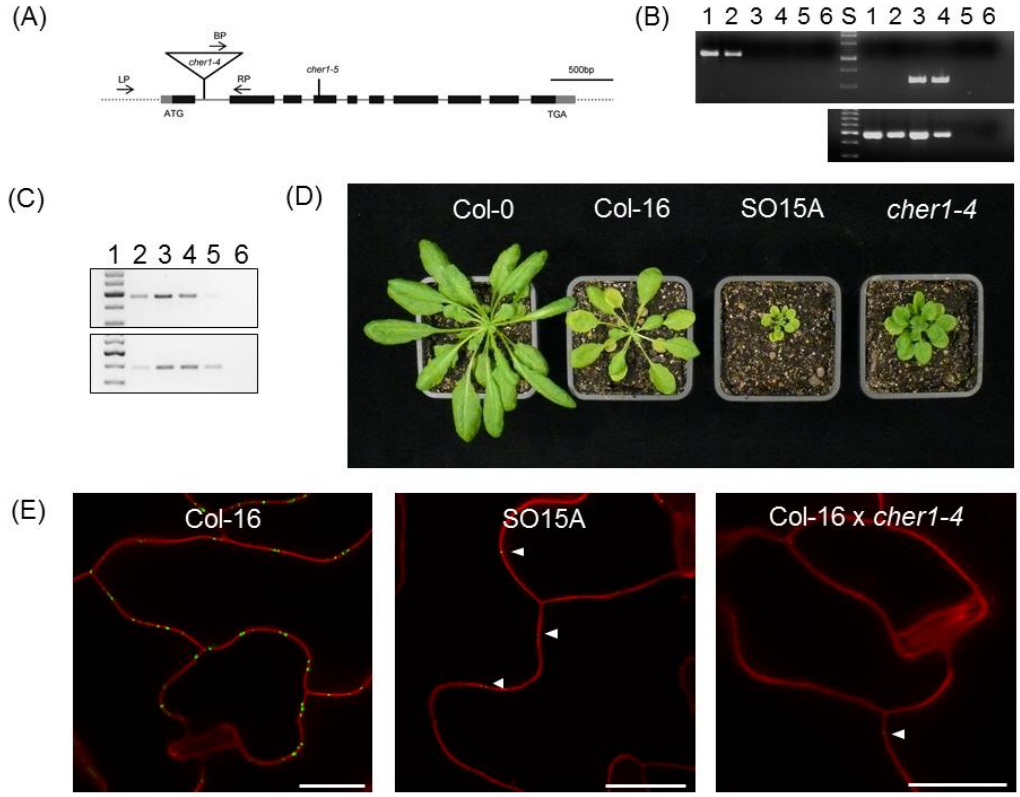

Abbildung 22: Analyse der T-DNA Insertionslinie *cher1-4*. (A) Schematische Repräsentation der Genstruktur von *At3g15380* (modifiziert nach NASCe! AtEnsembl *A.thaliana* ContigView). Exons sind durch schwarze Boxen dargestellt, Introns als durchgezogene graue Linie. Die Position der T-DNA in der T-DNA Insertionslinie *cher1-4* befindet sich im ersten Intron und die GGA → GAA Punktmutation in der Mutante SO15A und *cher1-5* im vierten Exon. Die eingezeichneten Primer (LP, RP und BP) wurden für die Genotypisierung von *cher1-4* verwendet. (B) PCR-Analyse zum Nachweis der T-DNA Insertion mit genomischer DNA als Template (oberes Gelbild); zur Amplifizierung des WT-Allels (links vom Standard) für *At3g15380* wurden die Primer KL63 und KL64 [Produkt 1115 bp] verwendet und zum Nachweis der T-DNA-Insertion (rechte Seite vom Standard) die Primer KL63 und LbaI [Produkt etwa 700 bp]; als Qualitätskontrolle der genomischen DNA diente die PCR-Amplifikation von *AtAktin* (unteres Gelbild). 1+2: Col-0, 3+4: *cher1-4***,** 5+6: Negativkontrolle; (C) Semi-quantitative RT-PCR (oben) zeigt eine Herunterregulierung der *CHER1* Transkriptmenge in der T-DNA Insertionslinie *cher1-4*. Hierfür wurden die Primer KL101 und KL157 [Produkt 472 bp] verwendet, wobei KL157 zwei Exons überspannt. 1: 100 bp Standard, 2: Col-0, 3: Col-16, 4: SO15A, 5: *cher1-4*, 6: Negativkontrolle. Die PCR-Amplifikation von *AtAktin* diente als Qualitätskontrolle für die cDNA (unten). (D) Makroskopischer Phänotyp von *cher1-4*; abgebildet sind 8 Wochen alte Pflanzen der Linien Col-0, Col-16, SO15A und *cher1-4*; wie die Mutante SO15A weist *cher1-4* ein stark verzögertes, buschiges Wachstum auf; (E) Herunterregulierung der *CHER1* Transkriptmenge resultiert in einer drastischen Reduktion der MP17:GFP Fluoreszenz an Plasmodesmata in der Kreuzungslinie Col-16 x *cher1-4* (abgebildet ist die Linie #25); KLSM-Analyse von Epidermiszellen in Sourceblättern der Linien Col-16, SO15A, Col-16 x *cher1-4*. MP17:GFP Fluoreszenz ist grün dargestellt, die Zellwände wurden durch Propidiumiodid rot gefärbt; Standard entspricht 20 µm;

Anschließend sollte analysiert werden, ob ein *knockdown* von *CHER1* die plasmodesmale Lokalisation von MP17 beeinflusst. Für die stabile Expression von MP17 erfolgte eine Einkreuzung der Linie Col-16 in die T-DNA Insertionslinie *cher1-4*. Die Individuen der F1-Generation zeigten einen Col-16-Wuchsphänotyp sowie Col-16-ähnliche Fluoreszenz unter dem Stereofluoreszenzmikroskop. F2-Individuen, die sowohl für MP17 als auch für die T-DNA Insertion homozygot waren, wurden schließlich mittels KLSM analysiert. Hierbei konnte für die Linie Col-16x*cher1-4* deutlich weniger MP17:GFP Fluoreszenz an

PD detektiert werden, ebenso wie es bei der Linie SO15A der Fall ist (siehe Abbildung 22E). Somit konnte gezeigt werden, dass sich bereits eine Herunterregulierung der Transkriptmenge von *CHER1* auf die plasmodesmale Lokalisation von MP17:GFP auswirkt.

Wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben, konnte für die Mutante SO15A eine Akkumulation von löslichen Zuckern und Stärke in Sourceblättern beobachtet werden. Um zu analysieren, ob dieser Effekt auch ohne MP17 auftritt, wurde der Zuckergehalt in der T-DNA Insertionslinie *cher1-4* bestimmt. Hierfür wurden von sechs Wochen alten Pflanzen der Linien Col-0, Col-16, SO15A und *cher1-4* von jeweils sechs Individuen pro Linie zwei gegenüberliegende Sourceblätter beprobt. Für *cher1-4* war bezogen auf Col-0 die gleiche Tendenz wie für SO15A bezogen auf Col-16 zu erkennen (Abbildung 23). So war der Gehalt an löslichen Zuckern bis zu 2-fach und der Stärkegehalt etwa 1,5-fach erhöht. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Akkumulation von Zuckern und Stärke auch unabhängig von MP17 allein durch die Mutation in *At3g15380* verursacht wird, was wiederum eine Beeinträchtigung des plasmodesmalen Transports nahelegen würde. Bei der Linie SO15A tritt demnach anscheinend ein additiver Effekt von MP17 und der Mutation in *CHER1* auf.

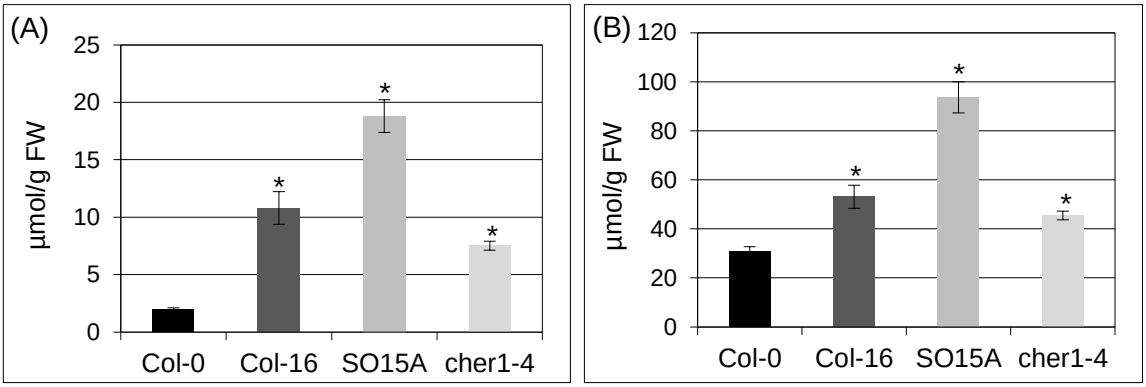

Abbildung 23: Gehalt an löslichen Zuckern (A) und Stärke (B) in den Arabidopsislinien Col-0, Col-16, SO15A und *cher1-4*. Mittelwerte an löslichen Zuckern (Summe aus Glukose, Fruktose und Saccharose) und Stärke wurden über einen optisch-enzymatisch gekoppelten Test für sechs Individuen pro Linie (Alter 6 Wochen) ermittelt. Standardbalken repräsentieren Standardfehler; *: P≤ 0,05 bestimmt mit einem modifizierten T-Test nach Student;

2.3.1.2 Klonierung eines *artificial micro* RNA Konstruktes

Da für *CHER1* nur eine T-DNA Insertionslinie zur Verfügung stand, wurde zusätzlich die Klonierung eines *artificial micro* RNA (amiRNA) Konstruktes verfolgt, um eine unabhängige Bestätigung zu erhalten. Das Design und die Klonierung der 21 bp langen amiRNA-Sequenz erfolgten mit Hilfe des Internettools WMD3 - Web MicroRNA Designer (http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi) und ist in Kapitel 4.2.6 näher beschrieben. Das erhaltene Plasmid ami*CHER1*_pFV3 wurde in Agrobakterien

transformiert und diese für die stabile Transformation von Col-0 und Col-16 Pflanzen eingesetzt, wobei im Folgenden nur Col-16_ami*CHER1* Pflanzen beschrieben werden. Nach der stabilen Transformation von Col-16 Pflanzen und BASTA-Selektion wurden insgesamt 50 Pflanzen erhalten, die alle den charakteristischen Wachstumsphänotyp von SO15A und *cher1-4* aufwiesen (Abbildung 24A). Die Herunterregulierung der *CHER1* Transkriptmenge wurde über RT-PCR validiert (Abbildung 24B). Die KLSM-Analyse brachte die gleiche Reduktion der MP17:GFP Lokalisation an PD wie schon bei SO15A und Col-16x*cher1-4* zum Vorschein. Somit wurde ein unabhängiger Nachweis dafür erbracht, dass eine Verringerung der *CHER1* Transkriptmenge eine Verminderung der plasmodesmalen Lokalisation von MP17:GFP zur Folge hat. Warum dies der Fall ist, sollte im weiteren Verlauf untersucht werden.

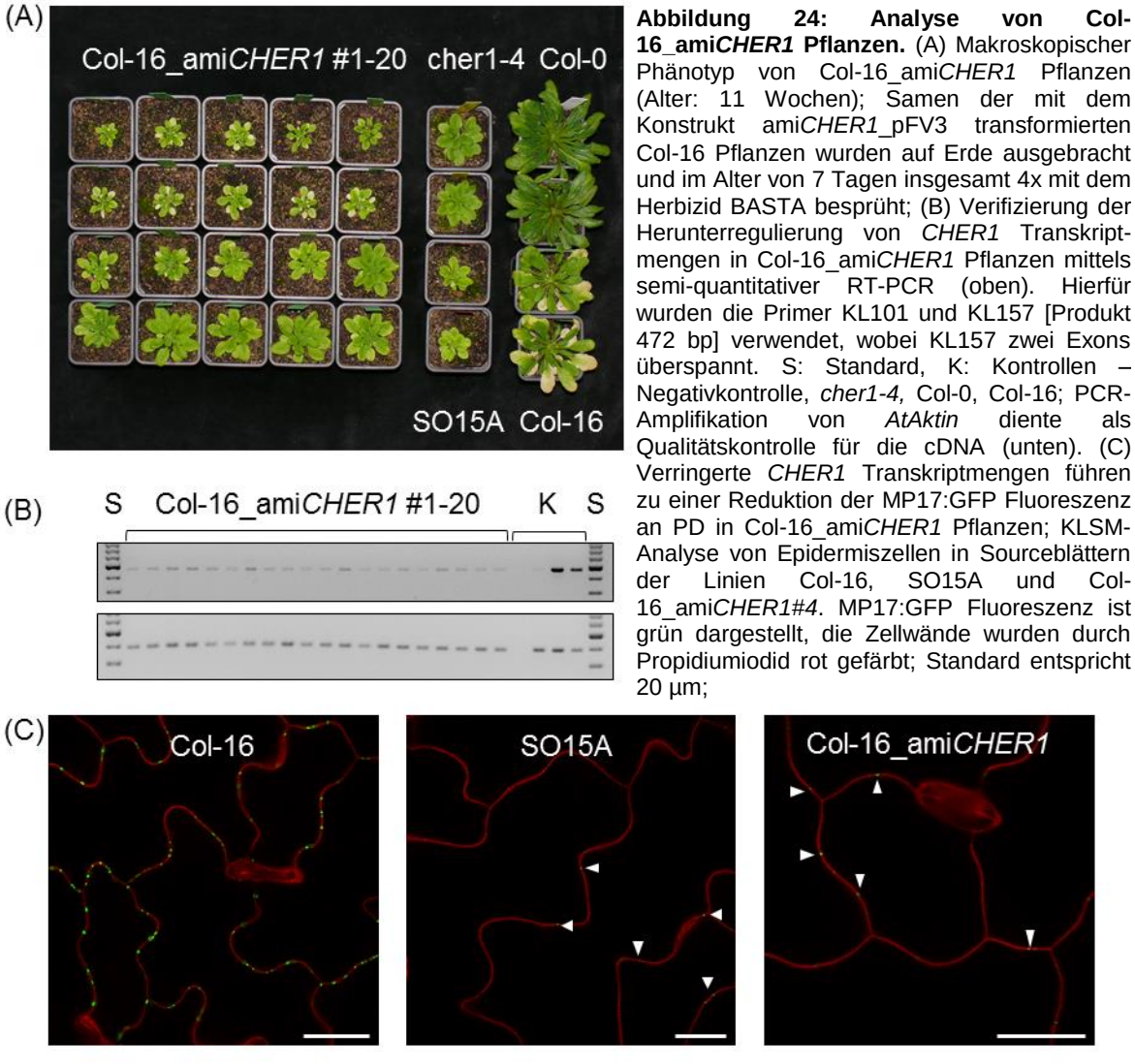

Abbildung 24: Analyse von Col-16_ami*CHER1* Pflanzen. (A) Makroskopischer Phänotyp von Col-16_ami*CHER1* Pflanzen (Alter: 11 Wochen); Samen der mit dem Konstrukt ami*CHER1*_pFV3 transformierten Col-16 Pflanzen wurden auf Erde ausgebracht und im Alter von 7 Tagen insgesamt 4x mit dem Herbizid BASTA besprüht; (B) Verifizierung der Herunterregulierung von *CHER1* Transkriptmengen in Col-16_ami*CHER1* Pflanzen mittels semi-quantitativer RT-PCR (oben). Hierfür wurden die Primer KL101 und KL157 [Produkt 472 bp] verwendet, wobei KL157 zwei Exons überspannt. S: Standard, K: Kontrollen – Negativkontrolle, *cher1-4,* Col-0, Col-16; PCR-Amplifikation von *AtAktin* diente als Qualitätskontrolle für die cDNA (unten). (C) Verringerte *CHER1* Transkriptmengen führen zu einer Reduktion der MP17:GFP Fluoreszenz an PD in Col-16_ami*CHER1* Pflanzen; KLSM-Analyse von Epidermiszellen in Sourceblättern der Linien Col-16, SO15A und Col-16_ami*CHER1#4*. MP17:GFP Fluoreszenz ist grün dargestellt, die Zellwände wurden durch Propidiumiodid rot gefärbt; Standard entspricht 20 µm;

2.3.2 Lokalisation von CHER1

Im Arabidopsis-Genom sind außer *At3g15380* sechs weitere Gene als „*Plasma-membrane choline transporter family protein*“ annotiert, von denen die meisten auch in der Plasmamembran lokalisiert sein sollen (The Arabidopsis Information Resource (TAIR), www.arabidopsis.org, Aug 07, 2014). Für CHER1 wird neben der PM-Lokalisation jedoch auch eine PD-Assoziation vorhergesagt (Benschop et al., 2007; Fernandez-Calvino et al., 2011). Aus diesem Grund sollte zunächst überprüft werden, ob CHER1 tatsächlich eine PM-Lokalisation oder womöglich sogar eine Akkumulation an PD aufweist und ob die eingebrachte Mutation zu einer Veränderung des Lokalisationsmusters führt. Zu diesem Zweck wurden N- und C-terminale GFP-Fusionen mit dem CHER1 Wildtyp- und dem Mutantenallel (CHER1_G247E) durchgeführt. Für die C-terminalen GFP-Fusionen konnte nur eine schwache und wenig reproduzierbare Fluoreszenz beobachtet werden. Aufgrund des schwachen GFP-Signals wurden für die folgenden Lokalisierungsstudien die N-terminalen GFP-Fusionen mit dem *silencing suppressor* p19 koinfiltriert (Abbildung 25).

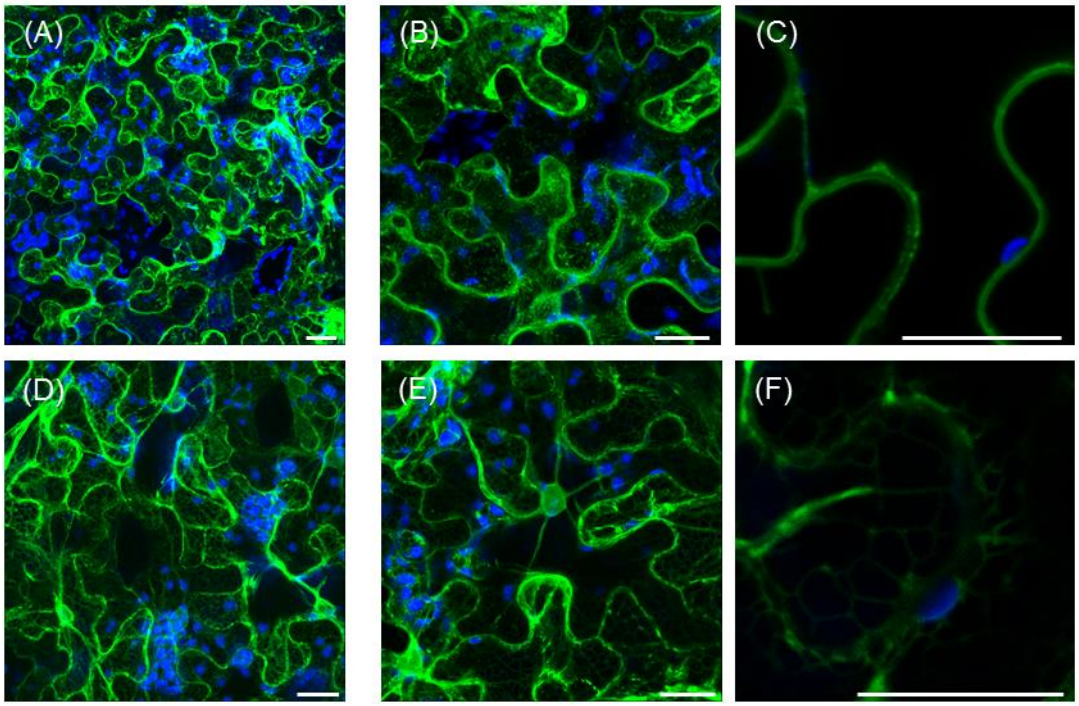

Abbildung 25: Lokalisierung von GFP:CHER1 und GFP:CHER1_G247E. Koinfiltration von GFP:CHER1 (A-C) und GFP:CHER1_G247E (D-F) mit dem *silencing suppressor* p19. 2 dai lokalisieren sowohl GFP:CHER1 (A) als auch GFP:CHER1_G247E (D) im ER, wobei GFP:CHER1 zusätzlich ein Labeling von pünktchenartigen Strukturen zeigt. 3 dai lokalisiert GFP:CHER1 (B, C) an der Plasmamembran und Vesikel-ähnlichen Strukturen, welche stark an Endosomen erinnern. Im Gegensatz dazu scheint GFP:CHER1_G247E (E, F) weiterhin im ER zu verbleiben. GFP-Fluoreszenz ist grün und Chlorophyll-Autofluoreszenz ist blau dargestellt. Standard entspricht 20 µm.

Zwei Tage nach der Infiltration lokalisierten GFP:CHER1 und GFP:CHER1_G247E beide im ER. Dieses Muster verlagerte sich drei Tage nach der Infiltration für GFP:CHER1 zu einer PM-Assoziation verbunden mit einer Lokalisation in Vesikel-ähnlichen Strukturen, womöglich Endosomen, wohingegen GFP:CHER1_G247E weiterhin im ER verblieb. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Austausch von Glycin zu Glutamat die PM-Lokalisation von CHER1 beeinträchtigt. Die Vorhersage der Membrantopologie von CHER1 unter Verwendung der Internettools MEMSAT3 (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk) und TOPO2 (http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open-topo2.py) brachte zum Vorschein, dass CHER1 insgesamt zehn Transmembrandomänen aufweist und sowohl der N-, als auch der C-Terminus des Proteins in das Cytoplasma ragen. Weiterhin lässt sich ein großer extrazellulärer Loop am N-Terminus erkennen. Die G zu A Transition in der Linie SO15A resultiert in dem Aminosäureaustausch G247E in der zweiten Transmembrandomäne (Abbildung 26, blau hervorgehoben). In diesem Zusammenhang wäre es möglich, dass das durch die Mutation verursachte Einbringen einer negativen Ladung in die zweite Transmembrandomäne in einer fehlerhaften Faltung des Proteins, einem gestörten Membraneinbau oder einem beeinträchtigten ER-Export resultieren könnte.

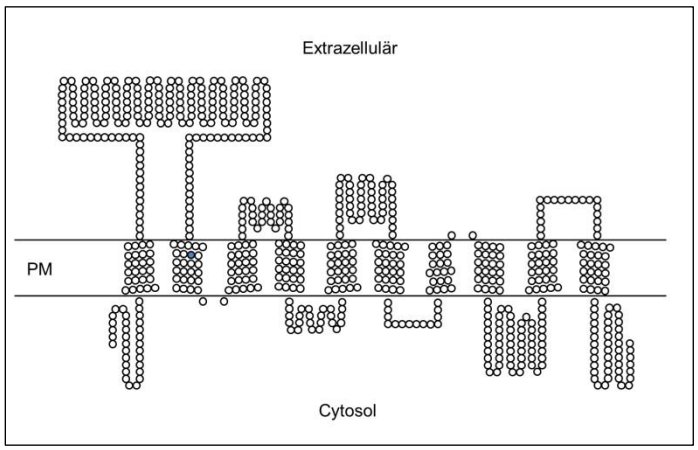

Abbildung 26: Transmembrantopologie von CHER1. Die Vorhersage der Transmembrantopologie von CHER1 erfolgte durch die Internettools MEMSAT3 (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk) und TOPO2 (http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open-topo2.py). Der aus der Transition G → A resultierende Austausch von Glycin zu Glutamat in der Mutante SO15A in der zweiten Transmembrandomäne ist blau hervorgehoben. PM: Plasmamembran;

2.3.3 Interaktion CHER1 und MP17

Der Nachweis einer direkten Interaktion zwischen CHER1 und MP17 sollte *in planta* mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) erfolgen (Walter et al., 2004). Hierfür wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Walter Schröder CHER1 und MP17 entweder mit den ersten 155 Aminosäuren oder den restlichen carboxyterminalen Aminosäuren des gelb-fluoreszierenden YFP-Derivates Venus fusioniert, welches aufgrund einer Mutation eine größere Stabilität als das ursprüngliche YFP aufweist (Nagai et al., 2002). Kommen die zu testenden Fusionsproteine durch eine direkte oder indirekte

Interaktion in räumliche Nähe, erfolgt die Rekonstitution des Fluorophors, welches daraufhin bei einer Wellenlänge von 514 nm angeregt werden kann. Die in Kapitel 4.2.14 erwähnten Kombinationen wurden in *N. benthamiana* über Agroinfiltration transient koexprimiert und 48 Stunden danach mit dem KLSM auf eine Interaktion hin untersucht (Abbildung 27).

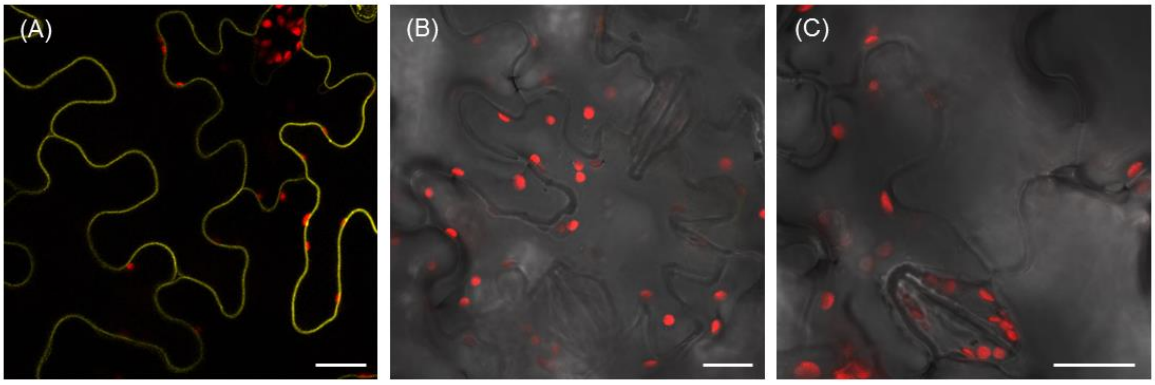

Abbildung 27: BIFC-Analyse von CHER1 und MP17. Epidermiszellen von *N.benthamiana* 48 h nach Infiltration mit (A) XopJ-YFP^{N} + NtRPT6-YFP^{C}, (B) VENUS^{C}-CHER1 + MP17-VENUS^{N} und (C) VENUS^{C}-CHER1_G247E + MP17-VENUS^{N}; YFP-Fluoreszenz ist gelb dargestellt, Autofluoreszenz der Chloroplasten rot; Überlagerung mit Durchlichtbildern (B, C). Größenstandard entspricht 20 µm;

Dabei konnte jedoch nur für die Positivkontrolle, der Kombinationen von XopJ-YFP^{N} und NtRPT6-YFP^{C} (Üstün et al., 2013) YFP-Fluoreszenz an der Plasmamembran detektiert werden, wohingegen alle Kombinationen des Cholintransporters CHER1 mit MP17 keine Fluoreszenz zeigten (Walter Schröder, unveröffentlicht).

2.3.4 Auskreuzung von MP17 aus der Mutante SO15A

Für weiterführende Arbeiten war es ebenfalls von Vorteil, MP17 aus der Mutante SO15A auszukreuzen, da die konstitutive Expression von MP17 viele Nebeneffekte, insbesondere in Hinsicht auf Zucker- und Stärkeakkumulation, hervorruft. In der F2-Generation der Kreuzung Col-0xSO15A konnten von 90 analysierten Individuen zehn Pflanzen selektioniert werden, die zum einen den Wachstumsphänotyp der Mutante SO15A aufwiesen - wodurch garantiert ist, dass die Mutation in *CHER1* homozygot vorliegen muss - und bei denen zum anderen das MP17 Transgen via PCR-Amplifikationen mit spezifischen Primern nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Diese Mutanten, welche die Punktmutation mehr oder weniger im Wildtyphintergrund tragen, werden im Folgenden als *cher1-5* bezeichnet. Die makroskopische Analyse acht Wochen alter Pflanzen zeigte die charakteristische Wuchsretardierung, allerdings sind *cher1-5* Mutanten geringfügig größer als die Mutante SO15A, deren Wachstum durch die Anwesenheit von MP17 zusätzlich verzögert ist (Abbildung 28).

Abbildung 28: Makroskopische Analyse von *cher1-5*. Abgebildet sind 8 Wochen alte Pflanzen der Linien Col-0, *cher1-4* und *cher1-5*.

2.3.5 Komplementation SO15A

Um eine Komplementation des Mutantenphänotyps zu erzielen, wurde das Wildtypgen mit verschiedenen Tags in die Mutanten über *floral dip* stabil eingebracht (siehe Kapitel 4.2.7). Allerdings konnten mittels BASTA-, bzw. Kanamycin-Selektion in der T1-Generation keine positiven Pflanzen selektioniert werden. Da die *artificial micro* RNA-Daten einen unabhängigen Nachweis des Genortes lieferten, wurde von weiteren Komplementationsversuchen Abstand genommen.

2.3.6 Metabolitmessungen

2.3.6.1 Messung des Cholingehaltes

Die TAIR-Annotation von CHER1 als „*Plasma-membrane choline transporter family protein*“(http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=AT3G15380&sub_type=gene&term) warf die Frage auf, ob die Cholinkonzentration in der Mutante verändert ist. Um zu überprüfen, ob sich der Defekt in dem putativen Cholintransporter CHER1 in einem Entwicklungs-abhängigen Prozess auf die Pflanze auswirkt, wurden Blätter verschiedener Entwicklungsstadien von acht Wochen alten Pflanzen der Linien Col-0, Col-16 und SO15A beprobt. Hierfür wurden jeweils fünf Gruppen aus fünf Individuen erzeugt, wobei pro Individuum drei Blätter verwendet wurden, und das Gewicht der Blattproben bestimmt. Als Sinkblätter wurden jeweils Blatt #5, 6 und 7 geerntet, als Sourceblätter die größten Blätter und als seneszente Blätter die ältesten Blätter mit beginnenden Chlorosen. Bei der Cholinmessung zeigte sich, dass der Cholingehalt in der Mutante SO15A in Sourceblättern und seneszenten Blättern etwa 2-fach im Vergleich zu Col-0 und Col-16 erhöht war, während in Sinkblättern keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren (Abbildung 29). Es blieb aber weiterhin unklar, ob CHER1 als Importer

oder Exporter für Cholin fungiert und folglich blieb auch die Frage offen, in welchem subzellulären Kompartiment der Zelle Cholin akkumuliert.

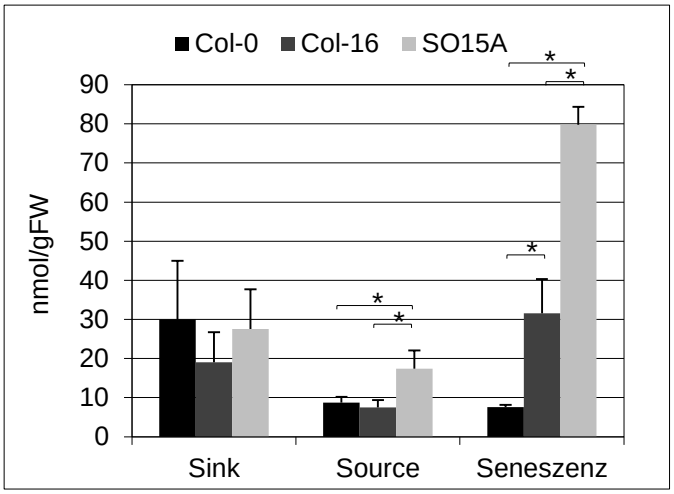

Abbildung 29: Quantifizierung des Cholingehaltes in Col-0, Col-16 und SO15A. Abgebildet sind Mittelwerte des Cholingehaltes +/- Standardabweichung von je vier oder fünf Probengruppen (je 5 Individuen; Alter 8 Wochen) pro Linie und Entwicklungsstadium (Sink, Source, Seneszenz); *: P≤ 0,05 bestimmt mit einem modifizierten T-Test nach Student; die Messung wurde von Dr. Jörg Hofmann durchgeführt.

2.3.6.2 Messung der Fettsäuren

Phosphatidylcholin ist das Hauptphospholipid in Tieren und Pflanzen, insbesondere in der Plasmamembran und wird u.a. aus freiem Cholin gebildet (http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/pc/index.htm). Somit könnte der in der Mutante SO15A beobachtete Phänotyp, d.h. sowohl die extreme Wachstumsretardierung als auch die stark reduzierte MP17:GFP Fluoreszenz an PD, auf eine Veränderung in der Membranzusammensetzung zurückzuführen sein. Um einen ersten Hinweis auf eine veränderte Membranzusammensetzung zu bekommen, wurde zunächst analysiert, ob die Zusammensetzung der Fettsäuren in der Mutante SO15A und der T-DNA Insertionslinie *cher1-4* im Vergleich zu Col-0 und Col-16 verändert ist. Hierfür wurde von Jörg Hofmann ein Protokoll zur Isolation und Messung von Fettsäuren etabliert (siehe Kapitel 4.2.12).

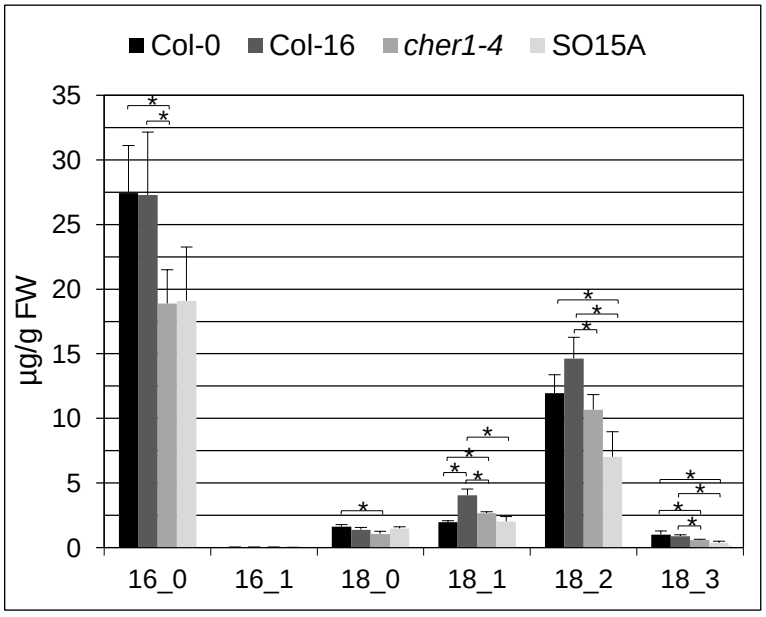

Abbildung 30: Messung des Fettsäuregehalts in Plasmamembranpräparationen von Col-0, Col-16, SO15A und *cher1-4*. Gemessen wurden aufgearbeitete Blattproben 13 Wochen alter Pflanzen von je 4 Individuen der Linien Col-0, Col-16, SO15A und *cher1-4;* die Messung wurde von Dr. Jörg Hofmann durchgeführt.

Die Ergebnisse (siehe Abbildung 30) deuteten darauf hin, dass Palmitinsäure (16:0) in der Mutante SO15A und der T-DNA Insertionslinie *cher1-4* im Vergleich zu Col-0 und Col-16 deutlich reduziert ist. Ein ähnlicher Trend zeigte sich in der Plasmamembranpräparation auch bei den anderen gemessenen Fettsäuren mit Ausnahme von 18:0. Für 18:1 Fettsäuren tritt dieser Effekt im Vergleich zu Col-16 noch deutlicher auf, allerdings liegt der Wert für Col-0 hier ebenfalls im Bereich von SO15A und *cher1-4*.

2.3.6.3 Messung der Phospholipide

Wie soeben beschrieben, ergab eine Messung der Fettsäuren, dass Palmitinsäure (16:0) in der Mutante SO15A und *cher1-4* reduziert ist. Um die genaue Bedeutung dieses Ergebnisses für die Zusammensetzung der Plasmamembran zu ermitteln, erfolgte im Anschluss eine Messung der Gehalte verschiedener ausgewählter Phospholipide in der T-DNA Insertionslinie *cher1-4* und der Mutante *cher1-5* (Erläuterung siehe Kapitel 2.3.4, Anhang Tabelle 22) im Vergleich zu Col-0 (Abbildung 31). Tatsächlich war der Gehalt an Phosphatidylcholin 759,0 in den CHER1-Mutanten im Vergleich zu Col-0 signifikant um etwa 14 % reduziert. Im Gegensatz dazu zeigte der Gehalt an Phosphatidylethanolamin 718,7 eine dementsprechende Erhöhung.

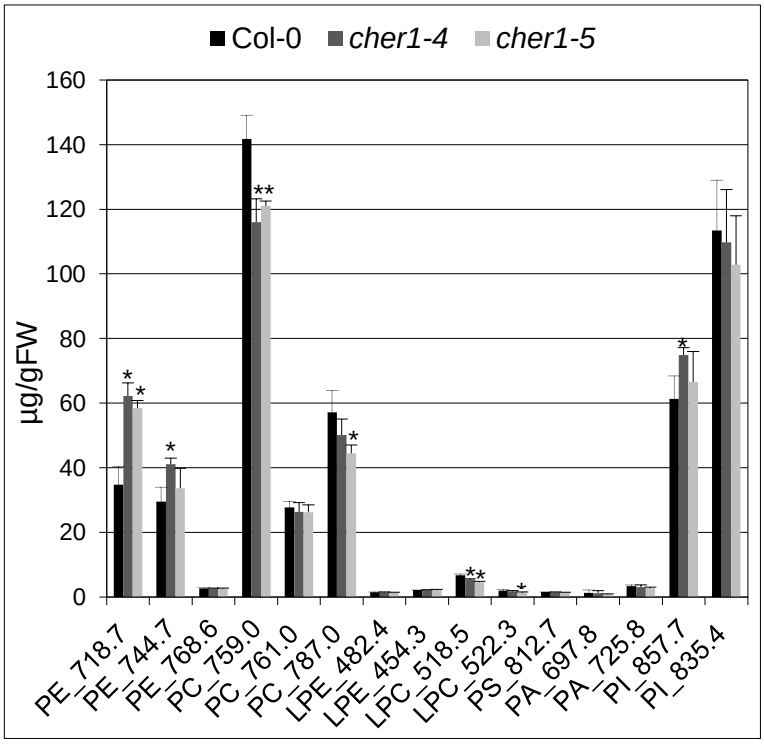

Abbildung 31: Konzentration ausgewählter Phospholipide in CHER1-Mutanten. Abgebildet sind Mittelwerte + Standardabweichung der verschiedenen Phospholipide; gemessen wurden 4 oder 5 Probengruppen (je 5 Individuen; Alter der Pflanzen: 8 Wochen) pro Linie. *: P≤ 0,05 bestimmt mit einem modifizierten T-Test nach Student;
PE: Phosphatidylethanolamin
PC: Phosphatidylcholin
LPE: Lysophosphatidylethanolamin
LPC: Lysophosphatidylcholin
PS: Phosphatidylserin
PA: Phosphatidsäure
PI: Phosphatidylinositol

Weiterhin war die Konzentration an Lysophosphatidylcholin 518,5 in den CHER1-Mutanten signifikant verringert. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass CHER1 als Cholinimporter fungieren könnte, der das durch Hydrolyse von Phosphatidylcholin

durch die Phospholipase C oder D im Apoplasten entstandene Cholin in die Zellen transportiert, um daraus wieder Phosphatidylcholin zu regenerieren.

2.3.7 Keimlingsversuche

2.3.7.1 Propiconazol-Assay

Bei Betrachtung des Phänotyps in der T-DNA Insertionslinie *cher1-4* sowie der Mutante SO15A fiel die Ähnlichkeit zu Brassinosteroidmutanten auf (Clouse, 2011). Deshalb galt es zu untersuchen, ob die starke Verminderung der plasmodesmalen Lokalisation von MP17 in der Mutante SO15A durch die Hemmung der Brassinosteroid-Biosynthese in Col-16 phänokopiert werden kann. Hartwig et al. (2012) konnten zeigen, dass die Triazol-Verbindung Propiconazol in einer Konzentration von 2 µM die Brassinosteroid-Biosynthese inhibiert. Aus diesem Grund wurden Col-16 Samen auf MS-Platten ohne und mit 2 µM Propiconazol ausgebracht und nach zehn Tagen mittels KLSM analysiert. Die mit dem Inhibitor behandelten Keimlinge zeigten eine deutliche Wachstumsverzögerung sowie verkürzte Wurzeln (siehe Abbildung 32). Jedoch konnte weder in Kotyledonen noch in Sourceblättern ein Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Proben in Bezug auf die MP17 Lokalisation festgestellt werden (Abbildung 32).

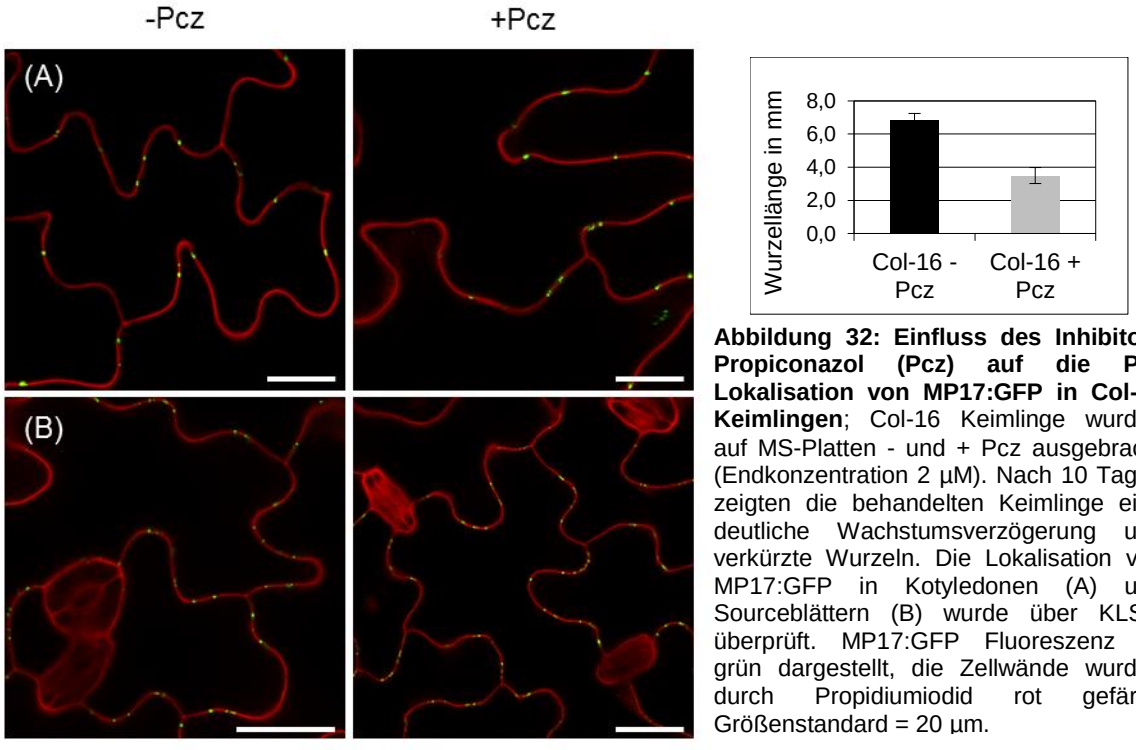

Abbildung 32: Einfluss des Inhibitors Propiconazol (Pcz) auf die PD-Lokalisation von MP17:GFP in Col-16 Keimlingen; Col-16 Keimlinge wurden auf MS-Platten - und + Pcz ausgebracht (Endkonzentration 2 µM). Nach 10 Tagen zeigten die behandelten Keimlinge eine deutliche Wachstumsverzögerung und verkürzte Wurzeln. Die Lokalisation von MP17:GFP in Kotyledonen (A) und Sourceblättern (B) wurde über KLSM überprüft. MP17:GFP Fluoreszenz ist grün dargestellt, die Zellwände wurden durch Propidiumiodid rot gefärbt; Größenstandard = 20 µm.

2.3.7.2 Fenpropimorph-Assay

Sterole gehören zur Familie der Isoprenoide und sind als Membrankomponenten essentiell für Tiere und Pflanzen (He et al., 2003). Da eine Veränderung des Cholingehaltes in der Zelle sich auch auf die Sterolsynthese auswirken könnte, wurde zusätzlich ein Keimlingsversuch mit Fenpropimorph (FEN) durchgeführt. FEN dient als ein spezifischer Inhibitor der Sterolsynthese, genauer der Sterol C-14 Reduktase und beeinflusst das Wachstum von Arabidopsiskeimlingen bei einer Konzentration von 1 µM (He et al., 2003; Schrick et al., 2004). Würde die veränderte Membranzusammensetzung in der Mutante SO15A auch die Sterolsynthese beeinflussen, könnte der Phänotyp möglicherweise durch eine Inhibierung der Sterolsynthese imitiert werden. Zu diesem Zweck wurden Col-16 Samen auf MS-Platten ohne und mit dem Inhibitor FEN (Endkonzentration von 1 µM) ausgebracht. Die mit dem Inhibitor behandelten Keimlinge zeigten eine deutliche Wachstumsverzögerung (Abbildung 33).

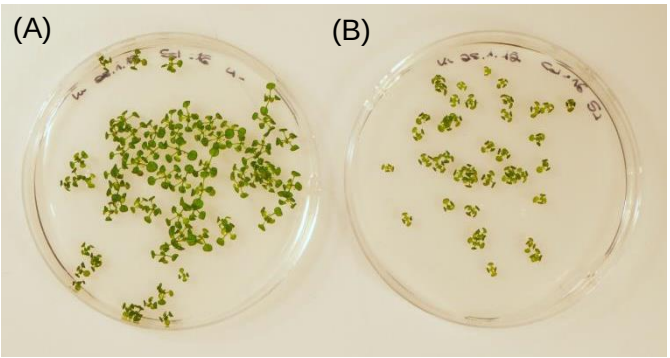

Abbildung 33: Einfluss des Inhibitors Fenpropimorph (FEN) auf das Wachstum von Col-16 Keimlingen. Col-16 Keimlinge wurden auf MS-Platten (A) ohne und (B) mit FEN (Endkonzentration 1 µM) ausgebracht. Nach 19 Tagen zeigten die behandelten Keimlinge im Vergleich zu den Keimlingen auf den Kontrollplatten eine deutliche Wachstumsverzögerung.

Nach 19 Tagen wurden die Keimlinge mittels KLSM analysiert (siehe Abbildung 34). In Kotyledonen und in Sinkblättern konnte jedoch kein Unterschied in der MP17:GFP Fluoreszenz an PD beobachtet werden. Die Sourceblätter waren jedoch durch den Einfluss des Inhibitors so stark verkümmert, dass die Mikroskopie keine klaren Aussagen zuließ. Die Tatsache, dass in Kotyledonen kein Unterschied beobachtet werden konnte, könnte jedoch daraus resultieren, dass die für Keimung benötigten Speicherstoffe alle aus dem Samen bezogen werden und sich die Inhibierung der Sterolsynthese erst später auswirkt. Aus diesem Grund wurden die Keimlinge der Kontrollplatten ohne FEN im Alter von 23 Tagen auf MS-Platten mit Inhibitor umgesetzt und nach weiteren zwei Wochen die Sourceblätter mittels KLSM untersucht. Allerdings konnte auch hier konnte keine veränderte MP17:GFP Fluoreszenz an PD detektiert werden (Abbildung 34).

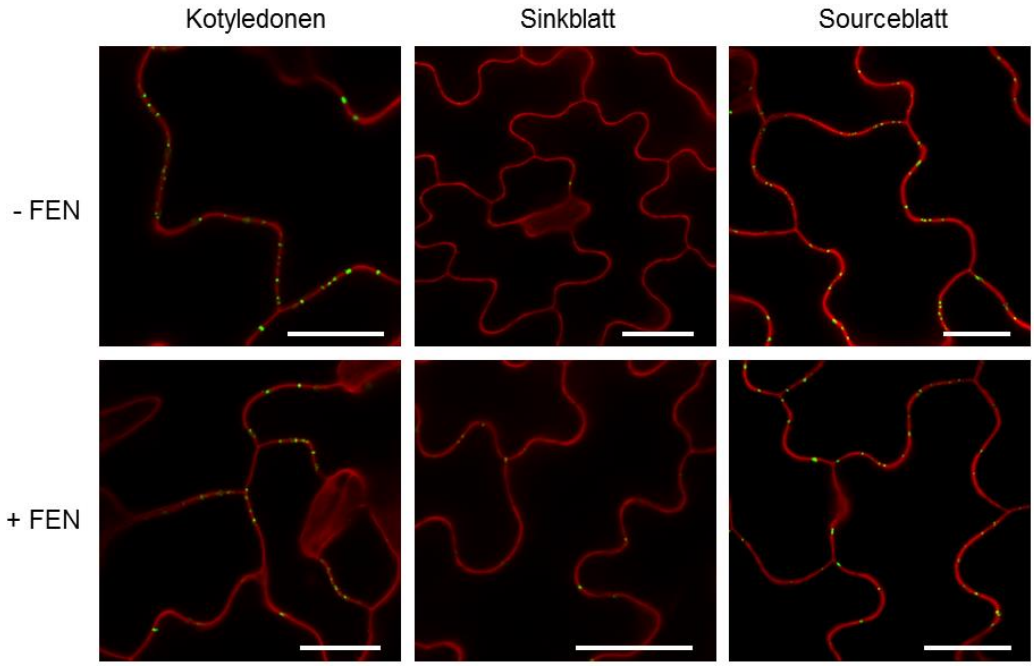

Abbildung 34: Einfluss von Fenpropimorph auf die plasmodesmale Lokalisation von MP17:GFP in Col-16 Keimlingen. Col-16 Keimlinge wurden auf MS-Platten - und + FEN (Endkonzentration von 1 µM) ausgebracht. Nach 19 Tagen wurde die Lokalisation von MP17:GFP in Kotyledonen und Sinkblättern über KLSM überprüft. Keimlinge auf den Kontrollplatten wurden im Alter von 23 Tagen auf Platten + FEN umgesetzt und nach weiteren 14 Tagen die Sourceblätter analysiert. MP17:GFP Fluoreszenz ist grün dargestellt, die Zellwände wurden durch Propidiumiodid rot gefärbt; Größenstandard = 20 µm

2.3.8 Differentiell regulierte endogene Transkripte in CHER1-Mutanten

In Anbetracht des ausgeprägten Phänotyps der CHER1-Mutanten, sollte als nächstes überprüft werden, ob fundamentale Unterschiede in der Genexpression vorliegen. Hierfür wurde eine Mikroarrayanalyse mit den Arabidopsislinien Col-0, *cher1-4* und *cher1-5* durchgeführt. Eine Clusteranalyse unter Verwendung des hierarchischen Clusteralgorithmus und der „*Pearson uncentered correlation*“ in GENESPRING XII (AgilentTechnolgies, http://www.chem.agilent.com) zeigte, dass das Genexpressions-muster der beiden CHER1-Mutanten eindeutig von der Kontrolllinie Col-0 unterschieden werden kann. Die Identifikation differentiell regulierter Gene zwischen *cher1-4*, *cher1-5* und Col-0 (≥ 2.0-fold change und $p \leq 0.05$) erfolgte durch eine Filterung des erhaltenen Datensatzes mittels *T-Tests unpaired* und Benjamini Hochberg Korrektur. Die weiteren Analysen basierten auf der Annahme, dass diejenigen Gene, die für den charakteristischen Phänotyp verantwortlich sind, sowohl in *cher1-4* als auch in *cher1-5* gegenüber Col-0 differentiell exprimiert sein sollten. Durch Erstellen eines Venn-Diagramms aus den 1540 deregulierten Features für *cher1-5* und den 1317 deregulierten Features für *cher1-4*, verblieben insgesamt 960 Mikroarray-Elemente, die in beiden

Mutanten im Vergleich zum Wildtyp differentiell reguliert sind (Abbildung 35, Liste siehe Anhang Tabelle 23).

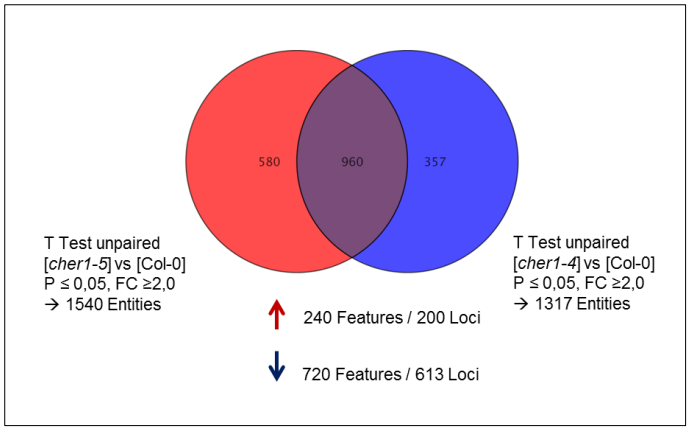

Abbildung 35: Venn-Diagramm zur Identifizierung von Features, die sowohl in *cher1-4* als auch in *cher1-5* im Vergleich zu Col-0 differentiell reguliert sind. Von 1540 deregulierten Features für *cher1-5* und 1317 deregulierten Features für *cher1-4* konnten insgesamt 960 Kandidaten identifiziert werden, die in beiden Mutanten im Vergleich zu Col-0 differentiell reguliert sind.

Davon waren insgesamt 240 Features hochreguliert und 720 Features herunterreguliert und konnten 200, bzw. 613 Genorten (Loci) zugeordnet werden. Um einen ersten Einblick zu bekommen, welche Prozesse angereichert sind, wurde eine funktionelle Kategorisierung durchgeführt (Abbildung 36).

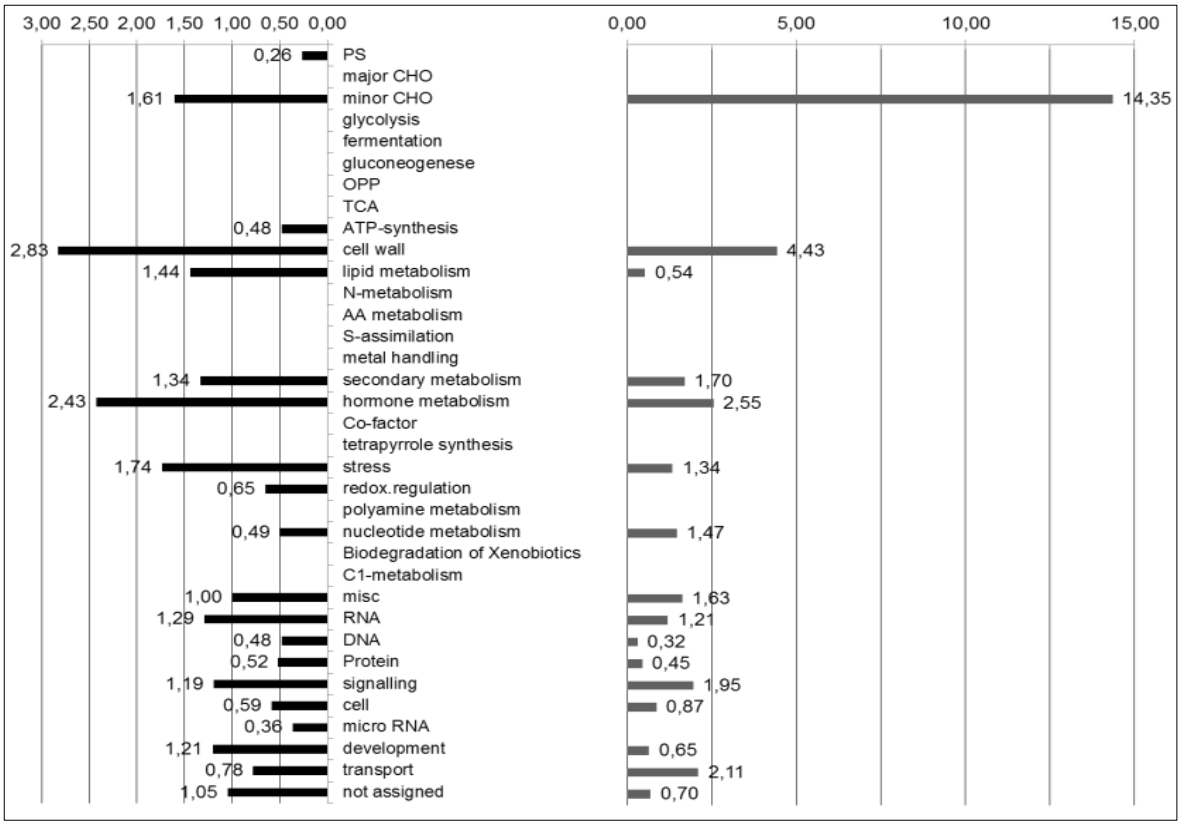

Abbildung 36: Funktionelle Kategorisierung der deregulierten Transkripte. Die funktionelle Kategorisierung wurde unter Verwendung der MAPMAN bins (http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman) durchgeführt. Hierfür wurde der Prozentsatz der signifikant regulierten Features für eine spezifische funktionale Gruppe relativ zum Prozentsatz der Features der jeweiligen Gruppe auf dem gesamten Chip bestimmt.

Diese zeigte jedoch eine ähnliche Verteilung der angereicherten Kategorien für die Überkategorien „hochreguliert“ und “herunterreguliert“. Aufgrund der veränderten Membranzusammensetzung wurde zunächst die Kategorie Lipide sowie differentiell regulierte Gene, die potentiell am Lipidmetabolismus beteiligt sind, näher analysiert (siehe Anhang Tabelle 21). Hier fiel eine Herunterregulierung von *At5g63770*, welches für eine Diacylglycerolkinase kodiert, auf. Diese phosphoryliert Diacylglycerol (DAG) und ist dadurch an der Bildung von Phosphatidsäure (PA), einem wichtigen *lipid messenger*, beteiligt. Ebenso war der Transkriptlevel für *At3g63200* verringert, wobei das durch *At3g63200* kodierte PATATIN-like protein 9 an der Produktion von Lysophospholipiden und freien Fettsäuren beteiligt ist (Ryu, 2004). Interessanterweise konnte auch bei *downstream targets* von PA eine beachtliche Herunterregulierung beobachtet werden, v.a. für Gene Ethylen-abhängige Prozesse, Abwehr-assoziierte Prozesse, sowie in den Bereichen *signalling* und Vesikeltransport. Bei einem Abgleich mit dem Kapitel „Acyl-Lipid-Metabolism“ des Arabidopsis Book (Li-Beisson et al., 2013) fiel eine vermehrte Herunterregulierung von Genen, die potentiell an der Synthese von sehr langkettigen Fettsäuren (*very long chain fatty acids*, VLCFA), kutikularen Wachsen und Suberin beteiligt sind, auf. Ebenso waren Gene der Sterolsynthese und potentiell *lipid raft* assoziierte Proteine betroffen. Im Gegensatz dazu ließen sich die hochregulierten Gene in dieser Kategorie keiner eindeutigen Gruppe zuordnen.

Anschließend wurden die restlichen Kategorien näher analysiert. Hier stach vor allem eine vermehrte Herunterregulierung für Gene, die an der Xylementwicklung wie auch dem Zellwand- und Ligninmetabolismus beteiligt sind, ins Auge. So waren die Expressionshöhen des Transkriptionsfaktors Myb46, dem Masterregulator der Sekundärzellwandsynthese, sowie von 20 aus insgesamt 37 putativen Zielgenen von Myb46 in den CHER1 Mutanten verringert (Kim et al., 2012). Ebenso zeigte sich eine Herunterregulierung von neun von insgesamt 17 in Arabidopis vorkommenden Laccasen. In der Liste der hochregulierten Gene fiel besonders SAG29 auf, dessen Expression in *cher1-5* 169,7-fach und in *cher1-4* 80,6-fach im Vergleich zu Col-0 erhöht war. SAG29, der auch unter dem Namen AtSWEET15 bekannt ist, gehört zur Familie der Sweet Zuckertransporter und zeigt in Blättern eine 22-fache Induktion während der Seneszenz (Chen et al., 2010). Weiterhin auffällig war eine Hochregulierung von Transkripten, die an der ER-Stressreaktion und der *ER unfolded protein response* beteiligt sind, sowie von sechs Monothiol Glutaredoxinen.

3 Diskussion

3.1 Wodurch wird die PD-Lokalisation von MP17 vermittelt?

Virale Movementproteine (MP) sind aufgrund ihrer Lokalisation an Plasmodesmata (PD) sowie der Fähigkeit diese Zell-zu-Zell Kontakte zu modifizieren ein wichtiges Analysewerkzeug für die Identifizierung von PD-Komponenten. Der weltweit erste identifizierte Virus ist der Pflanzenvirus *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Stanley, 1935). So überrascht es nicht, dass dessen Movementprotein, TMV MP30, das Modelprotein für eine Vielzahl an Studien zu viralen Movementproteinen wurde. Im Gegensatz dazu ist nur sehr wenig über das Movementprotein des *Potato leafroll virus*, PLRV MP17, seine funktionellen Domänen sowie dessen PD-Targeting Mechanismus bekannt. Frühe Studien konnten mittels Deletionsanalysen die Nukleinsäurebindeaktivität des C-terminalen Teils (AS 57-156) nachweisen (Tacke et al., 1991). Weiterhin wurde über zielgerichtete Mutagenese eine putative N-terminale amphiphatische Alphahelix (AS 38-54) identifiziert, die für die Dimerisierung des Proteins *in vivo* von Bedeutung ist (Tacke et al., 1991; Tacke et al., 1993).

3.1.1 PD-Targeting der MP17-Deletionsvarianten

Basierend auf den in Absatz 2.1 beschriebenen Deletionsanalysen, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der MP17 C-Terminus (AS110-156) zwar essentiell für das PD-Targeting des Movementproteins ist, alleine jedoch nicht dafür ausreicht. PD-Targetingmotive wurden bereits in anderen Studien auf diese Weise getestet. So vermittelte die Transmembrandomäne von PDLP1, dem bislang einzigen PD-Protein mit Rezeptorfunktion für virale MP, eine vollständige PD-Lokalisation des entsprechenden YFP-Fusionsproteins (Thomas et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnte ein kurzes identifiziertes PD-Targetingmotiv des Kürbis Phloemproteins Hsc70-1 (*heat shock cognate 70-1*) alleine nicht die gewünschte PD-Interaktion des GFP-Fusionsproteins bewirken, wohingegen für eine heterochimäre Fusion des Motivs mit dem humanen Hitzeschockprotein 70 eine Zell-Zell Verbreitung beobachtet werden konnte (Aoki et al., 2002). Dies deutet darauf hin, dass für einige Proteine zusätzlich zu bestimmten identifizierten Motiven oftmals weitere Motive und/oder korrekte Tertiärstrukturen notwendig sein könnten, um eine PD-Lokalisation zu gewährleisten. Für MP17 lokalisiert erst die Deletionsvariante MP17Δ1-27 wieder an PD. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass auch in diesem Fall kürzere Varianten nicht richtig gefaltet sind. Eine weitere

Ursache könnte darin bestehen, dass ein zweites, für das Targeting notwendiges Signal innerhalb der DDII (AS 30-37) vorliegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten demnach daraufhin, dass für die plasmodesmale Lokalisation von MP17 sowohl der zweite unstrukturierte Bereich im N-Terminus des Proteins als auch der C-terminale unstrukturierte Bereich von Bedeutung sind. Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang, dass es durch eine Wechselwirkung zwischen bestimmten Aminosäuren zur Ausbildung spezieller Tertiärstrukturen kommt, welche für die PD-Lokalisation von MP17 von Bedeutung sind.

Überraschenderweise zeigten die Deletionsanalysen auch eine Lokalisation in Chloroplasten für drei der analysierten MP17-Deletionsvarianten und im Einklang damit versteckte Chloroplastentransitpeptide innerhalb des Proteins. Dieses Ergebnis könnte auf einen evolutionären Zusammenhang zwischen endosymbiontischer und interzellulärer Kommunikation sowie den entsprechenden Signalsequenzen für Proteintargeting hindeuten. Um zu überprüfen, ob diese Beobachtung spezifisch für MP17 war, wurden in Kooperation mit Heinrich Sticht (Bioinformatik, Institut für Biochemie) 4002 *E.coli* K12 Proteine auf die Anwesenheit potentieller Chloroplastentransitpeptide untersucht. Dabei wurde für 163 Kandidaten ein potentielles Chloroplastentransitpeptid mit Werten zwischen 0,5 und 0,56 vorhergesagt (Heinrich Sticht, persönliche Kommunikation). Demzufolge sind derartige versteckte potentielle Targetingsignale vermutlich weitverbreitet und nicht spezifisch für virale MP.

3.1.2 Phosphorylierung von MP17 ist essentiell für dessen PD-Lokalisation

Die Bedeutung von Phosphorylierungen für die Lokalisation und Funktion von viralen MP konnte bereits in verschiedenen Studien belegt werden (Lucas und Lee, 2004). Für TMV MP30 konnte eine Phosphorylierung sowohl *in vitro* durch eine Kinase in Zellwandfraktionen aus Tabakblättern als auch *in vivo* in Protoplasten aus Tabak BY2-Suspensionzellkulturen bestätigt werden (Watanabe et al., 1992; Citovsky et al., 1993). Der Effekt dieser posttranslationalen Modifikation auf die Proteinfunktion beschränkt sich allerdings nicht nur auf virale Movementproteine. Lee et al. (2005) identifizierten die PD-assoziierte Kinase PAPK1 aus Arabidopsis, bzw. PAPK aus Tabak, wobei PAPK neben TMV MP30 auch das endogene NCAP LEAFY phosphorylieren konnte. Die Phosphorylierung des Kürbis NCAP Cm-PP16-1 (*Cucurbita maxima phloem protein 16*) ist sogar eine Voraussetzung für dessen Vermögen, das SEL der PD zu modifizieren (Taoka et al., 2007). Weiterhin ist die Phosphorylierung des Kapsidproteins des *Potato virus A* sowie des *Bamboo mosaic virus* durch die Proteinkinase CK2 essentiell für die

Virusverbreitung (Ivanov et al., 2003; Hung et al., 2014). Gleichermaßen ist die Phosphorylierung von TGBp1 des Potexvirus *Potato virus X* durch eine CK2-Kinase an der Regulation der PVX-Verbreitung beteiligt (Módena et al., 2008; Verchot-Lubicz et al., 2010). Die Kinase NsAK scheint wiederum ein Regulator des *nuclear shuttle proteins* des *Cabbage leaf curl virus* und somit auch der Virusverbreitung zu sein (Florentino et al., 2006). Die so eben erwähnten Studien deuten auf einen generellen Mechanismus hin, der die Phosphorylierung von Proteinen, die zu/über PD transportiert werden, beinhaltet.

Auch für MP17 konnte eine Phosphorylierung *in planta* nachgewiesen werden (Tacke et al., 1993). Mittels Expression verkürzter MP17-Versionen in *E. coli* und anschließender Inkubation mit Membranpräparationen der Kartoffel oder Proteinkinasen grenzten Sokolova et al. (1997) die Region der Phosphorylierung zwischen AS 55-95 ein. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit gelang es, die *in planta* Phosphorylierung von MP17 zu bestätigen, nachdem ein λ-Phosphatase-Verdau von aus Arabidopsis aufgereinigtem MP17:HIS zu einem Mobilitätsshift in der SDS-PAGE führte. Weiterhin konnten für MP17 über Massenspektroskopie insgesamt vier phosphorylierte Serinreste (S) - S71, S79, S137 und S140 - identifiziert werden (Vogel, 2009; Link et al., 2011). Die Bedeutung der Phosphorylierung für die plasmodesmale Lokalisation von MP17 sollte daraufhin in dieser Arbeit mittels Mutantenanalysen untersucht werden. Ähnliche Studien wurden bereits für TMV MP30, das MP des *Abutilon mosaic virus*, TGBp3 - eines der Movementproteine des *Potato mop-top virus* - und das MP des *Tomato mosaic virus* durchgeführt (Kawakami et al., 1999; Waigmann et al., 2000; Karger et al., 2003; Trutnyeva et al., 2005; Kleinow et al., 2009; Samuilova et al., 2013). S71 und S79 von MP17 lokalisieren in der vorhergesagten globulären Domäne, S137 und S140 dagegen im unstrukturierten C-Terminus. Über eine PCR-Mutagenese erfolgte der Austausch der beiden Serinpaare inklusive der benachbarten Serine und Threonine, die ersatzweise phosphoryliert werden könnten, gegen Alanin. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von S71 und S79 essentiell für die PD-Lokalisation von MP17 ist, wohingegen die Phosphorylierung von S137 und S140 keinen Einfluss auf das PD-Targeting ausübte. Die Alaninsubstitution von S71/S79 führte stattdessen zu beweglichen MP17:GFP Aggregaten variierender Größe im Cytoplasma sowie entlang der Zellperipherie. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Transport zu PD nicht vollständig beeinträchtigt ist, sondern vielmehr die stabile Assoziation der MP17-Phosphorylierungsmutante an PD. Ähnliche Strukturen wurden von Grefen et al. (2010) beschrieben, als sie die Lokalisierung von SYP121:GFP Fusionsproteinen unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors untersuchten. Die Expression des Fusionsproteins unter Kontrolle des UBQ10 Promotors führte jedoch zu einem Verlust der beobachteten Aggregate. Die Autoren schlussfolgerten, dass die

mobilen Aggregate sogenannte *inclusion bodies* darstellten, welche aus der starken Überexpression durch den 35S-Promotor resultierten. In diesem Zusammenhang ist es vermutlich eher unwahrscheinlich, dass die für MP17A69-81 beobachteten Aggregate Bestandteil der normalen PD-Transportroute in Richtung Zellperipherie sein könnten.

Analysen des TMV MP30 ergaben, dass eine initiale Phosphorylierung des Movementproteins dessen PD-Targeting erhöht, während eine weitere Phosphorylierung, die möglicherweise während der PD-Passage erfolgt, der Ablösung des Proteins von den PD dient (Trutnyeva et al., 2005). Diese Hypothese wurde von Karpova et al. unterstützt, die zeigen konnten, dass TMV MP30 Ribonukleoproteinkomplexe *in vivo* translatierbar waren, jedoch nicht *in vitro,* außer es erfolgte deren Phosphorylierung (Karpova et al., 1997; Karpova et al., 1999). In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass sequentielle Phosphorylierungen von Movementproteinen deren Targeting und Funktion beeinflussen. Eine initiale Phosphorylierung wäre demnach für den Transport zu PD oder die Lokalisation an PD und somit auch für den Zell-zu-Zell Transport viraler Ribonukleoproteinkomplexe notwendig. Eine weitere Phosphorylierung während der PD-Passage hätte dann die Dissoziation des MP von der viralen RNA zur Folge, was wiederum deren erneute Translation in der nächsten Zelle ermöglichen würde (Karpova et al., 1999; Waigmann und Citovsky, 2001; Trutnyeva et al., 2005). Weiterhin wäre es möglich, dass die zweite Phosphorylierung die Ablösung des MP von PD, bzw. die Inaktivierung des MP zur Folge hätte, was einen wichtigen Prozess für den Wirt darstellen würde, um die Kontrolle über den plasmodesmalen Transport zurückzugewinnen (Citovsky et al., 1993; Waigmann et al., 2000). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen, befinden sich alle vier phosphorylierten Serine des MP17 in der von Tacke et al. (1991) identifizierten Nukleinsäurebindedomäne. Außerdem könnte dies erklären, warum Sokolova et al. (1997) nur die Phosphorylierung zwischen AS 55-95 identifizieren konnten, jedoch nicht die Phosphorylierung von S137 und S140 im C-Terminus. Letztere würden erst während der PD-Passage erfolgen und könnte dementsprechend durch *in vitro*-Experimente nicht nachgewiesen werden. Diese Hypothese wird durch bioinformatische Analysen unterstützt, die S140 als Target für Casein-Kinase I ähnliche Kinasen (*Casein-kinase I - type kinase*) identifizierte, welche die Konsensussequenz $S/T/Y^{P}X_{1-2}S/T$ aufweisen. Diese Kinasen phosphorylieren dementsprechend spezifisch Serine oder Threonine, denen N-terminal im Abstand von ein bis zwei Aminosäuren ein weiterer phosphorylierter Aminosäurerest - also Serin, Threonin oder Tyrosin - vorausgeht, was für MP17 durch S137 gegeben ist (Gross und Anderson, 1998). Interessanterweise gehört die in Arabidopsis identifizierte PD-assoziierte Kinase

PAPK1 ebenfalls zur Casein Kinase 1-Familie und kann neben TMV MP30 auch das endogene NCAP LEAFY phosphorylieren (Lee et al., 2005).
Die ermittelte Bedeutung der Phosphorylierungen für die Lokalisation und Funktion von MP17 spiegelt sich auch in der Konservierung der vier phosphorylierten Serinreste wider. So zeigen S71 und 79, deren Phosphorylierung für die PD-Lokalisation essentiell ist, in verschiedenen luteoviralen Movementproteinen eine starke Konservierung. Im Gegensatz dazu ist S140 nur schwach konserviert und S137 spezifisch für MP17. Unter der Annahme, dass S137 und/oder S140 erst während der PD-Passage phosphoryliert werden, um die Dissoziation des MP zu gewährleisten, könnten diese beiden Serine möglicherweise von Bedeutung für die Wirtsspezifität sein. In Übereinstimmung hierzu führte die Imitierung der Phosphorylierung der drei durch Citovski et al. (1993) beschriebenen *in vitro* phosphorylierten Aminosäurereste - Ser-258, Thr-261, und Ser-265- im C-Terminus von TMV MP30 mittels einer Asparaginsäuresubstitution in *Nicotiana tabacum* zu einem Verlust der Fähigkeit, das plasmodesmale SEL zu beeinflussen, jedoch nicht in *Nicotiana benthamiana* (Waigmann et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die PD-Lokalisation von MP17 vermutlich nicht durch eine kurze Signalsequenz oder eine bestimmte Domäne vermittelt wird, sondern vielmehr durch das Zusammenspiel von drei Teilen des Proteins: einer N-terminalen Domäne, dem vorhergesagten unstrukturierten Bereich im C-Terminus sowie der Phosphorylierung von S71/S79 in der globulären Domäne. Dies legt die Vermutung nahe, dass hierbei eine komplexe Faltung und/oder Domänenstruktur von Bedeutung sein könnte.

3.1.3 MP17 – ein peripheres Membranprotein?

Das luteovirale Movementprotein MP17 ist, wie in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, sehr stark an/in der Zellwand verankert (Vogel, 2009; Hofmann, unveröffentlicht). Dementsprechend kann es nicht durch milde Detergenzien wie z.B. Nonidet-P40 (NP40) solubilisiert werden, sondern nur durch Verwendung von SDS oder 8 M Harnstoff. In diesem Zusammenhang ist es verwunderlich, dass MP17 weder Transmembrandomänen noch eine N-terminale Signalsequenz für den sekretorischen Pathway aufweist - beides Merkmale für integrale Membranproteine, welche die Plasmamembran durchspannen (Marmagne et al., 2007). In Kombination mit den Ergebnissen der Deletionsstudien könnte dies darauf hindeuten, dass MP17 ein peripheres Membranprotein repräsentiert. Im Unterschied zu integralen Membranproteinen weisen periphere Membranproteine nicht die typischen hydrophoben Bereiche auf. Stattdessen wird die PM-Assoziation durch eine

spezifische Domäne vermittelt, wobei die Interaktion auf amphipathischen Helices, hydrophoben Loops, kovalenten Verbindungen an Lipidanker, elektrostatischen Interaktionen mit Lipiden oder Protein-Protein Interaktionen beruhen kann (Marmagne et al., 2007). Ein bedeutsames Beispiel für ein peripheres Membranprotein ist das pflanzenspezifische Raft-assoziierte Remorin. Remorin wurde in einer Vielzahl an Studien in *detergent-insoluble membranes* (DIM) der pflanzlichen PM identifiziert (Mongrand et al., 2004; Shahollari et al., 2005; Morel et al., 2006; Laloi et al., 2007; Lefebvre et al., 2007). Raffaele et al. (2009) konnten zeigen, dass Remorin an die cytosolische Seite der Plasmamembran assoziiert und eine Akkumulation in DIM-Abschnitten zeigt. Durch eine Verminderung der Sterolkonzentration konnte die Clusterbildung innerhalb der PM eliminiert werden. Mittels Kolokalisierung mit PDLP1 und Immunogoldlokalisierung konnte zudem die Anwesenheit von Remorin in PD detektiert werden (Raffaele et al., 2009). Als peripheres Membranprotein weist Remorin weder ein Membrantargetingsignal noch putative Transmembrandomänen auf. Die PM-Assoziation des Proteins wird durch einen C-terminalen Anker vermittelt, welcher in einer nicht polaren Umgebung von einer ungeordneten in eine α-helikale Struktur wechselt (Perraki et al., 2012). Bereits in einer frühen Studie wurde auf die Besonderheit der starken PM-Assoziation von Remorin, welches basierend auf der cDNA-Sequenz als hydrophiles Protein klassifiziert wurde, und auf Parallelen zu TMV MP30 verwiesen (Reymond et al., 1996). Bisher wurde TMV MP30 aufgrund der starken Membranassoziation als integrales Membranprotein mit zwei Transmembrandomänen dargestellt (Brill et al., 2000; Fujiki et al., 2006). Eine aktuelle Studie macht jedoch auf die Diskrepanz der vorhergesagten Topologie zu bekannten Interaktionen des Proteins aufmerksam und postuliert für MP30 nun ebenfalls eine periphere Assoziation mit der ER-Membran (Peiro et al., 2014). Das MP des *Prunus necrotic ringspot virus* stellt ein weiteres Beispiel für ein peripheres Membranprotein aus der 30K Superfamilie dar (Melcher, 2000; Martínez-Gil et al., 2009). Weiterhin wurde für die PD-assoziierten Arabidopsis ^{C1}RGPs (*class 1 reversibly glycosylated polypeptides*) eine periphere Assoziation mit der äußeren Golgimembran postuliert (Epel et al., 1996; Sagi et al., 2005; Zavaliev et al., 2010). Nach Fusion der Golgivesikel mit der PM an, bzw. nahe der PD, wären ^{C1}RGPs dann an die cytoplasmatische Seite der PM, möglicherweise sogar innerhalb der PD, angeheftet (Sagi et al., 2005). Interessanterweise resultiert die Überexpression von ^{C1}RGP2 in einer Reduktion der PD-Permeabilität (Zavaliev et al., 2010). Alles in allem verdeutlichen die soeben genannten Beispiele die potentielle Bedeutung peripherer Membranproteine im Plasmodesmata-Kontext.

3.2 Genetische Identifizierung von Elementen des inter- und intrazellulären Makromolekültransportes

Plasmodesmata sind mit Plasmamembran ausgekleideten Poren in der Zellwand, welche einen streng regulierten Transport durch die Pflanze ermöglichen. Demzufolge besitzen sie eine Schlüsselrolle in der Koordination von Pflanzenwachstum und -entwicklung sowie von Abwehrprozessen (Zambryski und Crawford, 2000; Roberts und Oparka, 2003; Kim und Zambryski, 2005). In Anlehnung an den Aufbau des zentralen Elements der Kernpore, dem *nuclear pore complex*, würde man die Anzahl der Proteine, die für die Struktur und Funktion von PD notwendig sind, bzw. PD-assoziiert sind, auf etwa 30-50 Proteine einschätzen (Lim et al., 2008). Doch bis zum heutigen Zeitpunkt, mehr als 100 Jahre nach der Entdeckung der PD, konnten nur wenige wirkliche PD-Proteine identifiziert werden. Die essentielle Bedeutung dieser Zell-Zell Kontakte stellt für die Identifizierung plasmodesmaler Proteine wohl die größte Hürde dar, da davon auszugehen ist, dass das Ausschalten wichtiger PD-Komponenten zur Letalität führt (Roberts und Oparka, 2003) oder dass die Proteine durch teilweise redundante Genfamilien kodiert werden könnten.

3.2.1 Identifizierung von Komponenten des plasmodesmalen Transports

Wie in Kapitel 1.1.5 erwähnt, wurden in bisherigen Studien bereits zwei vorwärts gerichtete genetische Ansätze für die Identifizierung von PD-Komponenten verfolgt, die beide auf einer veränderten Verteilung von fluoreszierenden Indikatoren, genauer GFP und F-Dextran, basierten. Diese führten zur Identifizierung von ISE1 und ISE2, zweier putativer RNA-Helikasen, sowie dem plastidären Thioredoxin GAT1, welche allerdings nur indirekt einen Einfluss auf die PD-Funktion ausüben, v.a. durch die Veränderung der ROS-Konzentration (Kim et al., 2002; Kobayashi et al., 2007; Benitez-Alfonso et al., 2009; Stonebloom et al., 2009; Burch-Smith und Zambryski, 2010). Die Problematik bei der Identifizierung von PD-Proteinen wurde allerdings auch in diesem Fall bestätigt, da selbst das Ausschalten dieser beiden PD-Regulatoren drastische Effekte auf die Pflanzenentwicklung hatte. So war die *ise1*-Mutation embryoletal und *gat1*-Mutanten erreichten nur das Keimlingsstadium.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuer Screeningansatz verfolgt, welcher die Einschränkung, die sogenannte *loss of function* Mutanten aufgrund ihrer Letalität mit sich bringen, zu umgehen versucht. Zu diesem Zweck wurden 3840 Individuen der M2-Generation von bereits in Vorarbeiten beschriebenen EMS-mutagenisierten Col-16-Samen (Hofius, 2003) nach Mutanten mit einer veränderten PD-Bindung, sogenannten *change of function* Mutanten, durchmustert. Dadurch sollten

Mutanten mit einem veränderten plasmodesmalen Transport sowie putative MP17-Rezeptoren oder PD-assoziierte Bindungspartner für MP17 identifiziert werden. Das Screening beinhaltete zwei Durchmusterungsdurchgänge, zum einen nach einer stark reduzierten Lokalisation von MP17:GFP an PD in Sourceblättern und zum anderen nach einer verstärkten Bindung von MP17:GFP an PD in seneszenten Blättern. Der Hauptkandidat für weitere Analysen, die Mutante SO15A, ergab sich aus der ersten Screeningrunde.

3.2.2 Primärcharakterisierung und Marker-gestützte Kartierung der Sourcemutante SO15A

Die Mutante SO15A zeichnete sich durch eine drastische Reduktion der MP17:GFP Fluoreszenz an PD in Sourceblättern und Kotyledonen aus, die jedoch nicht auf eine verminderte Transkript- sowie Proteinmenge zurückzuführen war. Makroskopisch zeigte die Mutante ein stark verzögertes, buschiges Wachstum, welches sich in einem verminderten Rosettenfrischgewicht, einer reduzierten Blattzahl und einem eingeschränkten Wurzelwachstum widerspiegelte. Interessanterweise war der in der Ausgangslinie Col-16 durch MP17 induzierte Kohlenhydratexportblock in der Mutante SO15A trotz der reduzierten MP17:GFP Lokalisation an PD nicht vermindert. Diese drei Merkmale wären auch für eine PD-Mutante zu erwarten. Der Zeitpunkt der Blühinduktion war für SO15A wie auch bei Col-16 im Vergleich zum Wildtyp Col-0 etwa sieben Tage verzögert. Es wurde vermutet, dass die hellgrüne Färbung der Blätter, die in einigen Anzuchten zu beobachten war und sich sogar bis zu einem albinotischen Phänotyp ausweiten konnte, auf eine fehlerhafte Photosynthese zurückzuführen sei. Bei der Überprüfung der Intaktheit des Photosystems II mittels PAM-Messung konnte allerdings keine Beeinträchtigung der Elektronentransport-Kapazität für SO15A im Vergleich zu Col-0 und Col-16 festgestellt werden.

Durch eine Marker-gestützte Kartierung (Jander et al., 2002) unter Verwendung von SSLP- und CAPS-Markern konnte der genomische Bereich, der die für den Phänotyp verantwortliche Mutation beinhalten sollte, zwischen der Position 4862259 bp und 5264625 bp auf Chromosom 3 eingeschränkt werden. Dieser Abschnitt entspricht 402 kb und enthält 171 annotierte Loci. Da keine weiteren Marker für diesen Bereich zur Verfügung standen, wurde mittels *next generation sequencing* das Genom der Mutante SO15A sequenziert. Dadurch konnte letztendlich *At3g15380* als Mutantenlokus identifiziert werden. *At3g15380* kodiert für ein Protein der Plasmamembran Cholintransporterfamilie namens CHER1 oder ATCTL1. *In silico* Analysen zeigten, dass

diese Familie aus insgesamt sieben Mitgliedern besteht, wobei für sechs der Cholintransporter-ähnlichen Proteine eine Lokalisation an der Plasmamembran vorhergesagt wird (TAIR; http://www.arabidopsis.org). Für CHER1 wurde zusätzlich zur PM-Lokalisation eine Lokalisation an PD postuliert (Benschop et al., 2007; Fernandez-Calvino et al., 2011).

3.2.3 Eine Herunterregulierung des *CHER1* Transkriptlevels phänokopiert die Mutante SO15A

Zur Bestätigung der *CHER1* Genidentität wurde die T-DNA Insertionslinie SALK_065853C (*cher1-4*) untersucht, bei der die T-DNA Insertion im ersten Intron positioniert ist. Dies führte nicht zu einem kompletten Ausschalten des Gens, sondern stattdessen zu einer starken Herunterregulierung der Transkriptmenge. Ülker et al. (2008) beschrieben bereits, dass durch Insertionen in Introns allelische Serien von *reduced-function* Mutanten, d.h. Mutanten mit reduzierter Funktion, generiert werden können, da die Insertionen je nach Position mit unterschiedlicher Effizienz herausgeschnitten werden können. Homozygote *cher1-4* Mutanten zeigten den gleichen Wachstumsphänotyp wie die Mutante SO15A, waren jedoch geringfügig größer, da diese auf Col-0 Hintergrund basierten. Ebenso war die PD-Lokalisation von MP17:GFP in der Kreuzungslinie Col-16x*cher1-4* sehr stark reduziert. Einen unabhängigen Beweis lieferten zudem durch *artificial micro* RNA generierte *CHER1 knockdown* Pflanzen im Hintergrund von Col-16, die bezüglich Wachstum und PD-Lokalisation das gleiche Ergebnis aufwiesen. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass der Lokus *At3g15380* für das plasmodesmale Targeting von MP17 essentiell ist. Weiterhin konnte eine Auswirkung auf den Zuckertransport bestätigt werden, da auch die T-DNA Insertionslinie *cher1-4* lösliche Zucker und Stärke akkumuliert.

Die Cholintransporterfamilie besteht aus insgesamt sieben Mitgliedern, von denen die meisten auch in der Plasmamembran lokalisiert sein sollen (The Arabidopsis Information Resource (TAIR), www.arabidopsis.org, Aug 07, 2014). Ein phylogenetischer Baum aller Mitglieder ist in Abbildung 37A dargestellt. Bedenkt man diese Tatsache, überrascht es, dass bereits ein *knockdown* von *At3g15380* in *cher1-4* oder den generierten amiRNA-Linien den beobachteten drastischen Phänotyp zur Folge hat. Vergleicht man die Expressionsmuster aller sieben Mitglieder bei Genevestigator, so fällt eine vorherrschende Rolle von CHER1 auf (https://www.genevestigator.com/gv, Abbildung 37B). Somit lässt sich vermuten, dass in vielen Geweben CHER1 einer der Haupttransporter für Cholin zu sein scheint. In diesem Zusammenhang wurde bisher für

keines der Proteine der Plasmamembran Cholintransporterfamilie Cholintransport-Aktivität gezeigt.

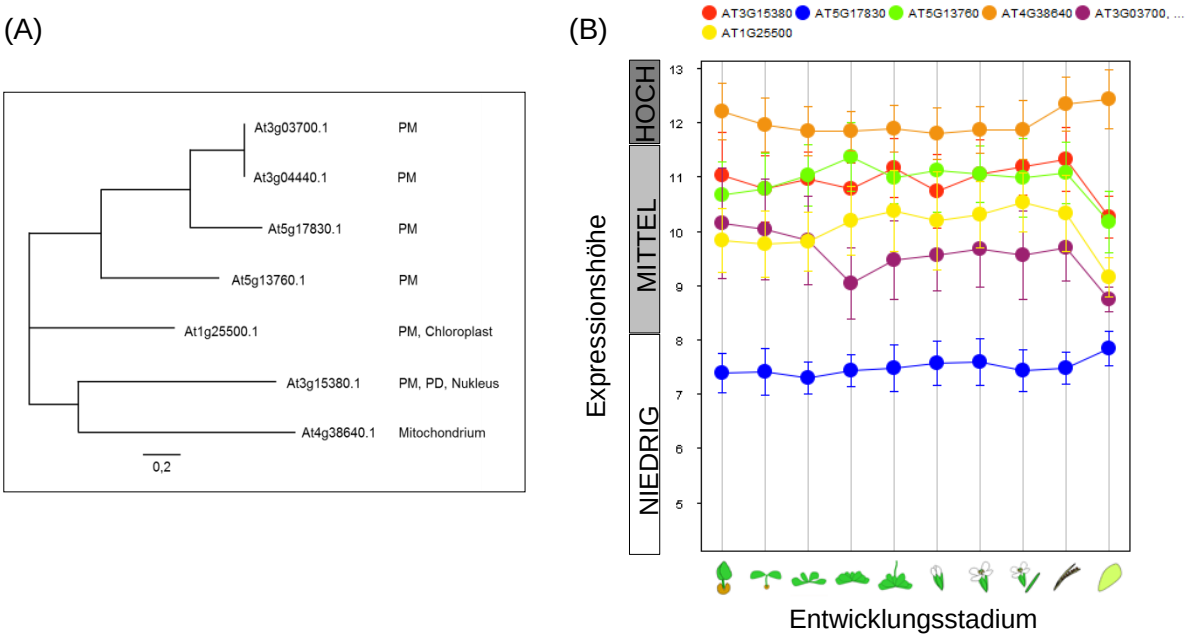

Abbildung 37: Die Plasmamembran Cholintransporterfamilie aus *Arabidopsis thaliana*.
(A) Phylogenetischer Baum der Cholintransporterfamilie aus *Arabidopsis thaliana*. Alignment der Aminosäuresequenzen und Erstellen des phlyogenetischen Baums erfolgte unter Verwendung von Geneious 5.6.3. Die bei TAIR (http://www.arabidopsis.org/) annotierte Lokalisation ist neben der jeweiligen ATG-Nummer aufgeführt; PM: Plasmamembran, PD: Plasmodesmata. (B) Expressionshöhe der Mitglieder der Cholintransporterfamilie in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium (erstellt durch Genevestigator). Die Expressionshöhe entspricht dem Grad der Signalintensität auf dem Affymetrix Arabidopsis ATH1 Genomarray. AT3G03700 und AT3G04440 wurden dabei zusammenfasst.

Im Gegensatz dazu zeigte das Ausschalten von PDLP1 (*Plasmodesmata-located protein* 1) keine Auswirkungen auf den Phänotyp und erst Doppelmutanten brachten den erwarteten Effekt (Thomas et al., 2008). Gleiches galt auch für das Kallose-assoziierte PDCB (*PD callose-binding protein 1)* (Simpson et al., 2009). Dies deutet auf eine Redundanz von PD-assoziierten Proteinen aus größeren Familien hin, was aufgrund der essentiellen Bedeutung von PD-Komponenten auch durchaus sinnvoll wäre.

3.2.4 Die Mutation in CHER1 verhindert die Plasmamembranlokalisation des Proteins und führt zu einer veränderten Plasmamembranzusammensetzung

Die CHER1-Lokalisationsstudien mit N-terminalen GFP-Fusionen brachten zum Vorschein, dass GFP:CHER1 an der Plasmamembran sowie an Endosomen-ähnlichen Strukturen lokalisiert, wohingegen GFP:CHER1_G247E im ER akkumuliert. Eine Vorhersage der Transmembrandomänen durch verschiedene Internettools ergab, dass CHER1 zwischen acht und zwölf Transmembrandomänen aufweist. Basierend auf dem

Modell, das auch für die humanen CTL Proteine verwendet wird (Michel und Bakovic, 2012), lokalisiert die G zu A Mutation an Position 5194529 bp in der Mutante SO15A in der zweiten von insgesamt zehn Transmembrandomänen und verursacht den Aminosäureaustausch Glycin zu Glutamat (siehe Abbildung 26). Das Einbringen einer negativen Ladung an dieser Stelle führt also vermutlich zu einer Beeinträchtigung der korrekten Faltung des Proteins, des Exports aus dem ER oder der finalen Integration des Transporters in die Plasmamembran. Gleichermaßen führte die Punktmutation L101P in ABCA3, einem Phospholipidtransporter, zu einer vollständigen Zurückhaltung des Proteins im ER (Weichert et al., 2011).

CHER1 ist bei TAIR als Cholintransporter annotiert. Dies eröffnete die Frage, ob CHER1 tatsächlich als Cholintransporter fungiert und falls ja, als Importer oder Exporter für Cholin. Eine Messung des Cholingehalts ergab eine zweifache Erhöhung in Sourceblättern und seneszenten Blättern in der Mutante *cher1-4* im Vergleich zum Wildtyp. Aber es galt weiterhin zu klären, ob Cholin innerhalb der Zelle oder im Apoplasten akkumuliert, und dementsprechend, ob es sich bei CHER1 um einen Importer oder einen Exporter handelte. Durch eine Messung ausgewählter Phospholipide konnte schließlich eine signifikante Reduktion des Levels an Phosphatidylcholin (PtdCho) 759,0 um etwa 14 % in den CHER1-Mutanten im Vergleich zu Col-0 detektiert werden. Dieses Ergebnis unterstützte die Hypothese, dass CHER1 als Cholinimporter fungieren könnte, der das durch Hydrolyse von Phosphatidylcholin durch die Phospholipase C oder D im Apoplasten entstandene Cholin in die Zellen transportiert, um daraus wieder Phosphatidylcholin zu regenerieren. Der Nachweis der Transportaktivität von CHER1 wurde zeitgleich von einer anderen Gruppe adressiert, die eine Importaktivität für CHER1 nachweisen konnten (Dettmer et al., 2014). Weiterhin wurden radioaktive Aufnahmeexperimente für die Homologen CTL1 und CTL2 im humanen System beschrieben (Traiffort et al., 2005; Machova et al., 2009; Nakamura et al., 2010).

Bei der makroskopischen Analyse der CHER1-Mutanten fiel eine Ähnlichkeit zu Brassinosteroidmutanten auf. Diese zeichnen sich durch einen verzögerten, buschigen Wuchs, rundliche Blätter, eine verlängerte Lebensspanne, reduzierte Fertilität und veränderte vaskuläre Entwicklung aus (Clouse, 2011). Cornell und Horwitz (1980) postulierten, dass durch eine Verringerung des Cholingehaltes in der Zelle die Synthese von Phosphatidylcholin inhibiert wird, was sich wiederum auch auf die Sterolsynthese auswirkt (Cornell und Horwitz, 1980). Sterole wiederum fungieren als Vorläufer für die Synthese von Brassinosteroiden (Altmann, 1998; Clouse und Feldmann, 1999). Aus diesem Grund wurden Keimlingsversuche mit Fenpropimorph, einem Inhibitor der

Sterolsynthese (Schrick et al., 2004), sowie Propiconazol, einem Inhibitor der Brassinosteroid-Biosynthese (Hartwig et al., 2012), durchgeführt. Trotz eines veränderten Wachstums der Keimlinge auf den MS-Platten mit dem jeweiligen Inhibitor konnte bezüglich der MP17:GFP Lokalisation an PD kein Unterschied zu den Keimlingen auf MS-Platten ohne Inhibitor beobachtet werden. Demnach scheint eine Inhibierung der Sterol-, sowie der Brassinosteroidsynthese die PD-Lokalisation von MP17:GFP nicht zu beeinflussen. Kritisch zu betrachten bleibt allerdings das Fehlen einer Positivkontrolle für die durchgeführten Inhibitor-Keimlingsversuche. Zwar konnten makroskopische Veränderungen der Keimlinge nach Inhibitorbehandlung detektiert werden, jedoch müsste die Inhibierung der Brassinosteroid-, bzw. Sterolsynthese durch entsprechende Messungen bestätigt werden, um definitive Aussagen treffen zu können.

3.2.5 Cholin in Pflanzen

3.2.5.1 Wofür benötigen Pflanzen Cholin?

Cholin ist eine quartäre Ammoniumverbindung. Als essentieller Nährstoff in tierischen Zellen kann es nur eingeschränkt selbst synthetisiert werden und muss deshalb über die Nahrung oder den Abbau von Cholin beinhaltenden Lipiden synthetisiert werden (Zeisel, 1981; Zeisel et al., 1991; Zeisel, 1993; Zeisel und Blusztajn, 1994; Blusztajn, 1998). In seiner zentralen Bedeutung dient Cholin als Grundbaustein für die Synthese von Phosphatidylcholin (PtdCho), einem der Hauptphospolipide eukaryontischer Membranen (Inazu, 2014). Diese kann auf zwei verschiedenen Syntheserouten erfolgen: Der sogenannte Methylierungspathway ist vor allem für Bakterien und Hefe, sowie in der Leber von Bedeutung (Schneider und Vance, 1979; Kodaki und Yamashita, 1987; Geiger et al., 2013). Hierbei wird Phosphatidylethanolamin (PtdEth) durch drei aufeinanderfolgende Methylierungsschritte, welche durch das Enzym Phosphatidylethanolamin N-Methyltransferase (PE(A)MT) katalysiert werden, in PtdCho umgewandelt (http://lipidlibrary.aocs.org/index.html, Vance und Ridgway, 1988; Weretilnyk et al., 1995; Vance et al., 2007). In Tieren hingegen wird PtdCho hauptsächlich über den sogenannten Kennedy-Pathway synthetisiert (http://lipidlibrary.aocs.org/index.html). Dieser setzt den Import von Cholin in die Zelle voraus. Eine cytoplasmatische Kinase phosphoryliert das importierte Cholin umgehend zu Phospocholin, welches dann durch die CTP:Phosphocholin Cytidylyltransferase zu Cytidindiphosphocholin (CDP-Cholin) aktiviert wird (Vance, 1990; Ishidate und Nakazawa, 1992). Der letzte Schritt wird durch eine ER-Membran lokalisierte CDP-Cholin:1,2-Diacylglycerol Cholin-

Phosphotransferase katalysiert (Cornell, 1989). Dabei kondensieren die Phosphocholinreste von Cytidindiphosphocholin mit sn-1,2-Diacylglycerol, wodurch PtdCho entsteht (Inazu, 2014).

Radioaktive Markierungsstudien deuten darauf hin, dass in Pflanzen beide Synthesewege für PtdCho genutzt werden können (BeGora et al., 2010), wobei der Hauptteil an PtdCho vermutlich über den Kennedy-Pathway generiert wird (Kinney et al., 1987; Nishida et al., 1996; Jones et al., 1998; Bolognese und McGraw, 2000). Trotz der vermeintlich untergeordneten Rolle des Methylierungspathways führt das Ausschalten des *PEAMT* Gens zur Ausbildung eines deutlichen Phänotyps. So zeigte die *PEAMT* Silencingmutante *t365* eine 64 %-ige Reduktion des Cholinlevels sowie hellgrüne Blätter, eine verfrühte Seneszenz, eine temperaturabhängige männliche Sterilität und Salz-Hypersensitivität (Mou, 2002). Ebenso war in der *PEAMT knockout* Mutante *xipotl* der PtdCho-Gehalt in den Wurzeln um 23 % und in den Blättern um 18 % verringert, was mit einer beeinträchtigten Wurzelentwicklung und der Zelltod-Induktion in Wurzelepidermiszellen einherging (Cruz-Ramirez et al., 2004). Dies lässt darauf schließen, dass in Pflanzen beide Syntheserouten an der Aufrechterhaltung des Phosphatidylcholinlevels beteiligt sind und dies je nach Spezies mit unterschiedlichem Ausmaß (Tasseva et al., 2004; Keogh et al., 2009).

3.2.5.2 Bedeutung eines Transportsystems für Cholin

Im humanen System existieren drei verschiedene Transportsysteme für Cholin: I) polyspezifische organische Kationentransporter (OCTs/SLC22A1-2) mit einer niedrigen Affinität für Cholin, II) *High-Affinity Choline Transporter 1* (CHT1/SLC5A7) und III) *Choline Transporter-Like* Proteine (CTLs/SLC44A1-5) mit intermediärer Affinität (Michel et al., 2006; Inazu, 2014). Der CHT1-Cholintransporter ist hauptsächlich in neuronalen Zellen exprimiert und transportiert Cholin für die Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin (Apparsundaram et al., 2000; Okuda et al., 2000). Im Gegensatz dazu wird das von den CTL-Proteinen transportierte Cholin überwiegend für die Phospholipidsynthese eingesetzt (O'Regan et al., 2000; Michel et al., 2006; Michel und Bakovic, 2009; Traiffort et al., 2013). In Pflanzen gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt kaum Informationen über Transportsysteme für Cholin und deren Bedeutung. Erste Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Cholin ließen die Hydrolyse von PtdCho außerhalb der Zelle und das Vorhandensein eines Transportsystems vermuten (Bligny et al., 1989; Gout et al., 1990). Van der Rest et al. (2002) postulierten die Existenz einer extrazellulären Glycerophosphocholin-Phosphodieesterase, die Glycerophosphocholin in Glycerol-3-phosphat und freies Cholin spaltet. Mittels radioaktiver Markierung konnten sie die

Aufnahme und anschließende Phosphorylierung des Hauptteils des gebildeten Cholins belegen, während ein Bruchteil als freies Cholin in die Vakuole transportiert wurde. Dies unterstreicht die potentielle Bedeutung eines Cholintransporters für die Pflanze (van der Rest et al., 2002). Eine neuere Studie konnte zeigen, dass das Bakterium *Pseudomonas syringae* extrazelluläres Cholin für seine Ernährung und zur Osmoprotektion verwerten kann (Chen et al., 2013). Laut Autoren wird dieses Cholin im Verlauf des Lipidrecyclings durch die Spaltung des Phospholipides PtdCho durch Phospholipasen generiert. Daraufhin erfolgt der Transport zu anderen Zellen und die Aufnahme in die Zelle, wo es für die Synthese von PtdCho über den energetisch günstigeren Kennedy-Pathway verwendet werden kann (Chen et al., 2013). Frühere Studien behaupteten, dass in Pflanzen die Spaltung von PtdCho von der cytoplasmatischen Membranseite durch eine intrazelluläre Phospholipase D (PLD) erfolgt und Cholin somit ins Cytosol entlassen wird (Fan et al., 1999; Nakamura et al., 2009). McGee et al. (2003) entdeckten allerdings die Existenz einer PLD in der Zellwand von Mesophyllzellen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine aufgereinigte PLD aus der Erdnuss nach der Infiltration in den Apoplasten PtdCho hydrolysieren kann (Andersson et al., 2006). Dies würde auch im Einklang damit stehen, dass PtdCho hauptsächlich in der dem extrazellulären Raum zugewandten Seite der Membran lokalisiert sein soll (van Meer et al., 2008).

3.2.6 Mögliche Auswirkungen eines veränderten Cholingehaltes in der Pflanze

3.2.6.1 Auswirkungen einer veränderten Plasmamembranzusammensetzung

PtdCho und PtdEth sind die Hauptphospholipide der pflanzlichen Plasmamembran und haben einen Gesamtanteil von 35,5 %, bzw. 38,9 % aller vorhandenen Phospholipide in den Blättern von *Arabidopsis thaliana* (Uemura et al., 1995). In vielen natürlich vorkommenden Lipiddoppelschichten ist die Verteilung der verschiedenen Lipide nicht gleichmäßig, sondern asymmetrisch. So ist der Hauptteil des PtdCho in Erythrozyten in der äußeren Membranseite zu finden, wohingegen PtdEth in der inneren Membranseite angereichert ist (Devaux, 1991). Käme es nun aufgrund der Punktmutation in der Transmembrandomäne von CHER1 zu einem Verlust der Lokalisation oder Transportfunktion des Cholintransporters, würde es in der Zelle zu einem Cholinmangel kommen. Dies wiederum würde sich negativ auf den Gehalt an durch den Kennedy-Pathway gebildetem PtdCho auswirken. Um diesen Mangel auszugleichen würde vermutlich die PtdCho-Synthese über den energetisch ungünstigeren Methylierungspathway verstärkt werden oder mehr PtdEth gebildet werden, was sich

dann in der Erhöhung des PtdEth-Levels widerspiegeln würde. Tatsächlich ergab eine Messung der wichtigsten Phospholipidklassen in den CHER1-Mutanten eine Verringerung des Gehaltes an PtdCho 759,0 um etwa 14 % sowie eine entsprechende Erhöhung des Gehaltes an PtdEth 718,7 um etwa den gleichen Wert. Dies deutet darauf hin, dass die Pflanze den Verlust an PtdCho durch eine Erhöhung des PtdEth-Levels zu kompensieren versucht.

Eine Veränderung der Lipidzusammensetzung kann vielfältige Auswirkungen auf die Plasmamembran sowie auf die Bindung und Funktion von Proteinen haben, die in Abbildung 38 zusammengefasst sind. Die veränderte Plasmamembranzusammensetzung beeinträchtigt mit größter Wahrscheinlichkeit Protein-Lipid Interaktionen, welche für das Targeting und/oder die Aktivität vieler Plasmamembran-lokalisierter oder -assoziierter Proteine unabdingbar sind. Die Lipide PtdCho und PtdEth können die Aktivität von Proteinen unterschiedlich beeinflussen (Abbildung 38A). Dies beruht besonders auf Unterschieden im Wasserstoffbrückenbindungspotential und in der Hydratisierung, der Eigenschaft von PtdEth, gewölbte, hexagonale H_{II}-Phasen zu bilden, sowie der kleineren Fläche, die von PtdEth im Vergleich zu einem äquivalenten PtdCho beansprucht wird (Lee, 2004). Beispielsweise vermindert die Anwesenheit von PtdEth die Aktivität der Ca^{2+}-ATPase und einer Diacylglycerol Kinase aus *E.coli*, wohingegen sie eine Grundvoraussetzung für eine korrekte Rhodopsinfunktion darstellt (Starling et al., 1996; Brown, 1997; Pilot et al., 2001). Weiterhin können Proteinbindestellen eine Spezifität für bestimmte Lipide aufweisen (Abbildung 38B), wie z.B. für Annexine gezeigt werden konnte (Blackwood und Ernst, 1990). Phospholipide können auch als Cofaktoren für Proteine agieren (Abbildung 38C) und so hängt die Funktion des Calciumkanals KcsA von der Anwesenheit von Phosphatidylglycerol oder anderen anionischen Phospholipiden ab (Heginbotham et al., 1998; Valiyaveetil et al., 2002). Eine mögliche Bedeutung des Phospholipides Phosphatidylcholin ergibt sich aus einer aktuellen Studie, in der eine *in vitro* Bindung von FLOWERING LOCUS T 1 (FT1) an PtdCho detektiert werden konnte (Nakamura et al., 2014). FT wird als systemischer Induktor der Blühinduktion bezeichnet, da er in Geleitzellen exprimiert und dann über das Phloem zum apikalen Sprossmeristem transportiert wird, wo er durch Interaktion mit dem bZIP Transkriptionsfaktor FLOWERING LOCUS D (FD) seine Funktion erfüllen kann (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005; Searle et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass FT hauptsächlich an PtdCho-Spezies, die während des Tages akkumulieren, bindet und dass diese Lipidbindung für die Funktion von FT, der Blühinduktion zum korrekten Zeitpunkt, von Bedeutung ist (Nakamura et al., 2014). Diese Beobachtung eröffnet also die Möglichkeit einer direkten Beteiligung von

PtdCho als unmittelbarer Bindepartner von Proteinen, was auch für MP17 nicht ausgeschlossen werden kann.

Das Einbringen von geladenen Phospholipiden in Membranen kann zudem die Konzentration geladener Moleküle und Ionen in unmittelbarer Nähe der Membranoberfläche beeinflussen (Abbildung 38D, Lee, 1977; McLaughlin, 1977). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Cluster-Bildung von Syntaxinen durch elektrostatische Interaktionen mit dem stark anionischen Lipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P2) vermittelt wird (van den Bogaart et al., 2011). Aber auch Proteine des Zytoskeletts können mit spezifischen Lipiden interagieren, was beispielweise durch eine Interaktion von Spektrin mit Phosphatidylserin und anderen Lipiden veranschaulicht werden kann (Maksymiw et al., 1987; Janmey und Lindberg, 2004; Grzybek et al., 2006). Ebenso können Membran-Zytoskelett-Interaktionen durch einen veränderten PtdIns(4,5)P2-Gehalt drastisch beeinflusst werden, da Adaptoren, die Motive wie PH, FYVE und PX enthalten, vorzugsweise an phosphorylierte Derivate von PtdIns binden (Kwik et al., 2003).

Im Fall von integralen Membranproteinen kann die Lipidzusammensetzung vor allem die Orientierung von Transmembrandomänen (TMD) beeinflussen, was z.B. für die Laktose-Permease LacY (Bogdanov et al., 2002; Wang et al., 2002; Xie et al., 2006), die Phenylalanin-Permease PheP (Zhang et al., 2003) sowie die γ-Aminobutyrat-Permease GabP (Zhang et al., 2005) aus *E.coli* gezeigt werden konnte (Abbildung 38E). Neben integralen Membranproteinen gibt es auch sogenannte periphere Membranproteine. Darunter versteht man cytoplasmatische Proteine, die unter bestimmten Bedingungen an die Plasmamembran rekrutiert werden können. Die Membranassoziation ist dabei nicht selten kritisch für die Funktion (Porter und Koelle, 2010). Das Targeting dieser Proteine an die Plasmamembran wird häufig durch Protein-Lipid Interaktionen vermittelt, indem bestimmte Domänen, beispielsweise C1 (*protein kinase C (PKC) conserved 1*), C2 (*PKC conserved 2*), PH (*pleckstrin homology*), PX (*Phox*) und „*tubby domains*“, die Verankerung an der Plasmamembran vermitteln (zusammengefasst in Cho und Stahelin, 2005). Die Interaktion dieser Domänen mit der Membranoberfläche kann dabei entweder spezifisch durch stereospezifische Erkennung bestimmter Membrankomponenten oder eher unspezifisch über biophysikalische Eigenschaften (Lemmon, 2008) sein. Weiterhin kann die Membranbindung durch Interaktion mit integralen Membranproteinen oder posttranslationale Modifizierungen wie Myristoylierung und Palmitoylierung erfolgen (Thompson Jr und Okuyama, 2000; Perraki et al., 2012). In anderen Fällen wird die PM-Assoziation durch unstrukturierte *cluster* von basischen oder hydrophoben Aminosäureresten (McLaughlin et al., 2002; McLaughlin und Murray, 2005) oder wie bei

viralen Fusionsproteinen beobachtet durch amphipathische Helices (Lins und Brasseur, 2008) vermittelt. Demnach kann auch die Anheftung von peripheren Membranproteinen durch die Lipidzusammensetzung beeinträchtigt werden (Abbildung 38F). MP17 beinhaltet keine Transmembrandomänen oder Membrantargetingsignale. Die PD-Lokalisation von MP17 wird wie bereits in Kapitel 3.1 erläutert durch drei Teilbereiche des Proteins vermittelt, was eine komplexe Faltung und/oder Domänenarchitektur des Proteins impliziert. Dies unterstützt die Hypothese, dass MP17 ein peripheres Membranprotein darstellt, dessen Membran- und sogar PD-Lokalisation von der Lipidzusammensetzung abhängt. Ein weiteres pflanzliches peripheres Membranprotein mit einer atypischen Membranbindedomäne, welches eine PD-Lokalisation aufweist, ist Remorin (Raffaele et al., 2009; Perraki et al., 2012). Ebenso weisen humane Hsp70-Proteine eine periphere Membranassoziation an Lysosomen, Mitochondrien und der Oberfläche von Krebszellen auf (Mahalka et al., 2014). Die Interaktion mit der Membran ist dabei von der Lipidkomposition abhängig. So binden Hsp70-Proteine selektiv an Membranen, die negativ geladene Phospholipide wie Cardiolipin, Phosphatidylserin und Bis(monoacylglycero)phosphat enthalten, was möglicherweise auch deren eben beschriebene Lokalisation erklärt (Mahalka et al., 2014). In Caco-2 Epithelzellen konnte zudem eine Assoziation von Hsp70 mit *detergent resistant membrane fractions* beobachtet werden (Broquet et al., 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass sich für bestimmte in speziellen Domänen angereicherte Lipidklassen bereits Abweichungen von weniger als einem Prozent kritisch auf die Membranstruktur und die Membrandynamik auswirken können (Devaux, 2000; Melser et al., 2011). Das Einbringen von PtdEth in PtdCho Bilayer führt zudem zu einem Krümmungsstress über der Membran, was wiederum die Aktivität Krümmungs-sensitiver Proteine beeinflussen kann (Abbildung 38G, Marsh, 2007; Lagace und Ridgway, 2013). Beispielsweise werden die ARF-GAP Aktivität und der COPI-vermittelte Transport durch Lipidverdichtungen und Membrankrümmung reguliert (Bigay et al., 2003). PtdEth fungiert außerdem als wichtige topologische Determinante, indem es einen abmildernden Effekt auf das Translokationspotential negativ geladener Reste in Extramembrandomänen ausübt (Bogdanov et al., 2008; Bogdanov et al., 2014). Wie wichtig eine genaue Abstimmung des PtdCho/PtdEth Verhältnisses als Schlüsselregulator der Membranintegrität sein kann, wird im Mausmodell deutlich. Hier führen bereits geringe Manipulationen zur Fortschreitung einer Steatosis (Verfettung der Leber) zu einer Steatohepatitis (Fettleber-Hepatitis) (Li et al., 2006). Laut den Autoren verursacht eine Veränderung dieses Verhältnisses eine *membrane leakage*, was darauf zurückzuführen

ist, dass PtdCho zylindrische Strukturen ausbildet, PtdEth hingegen konische Strukturen (Abbildung 38H, Li et al., 2006).

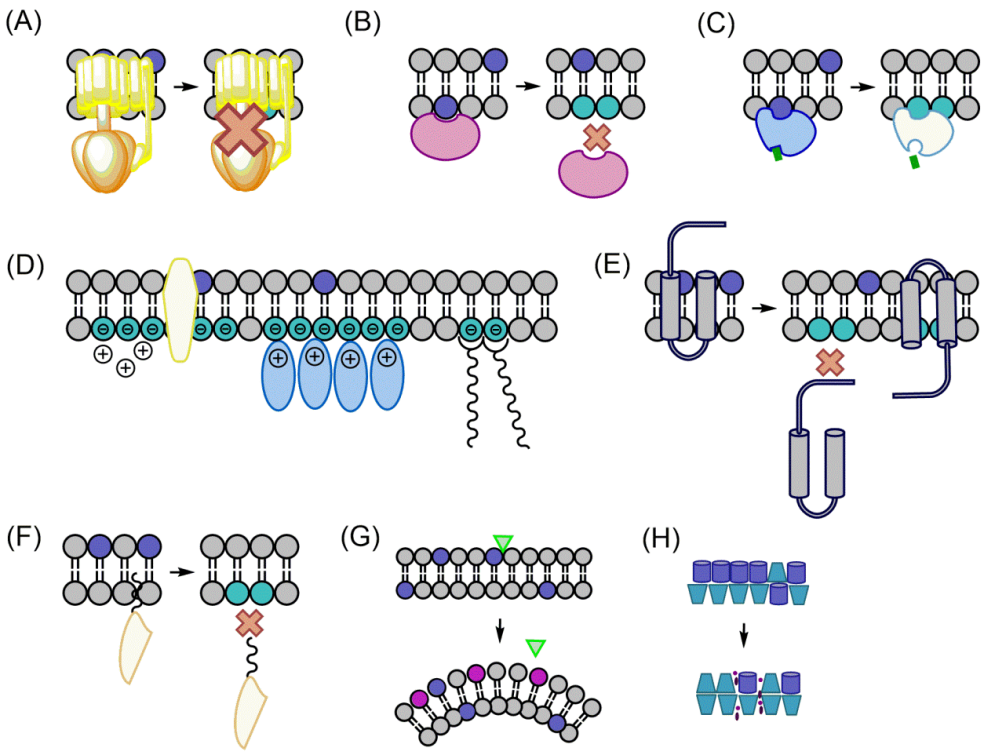

Abbildung 38: Auswirkungen einer veränderten Plasmamembranzusammensetzung. (A) Bestimmte Lipide können die Aktivität von Proteinen unterschiedlich beeinflussen. (B) Die Spezifität von Proteinbindestellen für bestimmte Lipide beeinflusst die Bindung von Proteinen an die PM. (C) Phospholipide können auch als Cofaktoren für Proteine agieren. (D) Geladene Phospholipide in Membranen können die Konzentration geladener Moleküle und Ionen in unmittelbarer Nähe der Membranoberfläche beeinflussen, die Cluster-Bildung von bestimmten Proteinen bewirken sowie mit Elementen den Zytoskeletts interagieren. Eine veränderte Lipidzusammensetzung kann den Einbau von integralen Membranproteinen beeinträchtigen und die Orientierung von Transmembrandomänen beeinflussen (E) oder die Anheftung von peripheren Membranproteinen beeinträchtigen (F). (G) Das Einbringen von PtdEth in PtdCho-Bilayer führt zu einem Krümmungsstress über der Membran, was wiederum die Aktivität Krümmungs-sensitiver Proteine beeinflussen kann (modifiziert nach Graham und Kozlov, 2010). (H) Das PtdCho/PtdEth Verhältnis gilt als Schlüsselregulator der Membranintegrität. Eine Veränderung dieses Verhältnisses resultiert in einer *membrane leakage*, was darauf zurückzuführen ist, dass PtdCho (blau) zylindrische Strukturen ausbildet, PtdEth (türkis) hingegen konische Strukturen (modifiziert nach Li et al., 2006).

In der thermosensitiven Hamstereizellenlinie MT58 resultiert eine Reduktion des PtdCho Levels um 50 % in einer Veränderung der ER-Morphologie von einer netzförmigen Struktur zu eher geweiteten rundlichen Strukturen (Testerink et al., 2009). Gleichermaßen führte auch eine Überproduktion an Phospholipiden - hauptsächlich PtdCho und PtdEth - in Arabidopsis *pah1 pah2* Doppelmutanten zu einer veränderten ER-Struktur, genauer zu einem partiellen Verlust des tubulären Netzwerkes und dem Erscheinen von ER-Sheets (Eastmond et al., 2010). In diesem Zusammenhang konnte auch in der in dieser Arbeit

durchgeführten Microarray-Analyse eine Hochregulierung von Transkripten, die an der Antwort auf ungefaltete Proteine im ER (*unfolded protein response*) sowie der ER-Stressantwort beteiligt sind, detektiert werden. Um zu überprüfen, ob die ER-Struktur in der CHER1-Mutante *cher1-4* verändert ist, wurde der ER-Marker GFP-SWEET1 (Wolfenstetter et al., 2012) mittels *particle gun* transient im Wildtyp und in *cher1-4* Mutanten exprimiert (Abbildung 39).

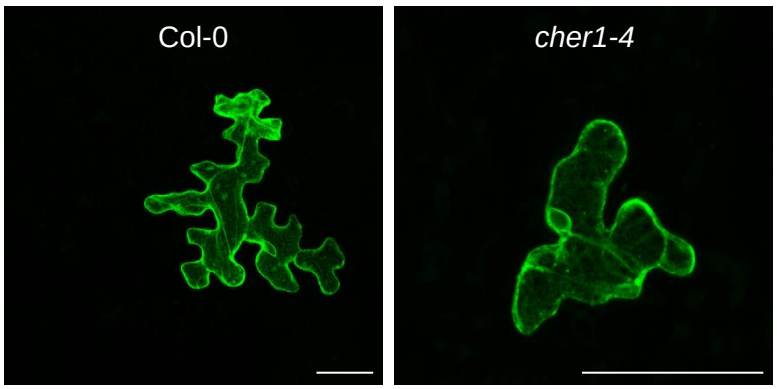

Abbildung 39: Lokalisation eines ER-Markers in Col-0 und *cher1-4* Pflanzen. Transiente Expression des ER–Markers GFP-SWEET1 (Wolfenstetter et al., 2012) in Col-0 und *cher1-4* Pflanzen mittels *particle gun* Beschuss 2 dpi. Standard entspricht 50 µm.

Jedoch konnten keine offensichtlichen Veränderungen der ER-Morphologie beobachtet werden (siehe Abbildung 39). Es ist dennoch nicht vollständig auszuschließen, dass geringfügige Veränderungen in der ER-Struktur durch die Lokalisierung des verwendeten Markers nicht sichtbar gemacht werden können. Weiterhin wäre denkbar, dass eine Reduktion des PtdCho-Levels um 14 % die ER-Struktur nicht beeinflusst, den Transport von Proteinen am Golgi-Komplex hingegen schon. Interessanterweise wurden durch die von Testerink et al. (2009) beobachtete veränderte ER-Morphologie in der Hamstereizellenlinie MT58 nicht die Transportprozesse am ER beeinflusst, sondern vielmehr der Transport vom Golgi-Komplex zur Plasmamembran hin. Dies deutet auf eine starke Sensitivität der Transportprozesse am Golgi-Komplex gegenüber Veränderungen im Lipidmetabolismus hin (Testerink et al., 2009). In diesem Zusammenhang spielen die PtdCho-Metabolite Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidsäure (PA, *phosphatidic acid*) aufgrund ihrer Fähigkeit zur Induktion einer Membrankrümmung eine wichtige Rolle beim Vesikeltrafficking (Kearns et al., 1997; Corda et al., 2002; Mousley et al., 2007; Yang et al., 2008). DAG ist weiterhin von Bedeutung für die Rekrutierung und Aktivierung von Proteinen, die am Membrantransport beteiligt sind, beispielsweise der Proteinkinase D (Baron und Malhotra, 2002). So überrascht es nicht, dass der DAG-Gehalt im Golgi Apparat streng von sogenannten PI-Transferproteinen reguliert wird, die vor allem dessen Fluss in den Kennedy-Pathway kontrollieren. Die bekanntesten Vertreter sind Sec14 aus der Hefe oder Nir2 in Säugertierzellen (McGee et al., 1994; Litvak et al., 2005). Li und Xue (2007) konnten zudem zeigen, dass die Phospholipase PLDζ2 und PA als positive

Regulatoren des Vesikeltraffickings in Wurzelzellen von Arabidopsis fungieren und u.a. für einen funktionalen Auxintransport benötigt werden. Ebenso ist die Interaktion von PA mit Syntaxin1A wichtig für Sekretionsprozesse (Lam et al., 2008). Somit konnte in den CHER1-Mutanten auch der Transport zur Plasmamembran beeinträchtigt sein (Abbildung 40).

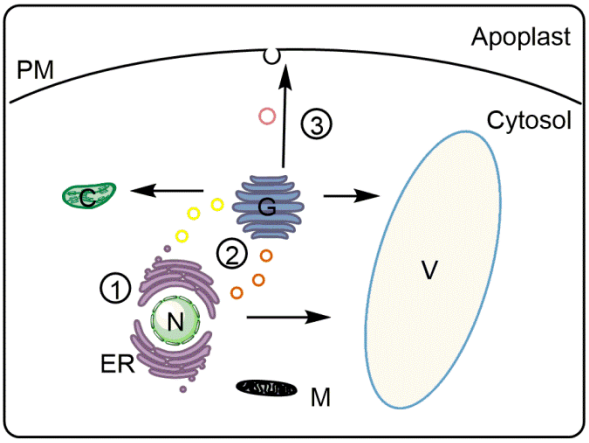

Abbildung 40: Auswirkungen einer veränderten Lipidzusammensetzung auf den Transport zu PD. Vereinfachtes Schema des sekretorischen Pathways in Pflanzen und mögliche Beeinträchtigungen. Durch eine Veränderung der Lipidzusammensetzung kann der Transport von Proteinen im sekretorischen Pathway an verschiedenen Stellen beeinträchtigt werden: (1) Einbau von Proteinen in die ER-Membran, (2) Transport vom ER zum Golgi oder (3) Transport vom Golgi zur Plasmamembran. N=Nukleus, ER=Endoplasmatisches Retikulum, G=Golgi, PM=Plasmamembran, V=Vakuole, C=Chloroplast, M=Mitochondrium. Modifiziert nach Foresti und Denecke, 2008.

Dettmer et al. (2014) konnten ebenfalls drei CHER1-Mutanten - *cher1-1*, *cher1-2* und *cher1-3* - identifizieren, welche einen defekten symplastischen Transport durch das Phloem aufwiesen. Visualisiert wurde dies durch eine beeinträchtigte Entladung von GFP, welches unter dem Geleitzellen-spezifischen Promotor pSUC2 (Imlau et al., 1999) exprimiert wurde, sowie einem veränderten Expressionsmuster des Phloem-spezifischen pAPL::GFPer. Allerdings bleibt zu erwähnen, dass die Expression von CHER1:YFP unter dem natürlichen CHER1-Promotor in Wurzeln zu einer Lokalisation des Fusionsproteins im Transgolginetzwerk (TGN) führte und nicht wie in dieser Arbeit beschrieben zusätzlich an der Plasmamembran. Die unterschiedliche Lokalisation könnte jedoch auf der Verwendung von verschiedenen Promotoren, den unterschiedlichen analysierten Geweben und im Besonderen dem Zeitpunkt der mikroskopischen Analysen beruhen. Denn auch in der vorliegenden Arbeit lokalisierte GFP:CHER1 nach zwei Tagen fast ausschließlich im ER und im Golgi. Weiterhin wurde die Plasmamembranlokalisation des Transporters auch in einer anderen Studie postuliert (Benschop et al., 2007). Interessanterweise waren in der Mutante *cher1-1* sowohl die Siebplattenfläche als auch die Siebporendichte stark reduziert. Die Siebporen bereits entwickelter Siebelemente fielen durch eine veränderte Struktur auf, indem der Desmotubulus in den Siebporen der Mutante anders als im Wildtyp erhalten blieb. Tabelle 10 zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse zu CHER1 aus der vorliegenden Studie und der Studie von Dettmer et al. (2014).

Tabelle 10: Zusammenfassung der Studien zu CHER1. Die Tabelle zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse zu CHER1 aus der vorliegenden Studie und der Studie von Dettmer et al. (2014).

SO15A ***cher1-5***	***cher1-4*** **ami_*CHER1***	***cher1-1*** **(Dettmer et al., 2014)**
• Wachstumsretardierung		• Wachstumsretardierung
• reduzierte Wurzellänge		• reduzierte Länge primärer Wurzeln + laterales Wurzelwachstum
• reduzierte PD-Lokalisierung von MP17		• abnormale Zellwandpositionierung
• Akkumulation von Zucker und Stärke in Sourceblättern		• gestörter symplastischer Phloemtransport
• veränderte Phospholipid-Zusammensetzung		• Reduktion des Gehalts an Cholin um 40 % und Phosphocholin um 51 % in der Wurzel
• vermindertes PtdCho/PtdEth-Verhältnis: Gehalt an PtdCho um 14 % erniedrigt, Gehalt an PtdEth um 14 % erhöht (Blatt)		• reduzierte Siebplattenfläche und Siebporendichte
• Cholingehalt erhöht		• veränderte Siebporenstruktur: Desmotubulus bleibt erhalten

Siebplattenporen entstehen ursprünglich aus Plasmodesmata durch eine Vergrößerung der Pore, der Ablagerung von Kallose und dem kompletten Verlust des Desmotubulus (Esau und Thorsch, 1985; Bell und Oparka, 2011). Es wäre durchaus vorstellbar, dass die von Dettmer et al. (2014) beobachtete Veränderung der Siebplatten- und Siebporenstruktur aus einer gestörten Entwicklung der Siebporen resultiert. Die gestörte Entwicklung der Siebporen wiederum könnte auf eine veränderte ER-Struktur infolge eines reduzierten PtdCho-Levels zurückzuführen sein. Da Siebporen wie schon erwähnt ursprünglich aus Plasmodesmata hervorgehen, könnte diese Entdeckung gleichermaßen auch auf die Entwicklung und/oder die Struktur der Plasmodesmata übertragbar sein, was dann die veränderte MP17:GFP Lokalisation an PD erklären könnte. In diesem Zusammenhang kann die extreme Konstriktion des Desmotubulus u.a. durch die Insertion von zylindrischen Lipidmolekülen wie PtdCho in die äußere Membranschicht erreicht werden (Tilsner et al., 2011). Eine Verringerung der PtdCho-Konzentration könnte dementsprechend eine beeinträchtigte Konstriktion des Desmotubulus mit sich bringen. Während eine asymmetrische Lipidverteilung für die Induktion der Membrankrümmung ausreicht, ist für die Aufrechterhaltung von bestimmten Membranformen eine Beteiligung von Proteinen erforderlich (van Meer und Sprong, 2004; Voeltz und Prinz, 2007; Shibata et al., 2009; Tilsner et al., 2011). So konnte kürzlich gezeigt werden, dass Retikulons und Proteine der DP1/Yop1 Familie an der Aufrechterhaltung der tubulären Krümmung des

kortikalen ER, dem Ursprung des Desmotubulus, beteiligt sind (Voeltz et al., 2006; Hu et al., 2008). Diesbezüglich könnte eine veränderte Membranzusammensetzung im kortikalen ER oder dem Desmotubulus auch die Bindung von sogenannten Scaffoldproteinen oder Proteinen, die an der Bildung und Aufrechterhaltung der Desmotubulusstruktur und somit auch der PD-Struktur mitwirken, beeinträchtigen.

3.2.6.2 Plasmodesmata als spezialisierte Membrandomäne

Grundsätzlich sind bis zu 1000 verschiedene Lipidspezies pro Zelle möglich (van Meer, 2005), wobei deren Komplexität mit den derzeitigen Analysemethoden nur ansatzweise erfasst werden kann. Die drei Hauptlipidklassen der pflanzlichen Plasmamembran sind Glycerolipide, hauptsächlich Phospholipide (PL), mit 46,8 % am Gesamtanteil der Lipide in Arabidopsisblättern, Sterole (St) mit 46 % und Sphingolipide (SL) mit 7,3 % (Uemura et al., 1995). In künstlichen Membranen konnte für diese Lipidklassen eine sich spontan ausbildende Phasentrennung beobachtet werden (Karnovsky et al., 1982; Thompson und Tillack, 1985). Dies lässt darauf schließen, dass Lipide in der Plasmamembran nicht gleichmäßig verteilt sind, sondern Subdomänen mit spezifischer Lipid- und Proteinzusammensetzung, sogenannte Mikrodomänen, bilden (Zauber et al., 2014). Nach dem Raft-Modell bilden gesättigte Phospholipide, hauptsächlich Sphingolipide, und Sterole die besonders dicht gepackte *liquid-ordered* (L_O) *phase*, welche normalerweise sehr kurzlebig (<1 ms) ist. Durch gesättigte Lipidanker, Transmembrandomänen von Raft-assoziierten Proteinen und Protein-Protein-Interaktionen können diese Mikrodomänen, die auch als *lipid rafts* oder *membrane rafts* bezeichnet werden, allerdings stabilisiert werden, wodurch sie einen Durchmesser von bis zu 200 nm und eine Lebenszeit von über einer Sekunde erreichen können (Simons und Vaz, 2004; London, 2005; Silvius, 2005; Mayor et al., 2006; Tilsner et al., 2011). Die umgebende Membran wird als *liquid disordered phase* bezeichnet und ist durch eine höhere Fluidität charakterisiert, welche aus der größeren eingenommenen Oberfläche ungesättigter Phospholipide resultiert (Bhat und Panstruga, 2005). Die Zusammensetzung eines *lipid rafts* ist in Abbildung 41 skizziert. *Lipid raft*-assoziierte Proteine können generell über die Isolierung sogenannter *detergent resistant membrane fractions* (DRM) oder *detergent insoluble membrane fractions* (DIM) identifiziert werden, da sich Sterol- und Sphingolipid-angereicherte Membranfraktionen im Gegensatz zu ungesättigten Phospholipiden nicht durch milde, nicht-ionische Detergenzien wie Trition X-100 solubilisieren lassen (Tilsner et al., 2011).

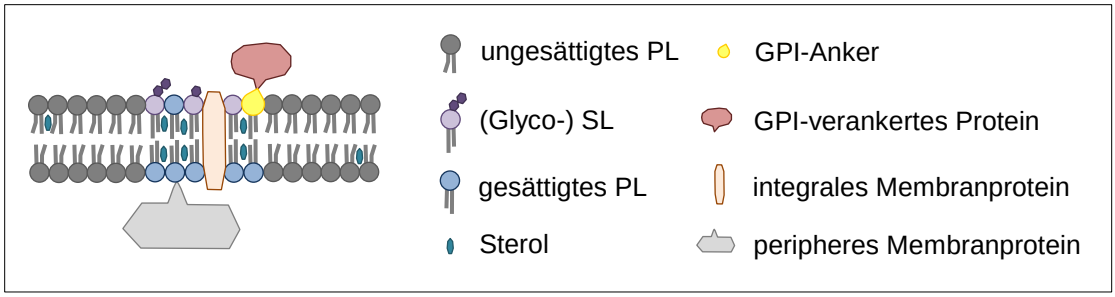

Abbildung 41: Schematische Darstellung eines *lipid rafts*. Während die umgebende Plasmamembran hauptsächlich aus ungesättigten Phospholipiden (PL) aufgebaut ist, zeichnen sich *lipid rafts* durch die Anwesenheit von gesättigten Phospholipiden, Sphingolipiden (SL) sowie Sterolen aus. Weiterhin weisen GPI-verankerte Proteine eine Anreicherung in *lipid rafts* auf. Ebenso lokalisieren bestimmte integrale oder periphere Membranproteine spezifisch in *lipid rafts*. Modifiziert nach Bhat und Panstruga (2005).

Auf der Suche nach PD-Komponenten wurde der plasmodesmalen Lipidzusammensetzung bisher nur wenig Aufmerksamkeit gewidmet, obwohl PD Membran-reiche Strukturen darstellen und viele der identifizierten PD-Proteine integrale oder periphere Membranproteine sind (Tilsner et al., 2011). Die Autoren fassten eine Vielzahl an Daten zusammen, die für eine bestimmte Zusammensetzung der PM innerhalb der PD argumentieren. Demnach sei die Definition einer Membrandomäne, an die ein virales Movementprotein bindet, möglicherweise von größerer Bedeutung, als die Suche nach einem spezifischen Rezeptor (Tilsner et al., 2011). Bisherige Analysen deuten darauf hin, dass sich die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran innerhalb der PD-Pore von der umgebenden Plasmamembran unterscheidet. So konnte in Suspensionszellkulturen aus Soja Wurzelzellen gezeigt werden, dass Fluoreszenz-markierte Sphingolipide, welche hauptsächlich in der äußeren Membranschicht lokalisieren, entlang der Plasmamembran diffundieren können, nicht jedoch über PD hinweg (Grabski et al., 1993). Ein ähnliches Phänomen konnte auch für die Plasmamembran in *tight junctions* in tierischen Zellen beobachtet werden (Dragsten et al., 1981). Weiterhin konnte für die Plasmamembran-H^+-ATPase mittels Immunogold-lokalisation eine Verteilung entlang der gesamten Plasmamembran detektiert werden, jedoch nicht an/innerhalb von PD (Fleurat-Lessard et al., 1995). In einer neuen Studie wurde jedoch für das Thioredoxin h (Trxh) Zell-zu-Zell Verbreitung in Arabidopsiswurzeln demonstriert (Meng et al., 2010). Dies scheint auf der Membranlokalisierung, welche vermutlich durch Myristoylierung des Gly^2-Restes vermittelt wird, sowie der anschließenden Palmitoylierung des Cys^4-Restes des Proteins zu basieren, was die Möglichkeit eines Traffickings über die PD-PM unterstreicht.

Mehrere Hinweise sprechen für die Existenz von *lipid rafts* innerhalb der PD-Pore. Das Hauptindiz liefert die PD-Lokalisation des bereits in Kapitel 3.1.3 erwähnten pflanzen-

spezifischen Proteins Remorin, wobei der C-terminale Anker von STREM1.3 spezifisch an Lipide, die in pflanzlichen *lipid rafts* zu finden sind, bindet (Perraki et al., 2012). Die potentielle Bedeutung der PD-Lokalisation von Remorin wird durch dessen Einfluss auf die Virusverbreitung des *Potato Virus X* (PVX) betont, wobei eine inverse Korrelation zwischen Virusverbreitung und REM-Gehalt beobachtet werden konnte (Raffaele et al., 2009; Perraki et al., 2014). Es wurde vermutet, dass REM durch die Interaktion mit TGB1, dem PVX Movementprotein, die Vergrößerung des plasmodesmalen SEL durch TGB1 verhindert (Angell et al., 1996; Howard et al., 2004; Raffaele et al., 2009). Diese Hypothese konnte in einer späteren Studie anhand von Permeabilitätstudien mit freiem GFP bestätigt werden, wobei die Überexpression von REM zu einer Verminderung der durch TGB1 induzierten GFP-Diffusion führte (Perraki et al., 2014). Der gleiche Effekt zeigte sich auch bei den Movementproteinen TMV MP30 und PVY Hc-Pro. Interessanterweise resultierte die Überexpression von REM auch in der Abwesenheit der eben genannten Movementproteine in einer reduzierten GFP-Fusion. Dies lässt eine generelle Funktion von REM in der Regulation der PD-Permeabilität vermuten, wobei diese aufgrund des fehlenden Phänotyps der REM-Überexpressionspflanzen wohl eher indirekt zu sein scheint (Perraki et al., 2014). Die potentielle Existenz von *lipid rafts* innerhalb der PD-Pore wird außerdem durch die plasmodesmale Lokalisation zweier Glycosylphosphatidylinositol-verankerter Proteine - PDCB1 und eine ß-1,3-Glukanase - bekräftigt, da Proteine mit dieser posttranslationalen Modifikation häufig eine Anreicherung in *lipid rafts* aufweisen (Cordy et al., 2003; Borner et al., 2005; Grennan, 2007; Levy et al., 2007; Kierszniowska et al., 2009; Simpson et al., 2009). Weiterhin wird ein möglicher Zusammenhang zwischen DIM und dem plasmodesmalen Transport durch das kürzlich in Arabidopsis identifizierte Synaptotagmin1 unterstützt, welches im kortikalen ER, in Endosomen sowie in DIM in der PM lokalisiert (Schapire et al., 2008; Minami et al., 2009; Lewis und Lazarowitz, 2010; Yamazaki et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Synaptotagmin1 nicht nur die Endozytose und das Recycling endosomaler Vesikel reguliert, sondern auch das MP-vermittelte *trafficking* von Virusgenomen durch Plasmodesmata beeinflusst (Lewis und Lazarowitz, 2010; Uchiyama et al., 2014).

Lipid rafts stellen zudem Plattformen für Signalproteine, v.a. Kinasen mit Rezeptorfunktion, dar und nehmen dadurch eine Schlüsselrolle für die Signalweiterleitung und die Zell-zu-Zell Kommunikation ein (Hoessli et al., 2000; Shahollari et al., 2004; Bhat und Panstruga, 2005; Kierszniowska et al., 2009; Pike, 2009; Lingwood und Simons, 2010; Simon-Plas et al., 2011). In humanen Zellen wird beispielsweise die Ser/Thr Kinase Akt an *lipid rafts* rekrutiert, wo sie an der Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden

beteiligt ist (Lasserre et al., 2008). Auch innerhalb der PD-Pore konnten bisher einige Kinasen identifiziert werden. Beispielsweise waren unter insgesamt 15 ausgewählten näher analysierten Kandidaten des PD-Proteoms von Fernandez-Calvino et al. (2011) auch drei Rezeptor-ähnliche Kinasen vertreten. Ebenso konnte für die Rezeptor-ähnliche Serin-/Threonin Kinase CRINKLY4 in Aleuronzellen eine PD-Lokalisation detektiert werden (Tian et al., 2007). Spezifische Signalsequenzen für die Lokalisation in *lipid rafts* konnten mit Ausnahme einer sechs Aminosäuren langen *lipid raft*-Targetingsequenz der humanen Tyrosin Phosphatase *Src homology 2-containing phosphatase1* bisher allerdings kaum identifiziert werden (Sankarshanan et al., 2007; Rossin et al., 2010; Perraki et al., 2012). In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass *lipid raft*-assoziierte Proteine wie Remorin eine Gerüst- oder Ankerfunktion für andere Proteine übernehmen und PM-assoziierte oder cytoplasmatische Proteine, beispielsweise Signalproteine und Membran-modifizierende Proteine, an *lipid rafts* rekrutieren (Lefebvre et al., 2010; Jarsch und Ott, 2011).

Es wird angenommen, dass eine hohe Dichte an *lipid raft*-Proteinen innerhalb der PD-Pore eine spontane Bildung sowie eine weitere Anreicherung von *lipid rafts* in der plasmodesmalen Plasmamembran begünstigt. Somit wäre es möglich, dass die komplette PD-Plasmamembran aus einer Vielzahl dicht zusammenliegender L_O-Domänen besteht (Hancock, 2006; Tilsner et al., 2011). Normalerweise weisen L_O-Phasen eine 2-3 fach reduzierte laterale Diffusion auf. Demnach kann die verstärkte Diffusionsbarriere innerhalb der PD-Pore nur durch Beteiligung zusätzlicher Faktoren, z.B. einer besonders hohen Dichte an Transmembranproteinen oder der Anwesenheit globulärer Proteine, erreicht werden (Overall und Blackman, 1996; Jacobson et al., 2007; Tilsner et al., 2011).

Lipid rafts in Pflanzen bestehen hauptsächlich aus Spingholipiden und Sterolen (Mongrand et al., 2004; Laloi et al., 2007; Carmona-Salazar et al., 2011; Cacas et al., 2012). Interessanterweise zeigte die Transkriptomanalyse der vorliegenden Arbeit eine Herunterregulierung von Genen, die potentiell an der Synthese von Sterolen und langkettigen Fettsäuren (*very long chain fatty acids*, VLCFA) beteiligt sind, welche wiederum Bestandteil von pflanzlichen Sphingolipiden und kutikularen Wachsen sind. In Einklang damit waren auch die Transkripte mehrerer potentiell *lipid raft*-assoziierter Proteine herunterreguliert (siehe Anhang Tabelle 21). Der Einfluss des Cholin-, bzw. Phosphatidylcholingehaltes auf die Zusammensetzung und Funktion von *lipid rafts* wurde erst kürzlich durch zwei unabhängige Studien demonstriert. So konnte im Zusammenhang mit der *Fetal Alcohol Spectrum Disorder* (FASD) gezeigt werden, dass in zerebralen granulären Neuronen durch Cholinzugabe der Effekt von Ethanol auf die *lipid raft*-abhängigen Funktionen des L1 *Adhesion Molecule* verhindert werden kann (Tang et al.,

2014). Die Ethanolexposition bewirkt den schnellen Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid und Pyrophosphat, wobei Ceramid ein proapoptotisches Signal ist (Viktorov und Yurkiv, 2008; Saito und Saito, 2013). Die Autoren postulierten, dass durch die Zugabe von Cholin der Sphingomyelingehalt wieder normalisiert werden könnte, wodurch eine *lipid raft* Dysfunktion verhindert werden könnte (Tang et al., 2014).

Die möglichen Auswirkungen eines Cholinmangels werden in Haut-Fibroblasten von Patienten mit posturalem orthostatischen Tachykardiesyndrom (POTS) deutlich. In diesen waren sowohl die Proteinkonzentration des Cholintransporters CTL1/SLC44A1 (*choline transporter-like protein 1*/*solute carrier 44A1*) als auch die mRNA Expression 2-3 fach reduziert (Schenkel et al., 2014). CTL1 vermittelt im humanen System die zelluläre Cholinaufnahme für die Synthese der Membranlipide Phosphatidylcholin und Sphingomyelin ebenso wie die Aufnahme in Mitochondrien zur Speicherung von Cholin (Michel und Bakovic, 2009). In POTS-Fibroblasten war die zelluläre Cholinaufnahme um 60 % sowie der mitochondriale Cholintransport um 50 % reduziert, was in einer gestörten Membran-Homöostase resultierte, genauer gesagt einem reduzierten PtdCho:PtdEth Verhältnis, einem erhöhten Sphingomyelin:Cholesterol-Verhältnis sowie einer veränderten Fettsäurekomposition der Phospholipide. Somit ist davon auszugehen, dass in POTS-Fibroblasten auch die Ausbildung von *lipid rafts* betroffen ist (Schenkel et al., 2014). Die drastische Reduktion des Cholingehaltes wirkte sich interessanterweise auch auf die Funktion der Mitochondrien aus und es konnte u.a. eine erhöhte ROS-Produktion beobachtet werden (Schenkel et al., 2014). Dies lässt die Vermutung zu, dass der veränderte Phosphatidylcholingehalt in den CHER1-Mutanten möglichweise auch die Ausbildung von *lipid rafts* und somit essentielle plasmodesmale Funktionen beeinträchtigt. Ebenso müsste die ROS-Produktion in den CHER1-Mutanten überprüft werden, da die Beeinflussung der plasmodesmalen Permeabilität durch ROS-Gehalte bereits gezeigt werden konnte. Interessanterweise konnte in der Transkriptomanalyse eine Hochregulierung von Transkripten von ROS-Markergenen sowie antioxidativen Genen detektiert werden, darunter sechs Glutaredoxine, der durch Superoxid induzierte Transkriptionsfaktor WRKY30 und die NADPH-Oxidase RbohF als ROS-Produzent (Mittler et al., 2004; Mehterov et al., 2012). Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass sowohl eine Reduktion als auch eine Verstärkung der NADPH-Oxidase Aktivität die ROS-Akkumulation in der Wurzel und dadurch das laterale Wurzelwachstum verstärken kann (Li et al., 2014). Zudem soll RbohF zusammen mit RbohD die ABA-induzierte ROS-Produktion, ABA-abhängige Aktivierung von Calciumkanälen und ABA-induzierte Schließung der Stomata vermitteln (Kwak et al., 2003).

Abbildung 42 veranschaulicht die möglichen Auswirkungen einer veränderten Lipidzusammensetzung auf PD als spezialisierte Membrandomäne.

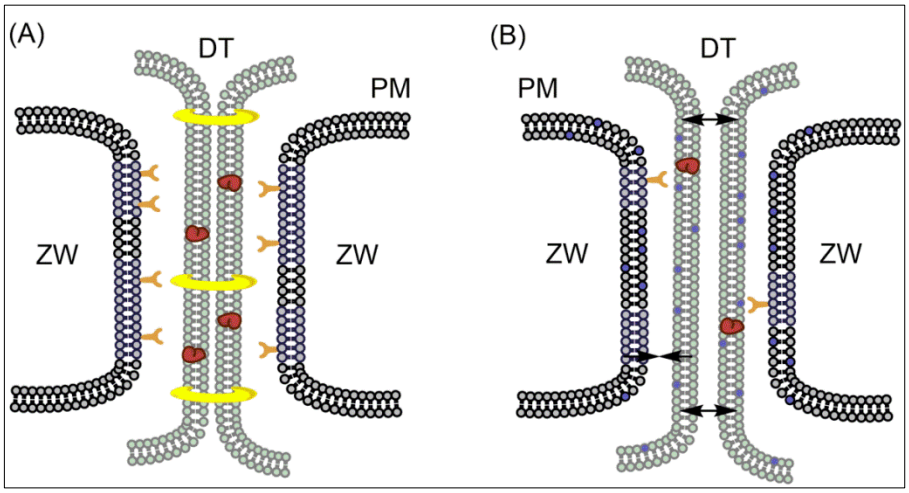

Abbildung 42: Auswirkungen einer veränderten Lipidzusammensetzung auf PD als spezialisierte Membrandomäne. (A) Es wird postuliert, dass sich die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran innerhalb der PD von der umliegenden Plasmamembran (PM) unterscheidet, insbesondere durch die Anhäufung von *lipid rafts* (lila hervorgehoben). Einige Proteine, wie zum Beispiel Remorin, lokalisieren spezifisch in *lipid rafts* (orange hervorgehoben). Die extreme Konstriktion des Desmotubulus (DT) kann u.a. durch die Insertion von zylindrischen Lipidmolekülen wie PtdCho in die äußere Membranschicht erreicht werden (Tilsner et al., 2011). An der Aufrechterhaltung der tubulären Krümmung sind vermutlich zusätzliche Scaffoldproteine (rot und gelb dargestellt) beteiligt. (B) Durch das verminderte PtdCho/PtdEth-Verhältnis kann die Ausbildung von *lipid rafts* und somit die Lokalisation putativer PD-Rezeptoren beeinträchtigt werden. Zudem kann die Bindung von Scaffoldproteinen durch eine veränderte Lipidzusammensetzung beeinträchtigt werden. Dies würde dann vermutlich in einer Dilatation des Desmotubulus-Durchmessers und damit einhergehend in einer Reduktion des Durchmessers des Zytoplasmaschlauchs resultieren. ZW=Zellwand.

3.2.6.3 Möglicher Einfluss von CHER1 auf Lipidsignalleitungsprozesse

Die zweite Hauptaufgabe von Lipiden als Signalmoleküle sollte bei der Ermittlung der möglichen Bedeutung von CHER1 für die Pflanze ebenfalls nicht vernachlässigt werden. Signallipide wie Phosphatidsäure, Diacylglycerol, Lysophospholipide, Fettsäuren, Inositolphosphate, Oxylipine, Sphingolipide und N-Acetylethanolamine sind bei der Reaktion auf eine Vielzahl an Stressbedingungen involviert, beispielsweise bei Pathogenbefall, Trockenheit, Salzstress und Temperaturveränderungen (Okazaki und Saito, 2014). In der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalyse konnte die Herunterregulierung einer Diacylgylcerolkinase in den CHER1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. Dieses Enzym ist direkt an der Bildung des Lipidsignalmoleküls PA beteiligt, indem es die Phosphorylierung von DAG, das wiederum aus der Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P2) durch die Phospholipase C (PLC) stammt, katalysiert (Munnik, 2001; Meijer und Munnik, 2003). Eine weitere

Möglichkeit für die Generierung von PA stellt die Hydrolyse von strukturellen Lipiden wie PtdCho und PtdEth durch die Phospholipase D (PLD) dar (Munnik, 2001; Meijer und Munnik, 2003). Mit einem Anteil von nur 1-2 % am Gesamtanteil aller Lipide in eukaryontischen Zellen besitzt PA nur eine geringe Bedeutung als Membranlipid (Munnik, 2001). Nichtsdestotrotz sind seine Funktionen als Lipidsignalmolekül sehr vielfältig und die Identifizierung potentieller PA-Zielproteine ist entscheidend für das Verständnis der ablaufenden Prozesse (Testerink und Munnik, 2005, 2011; Janda et al., 2013). Durch PLD produzierte Phosphatidsäure kann z.B. an die Proteinphosphatase 2C ABI1, einem negativen Regulator des ABA-Signalweges, binden. Durch Verminderung der Phosphataseaktivität von ABI1 wirkt PA somit positiv auf ABA-Signalleitungsprozesse (Zhang et al., 2004). Durch die Bindung an die NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF unterstützt PA die ROS-Produktion und Schließung der Stomata (Zhang et al., 2009). Ebenso beeinflusst PA die Aktivität einer Vielzahl an Kinasen, mitunter *mitogen-activated protein* (MAP) Kinasen (Zhang et al., 2003), SnRK2.4 und SnRK2.10 (McLoughlin et al., 2012), AtPDK1 (Anthony et al., 2004) und MAPK6 (Yu et al., 2010). Die Bindung von PA an 14-3-3 Proteine kann deren Bindungsvermögen an Zielproteine beeinträchtigen. Beispielsweise hemmt die Bindung von PA die 14-3-3-Protein vermittelte Stimulation der Protonenpumpenaktivität der Plasmamembran H^+-ATPase (Camoni et al., 2012). Ein weiteres Zielprotein von PA ist das Cappingprotein AtCP, dessen Aktinbindeaktivität durch Anlagerung von PA inhibiert wird (Huang et al., 2006). Der Einfluss von Membranlipiden auf das Zytoskelett im Verlauf von Stress-Signalleitungsprozessen wird durch die Beobachtung bestärkt, dass durch PLDα1 generierte Phosphatidsäure an MAP65-1 binden kann und dadurch dessen Aktivität, die Polymerisation und Bündelung der Mikrotubuli, erhöht (Zhang et al., 2012). Weiterhin scheint PA in Ethylen-vermittelte Prozesse involviert zu sein (Fan et al., 1997) und so blockiert die Binding von PA an CTR1, einem negativen Regulator des Ethylensignalleitungsweges, dessen Interaktion mit ETR1, einem bekannten Ethylenrezeptor (Testerink et al., 2007). In diesem Zusammenhang konnte in der Mikroarray-Analyse für die CHER1-Mutanten eine deutliche Herunterregulierung der Transkriptmengen für potentiell PA-involvierende Prozesse beobachtet werden, hauptsächlich Ethylen-vermittelte Prozesse, Vesikeltrafficking, Signalleitung, sowie Abwehr-assoziierte Prozesse. Auf den ersten Blick steht dies im Kontrast zur Phospholipidmessung, bei der kein Unterschied im PA-Gehalt detektiert werden konnte. Jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, dass durch Methoden zur Phosholipidbestimmung wie etwa TLC, GC oder HPLC nur große Unterschiede ermittelt werden können, wohingegen geringfügige Veränderungen, z.B. bei Turnoverprozessen, nicht erfasst werden (Arisz et al., 2009). Dies könnte erklären, warum trotz Auffälligkeiten

in der Transkriptomanalyse keine Veränderung im PA-Gehalt detektiert werden konnte, insbesondere da der Großteil des gemessenen PA vermutlich als Vorstufe für die Synthese von Phospholipiden fungiert (Arisz et al., 2009).

Ebenso waren in den CHER1-Mutanten die Transkriptlevel für das PATATIN-like protein 9, auch bekannt unter PLA IIIB, im Vergleich zum Wildtyp Col-0 reduziert. PLA IIIB gehört zur Phospholipase A (PLA) Superfamilie in Arabidopsis. Diese katalysiert die Hydrolyse von Glycerophospholipiden unter der Bildung von freien Fettsäuren oder Lysophospholipiden, welche beide als Lipidsignalmolekül fungieren (Ryu, 2004). Lysophospholipide sind normalerweise nur in extrem geringen Mengen vorhanden, können aber als Reaktion auf bestimmte Stressbedingungen drastisch ansteigen, z.B. während der Kälteakklimatisierung (Welti et al., 2002). Die Elicitor-Behandlung von Zellkulturen des Kalifornischen Mohns (*Eschscholzia californica*) resultierte in einer Aktivierung der Phospholipase A2 und somit in der Bildung von Lysophosphatidylcholin an der Plasmamembran, was wiederum die Aktivierung des tonoplastidären H^+/Na^+-Antiporters auslöste (Viehweger, 2002). Lysophosphatidylethanolamin ist zudem in die Regulation der Pollenkeimung sowie dem Pollenschlauchwachstum involviert (Kim et al., 2011). Interessanteranterweise konnte in der Phospholipidmessung eine signifikante Reduktion des Levels an Lysophosphatidylcholin 518,5 in den CHER1-Mutanten detektiert werden.

Des Weiteren gibt es immer mehr Hinweise für die Rolle von Fettsäuren und deren Derivaten als Signalmoleküle in einer Vielzahl an Stressantworten (Kachroo und Kachroo, 2009). So kann die an der Signalleitung beteiligte PLDδ durch die Fettsäure Oleinsäure stimuliert werden (Wang und Wang, 2001). Im Gegensatz dazu wird MP2C, eine Serin/Threonin Phosphatase, durch langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren inhibiert (Baudouin et al., 1999). Durch die Bindung an NITRIC OXIDE ASSOCIATED1 (NOA1) und dessen anschließendem Abbau, beeinflusst Oleinsäure die Synthese von Stickstoffmonoxid und damit auch die Stickstoffmonoxid-vermittelte Signalleitung in Arabidopsis (Mandal et al., 2012).

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen: Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Applichem GmbH (Darmstadt), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Bio-Rad (München), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), GE Healthcare (Freiburg), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main), Merck (Darmstadt), Stratagene (Amsterdam), Whatman (Maidstone, England) und VWR International GmbH (Darmstadt).
Weiterhin wurden Kits der Firma Qiagen GmbH (Hilden) für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien, die Aufreinigung von PCR-Produkten und für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen verwendet.

4.1.2 Oligonukleotide und Sequenzierungen

Alle verwendeten Oligonukleotide (siehe Anhang Tabelle 17) wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder Metabion International AG (Martinsried) bezogen. Sequenzierungen wurden von der GATC Biotech GmbH (Konstanz) durchgeführt.

4.1.3 Vektoren und generierte Konstrukte

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Vektoren verwendet:

Tabelle 11: Verwendete Vektoren

Name	Resistenz	Verwendung	Referenz / Hersteller
pENTR™/D-TOPO®	Kan^R	„Entry“-Vektor für Gateway®-Klonierung	Invitrogen™, Karlsruhe
pCRBluntII	Kan^R	Klonierungsvektor	Invitrogen™, Karlsruhe
pK7FWG2	$Spec^R$, $Strep^R$	Binärer Vektor, C-terminaler GFP-*tag*, konstitutive Expression in Pflanzen	(Karimi et al., 2002)
pK7WGF2	$Spec^R$, $Strep^R$	Binärer Vektor, N-terminaler GFP-*tag*, konstitutive	(Karimi et al., 2002)

		Expression in Pflanzen	
pGWB614	$Spec^R$	Binärer Vektor, C-terminaler 3-fach HA-*tag*, konstitutive Expression in Pflanzen	(Nakamura et al., 2010)
pGWB615	$Spec^R$	Binärer Vektor, N-terminaler 3-fach HA-*tag*, konstitutive Expression in Pflanzen	(Nakamura et al., 2010)
pRB-35S-GW $VENUS^{N173}$	$Spec^R$, $Strep^R$	Bimolekulare Fluoreszenz-komplementation	(Üstün, 2013)
pRB-35S-GW $VENUS^{C155}$	$Spec^R$, $Strep^R$	Bimolekulare Fluoreszenz-komplementation	(Üstün, 2013)
pFV3	Kan^R	Binärer Vektor, pAF16, Expression eines amiRNA-Konstruktes gegen *At3g12180* inklusive pdk-Intron 2	(Becker et al., 1992; Stadler et al., 2005)

Anhand der Ausgangsvektoren wurde in der vorliegenden Arbeit eine Vielzahl an Konstrukten/Plasmiden generiert, welche in Tabelle 12 aufgeführt sind.

Tabelle 12: Generierte Konstrukte

Name	Resistenz	Kloniertes Fragment
MP17 fl	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17Δ1-18	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit Deletion der AS 1-18 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17Δ110-156	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit Deletion der AS 110-156 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17Δ1-109	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit Deletion der AS 1-109 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17Δ1-99	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit Deletion der AS 1-99 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17Δ1-89	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit Deletion der AS 1-89 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17Δ1-79	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit Deletion der AS 1-79 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17Δ1-66	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit Deletion der AS 1-66 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17Δ1-53	$Spec^R$,	Kodierende Sequenz von MP17 mit Deletion der

	$Strep^R$	AS 1-53 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17Δ1-40	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit Deletion der AS 1-40 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17Δ1-27	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit Deletion der AS 1-27 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17A136-143	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit Alanin-Scan der Serine/Threonine über AS 136-143 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17A69-81	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit Alanin-Scan der Serine/Threonine über AS 69-81 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17AaII	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von MP17 mit Alanin-Scan der Serine/Threonine über AS 69-81 und AS 136-143 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17D71	$Spec^R$, $Strep^R$	MP17 AaII mit Asparaginsäure-Substitution von S71
MP17D79	$Spec^R$, $Strep^R$	MP17 AaII mit Asparaginsäure-Substitution von S79
MP17D7179	$Spec^R$, $Strep^R$	MP17 AaII mit Asparaginsäure-Substitution von S71 und S79
MP17Δ110-156D71	$Spec^R$, $Strep^R$	MP17 D71 mit Deletion der AS 110-156
MP17 K1	$Spec^R$, $Strep^R$	MP17 mit Arginin-Substitution von K76 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
MP17 K2	$Spec^R$, $Strep^R$	MP17 mit Arginin-Substitution von K132, K144, K151 und K154 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
ami*CHER1*_pFV3	Kan^R	*artificial micro* RNA *silencing* Konstrukt für *At3g15380* basierend auf pRS300 und der Sequenz “TATTGACAATCATTGAAGCCC“
GFP:CHER1	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von *At3g15380* amplifiziert von Col-0 mit N-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7WGF2
GFP:CHER1_G247E	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von *At3g15380* amplifiziert von der Mutante SO15A mit N-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7WGF2
CHER1:GFP	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von *At3g15380* amplifiziert von Col-0 mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2
CHER1 _G247E:GFP	$Spec^R$, $Strep^R$	Kodierende Sequenz von *At3g15380* amplifiziert von der Mutante SO15A mit C-terminaler GFP-Fusion im Vektor pK7FWG2

MP17-VENUS^{C}	Spec^{R}, Strep^{R}	Kodierende Sequenz von MP17 im Vektor pRB-35S-GW C-VENUS^{C155}
MP17-VENUS^{N}	Spec^{R}, Strep^{R}	Kodierende Sequenz von MP17 im Vektor pRB-35S-GW C-VENUS^{N173}
VENUS^{C}-MP17	Spec^{R}, Strep^{R}	Kodierende Sequenz von MP17 im Vektor pRB-35S-GW N-VENUS^{C155}
VENUS^{N} -MP17	Spec^{R}, Strep^{R}	Kodierende Sequenz von MP17 im Vektor pRB-35S-GW N-VENUS^{N173}
VENUS^{N}-CHER1	Spec^{R}, Strep^{R}	Kodierende Sequenz von CHER1 im Vektor pRB-35S-GW N-VENUS^{N173}
VENUS^{C}-CHER1	Spec^{R}, Strep^{R}	Kodierende Sequenz von CHER1 im Vektor pRB-35S-GW N-VENUS^{C155}
CHER1-VENUS^{N}	Spec^{R}, Strep^{R}	Kodierende Sequenz von CHER1 im Vektor pRB-35S-GW C-VENUS^{N173}
VENUS^{N}-CHER1_G247E	Spec^{R}, Strep^{R}	Kodierende Sequenz von CHER1_G247E im Vektor pRB-35S-GW N-VENUS^{N173}
VENUS^{C}-CHER1_G247E	Spec^{R}, Strep^{R}	Kodierende Sequenz von CHER1_G247E im Vektor pRB-35S-GW N-VENUS^{C155}
CHER1_G247E-VENUS^{N}	Spec^{R}, Strep^{R}	Kodierende Sequenz von CHER1_G247E im Vektor pRB-35S-GW C-VENUS^{N173}
HA:CHER1	Spec^{R}	Kodierende Sequenz von *At3g15380* amplifiziert von Col-0 mit N-terminalem 3-fach HA-*tag* im Vektor pGWB615
HA:CHER1_G247E	Spec^{R}	Kodierende Sequenz von *At3g15380* amplifiziert von der Mutante SO15A mit N-terminalem 3-fach HA-*tag* im Vektor pGWB615
CHER1:HA	Spec^{R}	Kodierende Sequenz von *At3g15380* amplifiziert von Col-0 mit C-terminalem 3-fach HA-*tag* im Vektor pGWB614
CHER1 _G247E:HA	Spec^{R}	Kodierende Sequenz von *At3g15380* amplifiziert von der Mutante SO15A mit C-terminalem 3-fach HA-*tag* im Vektor pGWB614

4.1.4 Bakterienstämme und Kultivierung

Stamm	Genotyp / Resistenz	Referenz / Hersteller
E. coli DH5α	F- Φ80*lac*ZΔM15 Δ*(lac*ZYA-*arg*F*)* U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17*(*r_k^-, m_k^+*)* *pho*A *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 λ	Invitrogen™
E. coli Top10	F- *mcrA Δ(mrr-hsd*RMS-*mcr*BC*)* Φ80*lac*ZΔM15 *Δ lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 *Δ(araleu)*7697 *gal*U *gal*K *rps*L (StrR) *end*A1 *nup*G	Invitrogen™, Karlsruhe
A. tumefaciens C58C1	Rif^{R} mit Helferplasmid pGV2260 (Amp^{R})	(Van Larebeke et al., 1974; Deblaere et al., 1985)

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37°C in LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt), die Kultivierung von *A. tumefaciens* bei 28°C in YNB-Medium (Hefeextrakt 10 g/l, Bacto-Pepton 10 g/l und NaCl 10 g/l). Antibiotika wurden mit Ausnahme von Rifampicin in Wasser gelöst und sterilfiltriert. Rifampicin wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und nicht sterilfiltriert. Die jeweiligen Antibiotika wurden den Medien nach dem Autoklavieren in entsprechender Konzentration hinzugefügt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Zur Selektion transgener Organismen verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml	50 µg/ml
Rifampicin (Rif)	50 mg/ml	50 µg/ml
Spectinomycin (Spec)	100 mg/ml	100 µg/ml
Streptomycin (Strep)	40 mg/ml	40 µg/ml

4.1.5 Pflanzenmaterial und Kultivierung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Arabidopsislinien sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die T-DNA Insertionslinie *cher1-4* (SALK_065853C) wurde vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* erhalten. Homozygote Pflanzen wurden über zwei PCR-Amplifikationen - der Primerkombination KL63 und KL64 zum Nachweis des Wildtypfragmentes und der Primerkombination KL64 und KL158 zum Nachweis der T-DNA Insertion - identifiziert.

Tabelle 14: Verwendete Arabidopsislinien

Linie	Ausgangslinie / Ökotyp	Konstrukt / Generierung	Referenz
Col-0	Wildtyp Columbia		Lehle Seeds (Round Rock, USA)
Ler	Wildtyp Landsberg *erecta*		Lehle Seeds (Round Rock, USA)
Col-16	Col-0	p35S-1	(Kronberg et al., 2007)
LerNM8S	Col-16xLer (acht Rückkreuzungen)	p35S-1	(Kronberg, 2008)
SO15A	Col-16	EMS	diese Arbeit
cher1-4	Col-0	SALK_065853C	(Analysis of the

			genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, 2000)
LNMSO15A	LerNM8S, SO15A	Kreuzung	diese Arbeit
Col-16xcher1-4	*cher1-4,* Col-16	Kreuzung	diese Arbeit
cher1-5	So15AxCol-0	Kreuzung	diese Arbeit
Col-16_ami*CHER1*	Col-16	ami*CHER1*_pFV3	diese Arbeit

Die Aufzucht von *Arabidopsis thaliana* erfolgte auf einem speziellen Bodensubstrat aus Typ P-Erde, Sand und Lavagrus im Verhältnis 7:2:1. Arabidopsissamen wurden auf Erde ausgesät und bei 4°C für 1-2 Tage stratifiziert, um die Keimung zu synchronisieren. Nach erfolgter Stratifikation wurden die Pflanzen für sechs Wochen unter Kurztagbedingungen (SD; 8 h Licht bei 22°C, 16 h Dunkelheit bei 19°C) und danach bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen (LD; 16 h Licht bei 22°C, 8 h Dunkelheit bei 19°C) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Percivals (CU-36L4, CLF PlantClimatics, Emersacker), in GroBanks (PlantMaster AGR2846 mit GroBanks, CLF PlantClimatics, Emersacker) oder im Gewächshaus.

Für die Keimlingsversuche und die Bestimmung des vertikalen Wurzelwachstums erfolgte die Anzucht von Arabidopsis auf *Murashige and Skoog* (MS)-Medium [0,443 % MSMO (w/v), Duchefa; (optional) 2 % (w/v) Saccharose; 0,05 % (w/v) MES; 0,8% (w/v) Phytagar; pH mit KOH auf 5.7 eingestellt]. Zu diesem Zweck wurden die Samen zunächst mittels Flüssigsterilisation Oberflächen-sterilisiert. Hierfür wurden die Samen für 5 min in einer Lösung aus 1 % Natriumhypochlorit und 0.05 % Tween 20 (v/v) gevortext und durch Zentrifugation für 30 sec sedimentiert. Nach drei Waschschritten mit sterilem Wasser wurden die Samen in 0,1 %-iger steriler Agarose aufgenommen und auf MS-Platten ausgebracht. Die Anzucht von Pflanzen auf MS-Medium erfolgte in der Lichtkammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit, circa 22°C, 60 % Luftfeuchtigkeit).

Tabakpflanzen (*Nicotiana benthamiana*) wurden auf Erde im Gewächshaus (16 h Licht bei 25°C, 8 h Dunkelheit bei 21°C; 250–300 µmol $m^{-2}s^{-1}$ Licht; 40 % relative Luftfeuchtigkeit) mit täglicher Bewässerung kultiviert.

4.2 Methoden

4.2.1 Pflanzentransformation

4.2.1.1 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation von Pflanzen erfolgte mittels *floral dip* (Clough und Bent, 1998). Hierfür wurden 250 ml YNB-Medium (10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Bacto-Pepton und 10 g/l NaCl) mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, mit 2 ml einer Agrobakterien-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 28°C kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei Raumtemperatur und 5000 xg geerntet, in Infiltrationsmedium [5,0 % Saccharose, 0,05 % Silwet (Lehle Seeds, Round Rock, USA)] resuspendiert und die optische Dichte bei 600 nm (OD600) auf 0,80 eingestellt. Anschließend wurde der Blütenstand der zu dippenden Pflanzen für 10-30 s in die Agrobakteriensuspension getaucht. Die gedippten Pflanzen wurden über Nacht mit einer Haube abgedeckt und bis zur Samenreife im Gewächshaus kultiviert. Zur Selektion der Transformanten wurden die geernteten Samen großflächig auf Erde ausgebracht. Im Alter von 1-2 Wochen wurden die Keimlinge insgesamt 3-4x mit 0,1 % BASTA-Lösung (Bayer, http://www.bayer cropscience.com) im Abstand von 3-4 Tagen besprüht.

4.2.1.2 Transiente Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die transiente Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte mittels *particle gun* Beschuss mit Hilfe des PDS-1000/He™ (Bio-Rad Laboratories GmbH) Systems nach den Anweisungen des Herstellers. Ein bis zwei Tage nach der Infiltration wurde die Lokalisierung der Fusionsproteine über konfokale Laserscanning Mikroskopie (KLSM) analysiert.

4.2.1.3 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Zur transienten Expression von Proteinen in *N. benthamiana* wurde die Agrobakterien-vermittelte Transformation eingesetzt. Hierfür wurden Agrobakterien in 50 ml YNB-Übernachtkulturen mit den entsprechenden Antibiotika, denen 500 µl 1 M MES (pH von 5,6 mit KOH) und 10 µl 100 mM Acetosyringon (in DMSO) zugefügt wurden, kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 xg für 15 min bei Raumtemperatur geerntet und in Infiltrationspuffer [10 mM $MgCl_2$, 10 mM MES pH 5,6 und 100 µM Acetosyringon] resuspendiert, wobei die optische Dichte bei 600 nm (OD600) im Normalfall auf 1,0 eingestellt wurde. Alternativ dazu wurden Agrobakterien in 50 ml YNB-Übernachtkulturen

mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert und nach der Zentrifugation in Wasser resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in die abaxiale Blattseite von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mit Hilfe einer nadellosen 1 ml-Spritze infiltriert. Zwei bis drei Tage nach der Infiltration wurde die Lokalisierung der Fusionsproteine über KLSM analysiert.

4.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Grundlegende Techniken der Nukleinsäuremanipulation wie beispielsweise Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen, Verknüpfen von DNA mit Hilfe von Ligasen, Reinigung von DNA-Fragmenten, Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren, Anzucht von *E. coli*, Transformation von *E. coli* sowie Präparation von Plasmiden wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.
Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das QiaQuick® PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet und die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel erfolgte durch das QiaQuick®Gel Extraction Kit. Einige Konstrukte in dieser Arbeit wurden mit Hilfe der pENTR/D-TOPO®-Klonierung (Invitrogen™) angefertigt. Dabei wurde nach Protokoll des Herstellers vorgegangen.

4.2.3 Extraktion und Analyse von Nukleinsäuren

4.2.3.1 Extraktion genomischer DNA aus Blattmaterial

Für analytische Nachweise, wie etwa PCR-Analysen, wurden gefrorene Blattscheiben mit Hilfe des Qiagen Tissue Lyser 2 Systems homogenisiert. Für die Extraktion der genomischen DNA wurde die Methode von Edwards et al. (1991) modifiziert. Das pulverisierte Blattmaterial wurde mit 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris pH 8,0; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8,0 und 0,5 % SDS) versetzt und anschließend für eine Minute homogenisiert. Nach dem Abtrennen unlöslicher Bestandteile wurde die DNA mit 1 Volumen Isopropanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in 50 µl TE-Puffer gelöst. Die Isolierung genomischer DNA für *next generation sequencing* erfolgte wie bereits beschrieben (Aitchitt et al., 1993), außer dass der Waschschritt mit 70 % Ethanol 3x wiederholt wurde und das Pellet direkt in MQ + RNase (100 µg/ml) resuspendiert wurde. Für die DNA-Isolierung wurde Blattmaterial der Linien LNMSO15A F2 #125 und #387 gepoolt.

4.2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen und Analyse der Transkriptlevel

Die Extraktion vom Gesamt-RNA aus Pflanzen erfolgte nach der Methode von Logemann et al. (1987). Die Konzentration der RNA wurde an einem ND-1000 Spectrophotometer (NanoDropTechnologies) bestimmt.

Der Nachweis von mRNA erfolgte zum einen mittels Northern Blot Analyse, welche auf der Hybridisierung von mRNA auf einer Membran und dem spezifischen Nachweis mit einer [α-^{32}P]-markierten Sonde basiert. Dazu wurde die RNA mit 10 % Formaldehyd, 1 x MEN (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0), 40 % Formamid, 1 µl 1 % Ethidiumbromid und 1 x Auftragspuffer (6 % Glycerin, 10 mM EDTA pH 8,0 und 0,025 % der Farbstoffe Bromphenolblau sowie Xylen Cyanol) versetzt und auf einem 1,5 % Agarosegel mit 1 x MEN und 16,75 % Formaldehyd aufgetrennt. Anschließend wurde die RNA für 20 h über Nacht in 20 x SSC (3 M NaCl und 0,3 M Natriumcitrat) auf eine Nylonmembran geblottet. Zur Quervernetzung wurde die Membran zweimal mit 120 µJ im UV-Crosslinker (Vilber Lourmat, Eberhardzell) bestrahlt. Nach dem Trocknen der Membran wurde diese bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Für die Northern Blot Analyse wurde die Membran bei 65°C für mindestens eine Stunde in Church Puffer (7 % SDS, 0,5 % BSA, 1 mM EDTA und 0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2) vorhybridisiert. Die Hybridisierung mit einer [α-^{32}P] radioaktiv markierten DNA Sonde (mittels High Prime Mix von Roche) über Nacht erfolgte nach Herstellerangaben. Unspezifisch gebundene Sonde wurde mit Waschpuffer (6 x SSC, 0,1 % SDS) reduziert. Im Folgenden wurde ein Kodak Biomax XAR Röntgenfilm aufgelegt und bei -80°C exponiert. Die Entwicklung des Films erfolgte mit dem Protec Optimax Entwicklersystem.

Zum anderen erfolgte die Analyse der Transkriptmenge über semiquantitative RT-PCR. Die isolierte Gesamt-RNA wurde zunächst entsprechend den Herstellerangaben mit DNaseI (Fermentas) behandelt, um mögliche DNA-Kontaminationen zu eliminieren. Die verdaute RNA wurde in die cDNA-Synthese unter Verwendung der RevertAidTM H Minus M-MuLV Reversen Transkriptase sowie Oligo(dT)Oligonukleotiden laut Herstellerangaben eingesetzt (http://www.fermentas.com, Fermentas). Die PCR-Amplifikation von *Actin1* (*At2g37620*) unter Verwendung der Primer KL8 und KL9 wurde als Qualitätskontrolle für die cDNA verwendet. *CHER1* Transkriptmengen wurden mittels RT-PCR unter Verwendung der Primer KL101 (Vorwärtsprimer) und KL157 (Rückwärtsprimer; überspannt Exon 6 und 7), welche ein 472 bp-Fragment ergeben, überprüft.

4.2.3.3 Transkriptomanalyse

Für die Transkriptomanalyse wurden jeweils vier biologische Replikate der Linien Col-0, *cher1-4* und *cher1-5* verwendet, wobei Blätter von fünf bis sechs Pflanzen für ein

biologisches Replikat gepoolt wurden. Nach der Probennahme wurde das Blattmaterial bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Hybridisierung des Mikroarray erfolgte wie bereits beschrieben (Prasch und Sonnewald, 2013). Nach dem Import der Textfiles mit Hilfe der *Feature Extraction Software* (Version 12.5.1; Agilent Technologies) in GENESPRING XII (AgilentTechnolgies), wurden die Mikroarraydaten zur Basis 2 logarithmiert, zum 75. Perzentil normalisiert und zum Median aller Proben korrigiert. Nach Verwendung des hierarchischen Cluster-Algorithmus und der *Pearson uncentered* Korrelation in GENESPRING XII gruppierten die Daten in zwei Hauptgruppen, zum einen die Wildtypproben und zum anderen die Proben der beiden CHER1-Mutanten. Die Identifizierung differentiell regulierter Gene zwischen *cher1-4*, *cher1-5* und Col-0 mit einer Expressionsänderung ≥ 2.0 und $p \leq 0.05$ erfolgte mit Hilfe des *T-test unpaired* und der Benjamini-Hochberg multiplen Testkorrektur (Benjamini und Hochberg, 1995). Durch das Erstellen eines Venn Diagramms aus den 1540 deregulierten Features für *cher1-5* und den 1314 deregulierten Features für *cher1-4* konnten insgesamt 960 Features ermittelt werden, die in beiden CHER1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Col-0 differentiell reguliert waren (siehe Anhang Tabelle 23). Von diesen waren 240 Features hochreguliert und 720 Features herunterreguliert und konnten 200, bzw. 613 Gen-Loci zugeordnet werden. Die funktionelle Charakterisierung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Prasch und Sonnewald, 2013). Die Arraydaten dieser Arbeit sind in der *National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database* unter der Accession-Nummer GSE61595 hinterlegt.

4.2.4 Mutantenscreening und Marker-gestützte Kartierung

Samen der *MP17:GFP* exprimierenden Arabidopsislinie Col-16 wurden bereits in Vorarbeiten einer EMS-Mutagenese unterzogen (Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA). In der vorliegenden Arbeit wurden 3840 Pflanzen der M2-Generation nach Mutanten mit einer veränderten MP17-Lokalisation in Sourceblättern und seneszenten Blättern durchmustert. Hierfür wurden zunächst die vorliegenden Samen der M2-Generation der 24 verschiedenen Parentallinien und der Kontrollen Col-0, Col-16 sowie Col-9 und Col-14, die im Vergleich zu Col-16 weniger *MP17:GFP* exprimieren, auf Erde ausgesät (Kronberg et al., 2007). Nach einer Stratifikation für drei Tage bei 4°C wurden die ausgesäten Samen in Kurztagbedingungen überführt und im Alter von 14 Tagen in 40 Multiflorplatten à 104 Töpfchen pikiert. Dabei wurde jede Multiflorplatte mit drei Col-0, drei Col-16 sowie einem Col-9 und einem Col-14 Keimling bestückt, wodurch pro Parentalgruppe 160

Pflanzen analysiert werden konnten. Die weitere Anzucht der Pflanzen bis zum Abschluss der konfokalen Analysen erfolgte unter Kurztagbedingungen.
Die Marker-gestützte Kartierung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Vogel et al., 2011). Die hierfür verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 18 und Tabelle 19 aufgeführt. Die PCR-Amplifikation der verwendeten SSLP-Marker erfolgte überwiegend mit einer Annealingtemperatur von 55°C und 40 Zyklen. Dazu wurde entweder eine selbst hergestellte, rekombinante Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (Puffer: 10 mM KCl, 20 mM Tris/HCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $MgSO_4$, 0,1 % Triton X-100, pH 8,8) oder Taq-Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA; Puffer: 10 mM KCl, 20 mM Tris/HCl, 16 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $MgSO_4$, 0,1 % Tween 20, pH 8,5) verwendet. Für CAPS-Marker wurden die PCR-Fragmente mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (2 Units Enzym pro 20 µl PCR-Reaktion) für 90 min verdaut. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden schließlich auf 2,5 %-igen TBE-Agarosegelen aufgetrennt. Um eine eindeutige Unterscheidung der Ökotyp-spezifischen Allele/Restriktionsmuster zu gewährleisten, wurde die DNA von beiden Wildtypen und heterozygoten Pflanzen stets als Kontrollen mitgeführt.

4.2.5 *Next generation sequencing*

Nach dem Scheren von 1000 ng genomischer DNA mittels Ultraschall erfolgte die Präparation der Library unter Verwendung des SPRIworks System III for Life Technologies SOLiD System. Für die Bead-Präparation wurde das EZbead System von Life Technologies nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Anschließend wurde die *library* mit Hilfe des SOLiD Systems (Life Technologies) sequenziert, wodurch 94,156,791 *color space fragment reads* von 50 bp Länge generiert wurden. Das Mapping zum Tair10 Referenzgenom unter Verwendung des LifeScope Softwarepakets (Version 2.1) ergab eine durchschnittliche Sequenzabdeckung von 5,53. Die Varianten-Detektion mit Hilfe von diBayes und LifeScope small-indel brachte 129,784 SNPs und 16,069 small indels zum Vorschein. Die *next generation sequencing* Daten dieser Arbeit sind im *National Center for Biotechnology Sequence Read Archive* unter der Accessionnummer SRX708557 hinterlegt.

4.2.6 Generation von *CHER1* amiRNA Pflanzen

Die *artificial micro* RNA (amiRNA) für CHER1 wurde unter Verwendung des Internettools Web MicroRNA Designer WMD3 (http://wmd3.weigelworld.org/cgibin/webapp.cgi) (Schwab et al., 2006) erstellt. Aus der Liste der vorgeschlagenen amiRNA-Sequenzen

wurde die amiRNA-Sequenz „TATTGACAATCATTGAAGCCC“ ausgewählt. Entsprechend dem veröffentlichten Protokoll auf der Webseite wurde das amiRNA Backbone des Vektors pRS300 (MIR319a *Arabidopsis thaliana*) unter Verwendung der über den Oligo-Designer generierten Primer modifiziert, um amiRNA*CHER1* zu generieren. Nach einer Zwischen-klonierung des PCR-Produktes d) in den Vektor pCRBlunt und Überprüfung mittels Sequenzierung wurde die amiRNA*CHER1*-Kassette über die Restriktionsschnittstellen XbaI und XhoI in den Zielvektor pFV3, bzw. pAF16 (Stadler et al., 2005), einem von pGPTV-BAR abgeleiteten Vektor für die Überexpression in Pflanzen, der einen 35S-Promotor sowie eine BASTA-Resistenzkassette beinhaltet, kloniert (Becker et al., 1992). Das erhaltene amiRNA*CHER1*-Konstrukt wurde in Agrobakterien transformiert und diese für die stabile Transformation von Col-0 und Col-16 Pflanzen eingesetzt.

4.2.7 Komplementation der CHER1-Mutanten

Für die Kompelementation der CHER1-Mutanten wurden folgende Konstrukte un Agrobakterien transformiert und über *floral dip* die Mutanten SO15A und *cher1-4* transformiert.

Tabelle 15: Für die Komplementation verwendete Konstrukte

Linie	Konstrukt
cher1-4	CHER1:GFP GFP:CHER1 CHER1:HA HA:CHER1
cher1-5	CHER1:GFP GFP:CHER1
SO15A	CHER1:HA HA:CHER1

4.2.8 Western Blot Analyse

Der Nachweis von Proteinen erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Für die Analyse von Gesamtproteinextrakten aus Pflanzen wurden jeweils zwei Blattscheiben gleicher Blattfläche (0,64 cm²) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Hilfe des Qiagen Tissue Lyser II homogenisiert. Das pulverisierte Blattmaterial wurde mit 2x Laemmli Probenpuffer [125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 20 mM DTT; 20 % (v/v) Glycerin; 4 %

(w/v) SDS; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt und durch Vortexen homogenisiert. Nach Abkochen für 10 min bei 95°C wurden die Zelltrümmer kurz pelletiert und der Überstand wurde auf ein 12,5 %-iges (v/v) SDS-Polyacrylamid Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde die Membran in Transferpuffer [39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,0375 % SDS, 20 % Methanol, pH 8,2 (HCl)] äquilibriert und bei 1 mA/cm^2 für 1,5 h auf eine Nitrocellulosemembran (Porablot, Macherey-Nagel, Düren) transferiert. Anschließend wurde die Membran in Blockierlösung - bestehend aus 5 % Milchpulver (w/v) gelöst in TBS/T (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,1 % (w/w) Tween 20) - für mindestens 1 h blockiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBS/T wurde diese über Nacht mit anti-MP17-Antiserum [1:5000], anti-GFP-Antiserum [1:1000] oder anti-Transketolase-Antiserum [1:4000] (jeweils verdünnt in TBS/T mit 1 % (w/v) Milchpulver) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran nach drei 5-minütigen Waschschritten für 2 h mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären Antikörper [1:20000 verdünnt in TBS/T mit 1 % (w/v) Milchpulver)] inkubiert. Nach erneuten Waschschritten für jeweils 5 min wurde die Membran mit 6 µl 35 % H_2O_2 (gelöst in 0,1 M Tris/HCl pH 8,5) und 144 µl eines Coumarin-Luminol Gemischs (gelöst in 0,1 M Tris/HCl pH 8,5) für 1 min inkubiert und antikörperspezifische Signale durch Auflegen und Entwickeln eines Kodak Biomax XAR Röntgenfilms detektiert.

4.2.9 Physiologische Analysen und Zuckermessung

Für die physiologischen Analysen wurden die Pflanzen für sieben Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert. Blattanzahl und Rosettenfrischgewicht wurden für je fünf biologische Replikate pro Linie bestimmt. Um das reproduktive Wachstum zu bestimmen, wurden Pflanzen für sechs Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert und dann in Langtagbedingungen transferiert. Zur Analyse der Blühinduktion wurde pro Linie für sechs biologische Replikate der Tag der ersten geöffneten Blüte nach dem Transfer bestimmt. Für die Ermittlung des vertikalen Wurzelwachstums wurden die Arabidopsis-Keimlinge auf 50 ml MS-Medium ohne Saccharose in quadratischen Petrischalen angezogen. Um Positionseffekte bei der Bestimmung des vertikalen Wurzelwachstums zu vermeiden, wurden je 6-8 Samen pro Linie in alternierenden Gruppen ausgebracht. Im Anschluss an eine zweitägige Stratifikation dunkel bei 4°C wurden die Platten in der Lichtkammer senkrecht in einem Winkel von etwa 4° positioniert und das Wurzelwachstum nach 5 und nach 14 Tagen unter konstanten Lichtbedingungen bestimmt.

Für Zucker- und Stärkemessungen wurden Blattproben von je fünf Individuen (Pflanzenalter: 5-6 Wochen), d.h. biologischen Replikaten, pro Linie und je zwei

technischen Replikaten pro Pflanze von gegenüberliegenden Blättern geerntet. Die Blattscheiben wurden in 250 µl 80 % (v/v) Ethanol bei 80°C für 1-2 h extrahiert, auf 4°C abgekühlt und bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für 2-3 h in der Speed-vac eingedampft und für die Extraktion der löslichen Zucker (Glukose, Fruktose und Saccharose) verwendet, während das Pellet für die Stärkeextraktion eingesetzt wurde. Die Bestimmung der Gehalte an löslichen Zuckern und Stärke erfolgte mittels eines enzymatisch-gekoppelten Assays in Mikrotiterplatten wie bereits von Voll et al. (2003) beschrieben.

4.2.10 Keimlingsversuche

Für die Keimlingsversuche wurden Col-16 Samen zunächst flüssigsterilisiert und dann auf MS-Platten mit dem jeweiligen Inhibitor ausgebracht. Als Kontrolle dienten Keimlinge, die auf MS-Platten ohne Inhibitor kultiviert wurden. Zur Inhibierung der Brassinosteroid-Biosynthese wurde die Triazol-Verbindung Propiconazol (Pcz, Fluka) in einer Konzentration von 2 µM (Hartwig et al., 2012) eingesetzt und die Keimlinge nach zehn Tagen mittels KLSM analysiert. Als Inhibitor der Sterolsynthese wurde Fenpropimorph (FEN, Fluka) in einer Konzentration von 1 µM verwendet (Schrick et al., 2004). Nach 19 Tagen wurden Kotyledonen und Sinkblätter der Keimlinge mittels KLSM analysiert. Da Sourceblätter durch den Einfluss des Inhibitors stark verkümmert waren, wurden für die Analyse der Sourceblätter Keimlinge von Kontrollplatten ohne FEN im Alter von 23 Tagen auf MS-Platten mit Inhibitor umgesetzt und nach weiteren zwei Wochen die Sourceblätter mittels KLSM untersucht.

4.2.11 Messung des Cholingehaltes und der Phospholipide

Für jede Linie wurden drei bis fünf biologische Replikate mit jeweils 50 mg Blattmaterial verwendet, wobei Blätter von fünf bis sechs Pflanzen für ein biologisches Replikat gepoolt wurden. Das Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem vorgekühlten Mörser pulverisiert.

Cholin wurde mit 1,2 ml eines MeOH:$CHCl_3$:H_2O-Gemisches (Verhältnis 6:2:2) extrahiert (Patell Villoo et al., 2010). Das Homogenisat wurde für 10 min auf Eis inkubiert, mit 0,9 ml H_2O gemischt und anschließend zur Phasenvergrößerung mit 0,1 ml $CHCl_3$ versehen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 1 min bei 14000 xg wurde die obere Phase abgenommen und aufbewahrt. Die untere Phase wurde mit 0,7 ml des Extraktionspuffers

reextrahiert. 600 µl der beiden vereinigten oberen Phasen wurden über einen 10 kDa Spinfilter gereinigt und bis zur Messung bei -80°C gelagert.
Phospholipide wurden nach der Methode von Bligh und Dyer (1959) und BeGora et al. (2010) extrahiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 200 µl eines Isopropanol: Hexan:NH_4FA-Gemisches (Verhältnis 58:40:2) resuspendiert. Die MS-Analyse erfolgte mit einem ICS3000 HPLC System (Dionex) und einem QTrap 3200 (ABI Sciex) Massenspektrometer und der jeweiligen dazugehörigen Software Chromeleon 6.8, bzw. Analyst 1.4.2. Für die Chromatographie wurden 10 µl der Extrakte durch den Autosampler bei 4°C auf eine Acclaim HILIC-1 Mix-Modus-Trennsäule (*mix mode separating column*, 3 µm, 2,1 x 150 mm, Dionex) mit einer Acclaim HILIC-1 Vorsäulenkartusche (*guard column cartridge,* 5 µm, 2 x 10 mm) geladen (Grumbach et al., 2004).

Für Cholin wurde die Durchflussgeschwindigkeit auf 0,25 ml/min bei einer Säulentemperatur von 30°C eingestellt. Es wurde ein binärer Gradient mit Eluent A (Acetonitril) und Eluent B H_20 (pH 3,0 mit Ameisensäure) für 30 min wie folgt angewendet: 0-7 min 40 % B; 7-13 min 80 % B; 13-17 min 95 % B; 17-19 min 5 % B; 19-23 min 5 % B; 23-30 min 40 % B. Nach jeder Probe wurde zur Säulenreinigung eine Leerprobe mit dem gleichen Gradienten gefahren. Für ESI/MS/MS wurden +5,5 kV und eine Quellentemperatur von 500ºC angewendet. Die Gasquellen waren 10 psi (Gas-Gegenstrom, *curtain*), 40 psi (Gas1) und 45 psi (Gas2). Das Interphasenheizgerät war an. Die *dwell time* betrug 75 ms. Die detektierten Q1/Q3 Massenübergänge sowie die stoffspezifischen MS-Potentiale sind in Tabelle 22 im Anhang aufgeführt. Peakflächen wurden mittels der Kurven des reinen Cholinstandards (Sigma) zwischen 0,1 und 10 µM bestimmt. Recoveryraten, welche mittels *spiking* mit Standardlösungen bestimmt wurden, betrugen 92,5 +/- 16,0 % für Cholin und 111 +/- 26 % für Acetylcholin.
Für die Messung der Phospholipide betrug die Durchflussgeschwindigkeit 0,3 ml/min bei einer Säulentemperatur von 30°C. Es wurde ein ternärer Gradient für 35 min mit Eluent A (2-Propanol), Eluent B (Hexan) und Eluent C (100 mM Ammoniumformiat) sowie einem normalen Phasemodus wie folgt angewendet: 0-2 min 40 % B und 2 % C; 2-15 min 40 % B und 7 % C; 15-18 min 40 % B und 10 % C; 18-21 min 40 % B und 2 % C; 21-35 min 40 % B und 2 % C. Die Parameter der Ionenquelle waren +5,5 kV bei 400ºC mit einem Gas-Gegenstrom (*curtain gas*) von 10 psi, Gas 1 bei 35 psi und Gas 2 bei 40 psi. Das Interphasenheizgerät war an. Stoffspezifische Parameter sind in Tabelle 22 aufgeführt. Für die Feinabstimmung und die Standardlösungen wurden die in Tabelle 22 im Anhang aufgelisteten Phospholipidklassen (Sigma, aus Eigelb) in Methanol/Chloroform (1:1) gelöst (Konzentration 10-100 ng/µl). Standards repräsentieren Gemische der verschiedenen Phospholipide der jeweiligen Klasse.

4.2.12 Membranisolierung und Extraktion von Fettsäuren

Zur Isolierung von Plasmamembranen wurde eine Methode nach Alexanderson et al. (2004) modifiziert. Zur Bestimmung der darin enthaltenen Fettsäuren nach Umesterung zu Fettsäuremethylestern (FAMES) wurde die Methode nach Moon et al. (2000) verwendet. Jeweils 500 mg Blattmaterial von acht Wochen alten Pflanzen wurde in vorgekühlten Mörsern mit 6 ml Homogenisationspuffer [330 mM Saccharose; 50 mM MOPS-KOH pH7,5; 5 mM Ascorbat, 5 mM DTT] aufgeschlossen. Zellwände und Fragmente wurden anschließend in einem 15 ml Sarstedtröhrchen für 1 min bei 2000 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde in 15 ml Corex Gläser überführt und weitere 5 min bei 15000 xg zentrifugiert. Das dunkelgrüne, glasige Pellet (*low spin* Pellet, enthält Organellen) wurde in 2 ml Methanol/2 % H_2SO_4 aufgenommen, in 10 ml Glasröhrchen überführt und auf ca. 0,5 ml im Heizblock bei 80ºC und leicht geöffneten Deckeln eingeengt. Durch die saure Katalyse wurde in freie Fettsäuremethylester (FAMES) umgeestert. FAMES wurden dann mit 1,5 ml/0,01 % BHT (Antioxidans: Butyliertes Hydroxytoluen) durch kräftiges Vortexen extrahiert. Zur Gewinnung der Membranfraktion wurde der Überstand des *low spin* Pellets in Polycarbonat-Röhrchen überführt und 1 h bei 100000 xg zentrifugiert. Die Fettsäuren dieses *high spin* Pellets (Membranfraktion; glasig, zart grün) wurden dann wie oben umgeestert. Die oberen Hexanphasen wurden nach Zentrifugation für 3 min bei 2000 rpm abgehoben und in 2 ml Autosamplervials mit Teflondeckel überführt. Die Extrakte aus dem *low spin* Pellet wurden zudem noch 1:1 mit Hexan/BHT verdünnt. Je 1 µl der Präparationen wurde für die GC/MS Analyse verwendet. Hierfür wurde ein Probenvolumen von 1 µl mit einer *split ratio* von 2:1 eingespritzt. Die GC/MS Anlage (Shimadzu, Duisburg) bestand aus einem GC-2010 Gaschromatografen, einem GC/MS-QP2010S Quadrupol-Massen-Spektrometer und einem AOC-20s Autosampler mit AOC-20i Autoinjektor. Als Trägergas wurde Helium (He 5.0) verwendet. Die GC wurde mit einer 30 m Famewax GC-Säule mit 0,25 mm Innendurchmesser und einer Filmdicke von 0,25 µm durchgeführt (Restek Int., Homburg). Die Injektionstemperatur war 220ºC, das Interface hatte 230ºC und die Ionenquelle 200ºC. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,13 ml/min verwendet. Die Temperaturen des GC-Ofens waren 130ºC für 6 min gefolgt von einem Temperaturgradienten auf 225ºC in 16 min. 225ºC wurden für weitere 10 min gehalten. Anschließend wurde die Säule für 1 min wieder auf die Starttemperatur äquilibriert. Massenspektren wurden mit 2 Scans pro Sekunde und einem Fenster von M/Z 35-350 aufgezeichnet. Zur Messung im *single ion modus* (SIM) wurden die Spektren der Standardsubstanzen ermittelt und repräsentative Massen-Fragmente ausgewählt. Massenspuren wurden mit einer Rate von 5 Scans pro Sekunde in drei Zeitfenstern aufgezeichnet. 10,22 min-11,44 min und 11,44 min-12,89 min: m/z 74,0,

87,0, 43,0, 41,0, 55,0,: 12,89 min-14,99 min: m/z 74,0, 87,0, 43,0, 41,0, 75,0, 55,0, 69,0, 67,0, 81,0, 95,0. Chromatogramme und Massenspektren wurden mit dem Programm GCMS Solutions (Shimadzu) ausgewertet. Die Software verfügte über eine Spektren-Datenbank zur automatischen Erkennung von Fettsäuren. Zur Bestimmung der Retentionszeiten der Fettsäuren wurden zunächst käufliche Fettsäuremethylesther analysiert. Anschließend wurden Realproben im Fullscan und SIM-Modus analysiert.

4.2.13 Plasmidkonstruktion für Lokalisierungsstudien

MP17-Deletionsvarianten wurden durch entsprechende Primerwahl innerhalb der MP17-Sequenz generiert. Die verschiedenen Mutationen der Phosphorylierungsstellen sowie der Lysine wurden durch Overlap-PCR mit spezifischen Primer (siehe Anhang Tabelle 17) eingebracht. Für die Lokalisierung von CHER1 wurde die kodierende Sequenz von *At3g15380* mittels PCR amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden in den Entryvektor pENTR-D/TOPO nach den Anweisungen des Herstellers (Invitrogen) kloniert und anschließend in die binären Gateway Destinationsvektoren pK7FWG2 und pK7WGF2 (Karimi et al., 2002) für C-, bzw. N-terminale GFP-Fusionen unter Verwendung der LR-Clonase (Invitrogen) rekombiniert. Die fertigen Konstrukte wurden in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm C58C1 transformiert, welcher das Virulenzplasmid pGV2260 beinhaltet. Anschließend wurden die transformierten Agrobakterien für die transiente Expression der Fusionsproteine in 4–6 Wochen alte *Nicotiana benthamiana* Pflanzen eingesetzt.

4.2.14 BIFC-Analysen

Für die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation wurden folgende Kombination in *Nicotiana benthamiana* koinfiltriert:

Tabelle 16: Verwendete Konstrukt-Kombinationen für die BIFC-Analysen

BIFC1	BIFC2
$VENUS^{N}$-CHER1	MP17-$VENUS^{C}$ $VENUS^{C}$-MP17
$VENUS^{C}$-CHER1	MP17-$VENUS^{N}$
$VENUS^{N}$-CHER1_G247E	MP17-$VENUS^{C}$ $VENUS^{C}$-MP17
$VENUS^{C}$-CHER1_G247E	MP17-$VENUS^{N}$

XopJ-VENUS^{N}	RPT6-VENUS^{C}
C-VENUS^{N}	VENUS^{C}-MP17

4.2.15 KLSM-Analysen

Zwei bis drei Tage nach der Infiltration wurde die Lokalisierung der Fusionsproteine über konfokale Laserscanning Mikroskopie (KLSM) unter Verwendung eines Leica TCS SP5 II-Mikroskops (Leica Microsystems; Bensheim, Germany) analysiert. Zur Visualisierung der Zellwände - und in kaputten Zellen auch der Zellkerne - wurden die Blattstücke für etwa 5 min in Propidiumiodidlösung (1 mg/ml in H_2O; Sigma-Aldrich) gefärbt und 4x mit Wasser gewaschen. Initiale Analysen wurden an einem Leica MZ16F Stereomikroskop durchgeführt. Für konfokale Mikroskopieaufnahmen wurde die abaxiale Blattseite der Blattstücke von Arabidopsis und *N. benthamiana* gescannt. GFP und Propidiumiodid wurden mit einem 20 mW Argonlaser bei 488 nm angeregt. Die Emission wurde für GFP bei 497-526 nm, für Propidiumiodid bei 598-650 nm und für die Autofluoreszenz von Chlorophyll im Bereich von 682-730 nm detektiert. Konfokale Aufnahmen für einen Vergleich der GFP-Fluoreszenz zwischen zwei Linien wurden sofern nicht anders angegeben mit gleichen Einstellungen für Anregung und Detektion aufgenommen.
KLSM-Aufnahmen für GFP:CHER1 Fusionen sind Maximumprojektionen von *image stacks*, wobei Bilder durch die Leica Confocal Software 2.5 überlagert wurden. Alle weiteren konfokalen Aufnahmen sind Einzelaufnahmen.

4.2.16 Alignment luteoviraler Movementproteine

Proteinsequenzen der zu MP17 homologen luteoviralen Movementproteine wurden mittels “ClustalW2”1 aligned. Accessionnummern: AAB70926.1 (*Barley yellow dwarf virus,* AAF62534.1 (*Cereal yellow dwarf virus*), AAK49962.1 (*Beet chlorosis virus*), AAM22679.1 (*Beet western yellows virus*), AAZ57428.1 (*Beet mild yellowing virus*), AAX08105.1 (*Cotton leaf roll dwarf virus*), ACA04435.1 (*Soybean dwarf virus*), ABG46340.1 (*Sweet potato leaf speckling virus*).

4.2.17 Alignment und phylogenetischer Baum der Mitglieder der Cholintransporterfamilie

Das Alignment der Proteinsequenzen der Mitglieder der Cholintransporterfamilie aus *Arabidopsis thaliana* und das Erstellen des phylogenetischen Baums erfolgte unter

Verwendung von Geneious Pro 5.6.3 (http://www.geneious.com, Kearse et al., 2012). Genetic Distance Model: Jukes-Cantor. Tree build Method: Neighbor-Joining. Outgroup: No Outgroup. Accessionnummern: Q9S7M7 (At3g03700.1), Q9M843 (At3g04440.1), Q9FN70 (At5g17830.1), F4K425 (At5g13760.1), F4ICI7 (At1g25500.1), Q94AN2 (At3g15380.1), Q93YN6 (At4g38640.1).

Literaturverzeichnis

Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. Science **309:** 1052-1056

Agbeci M, Grangeon R, Nelson RS, Zheng H, Laliberte JF (2013) Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of *Turnip mosaic virus*. PLoS Pathog **9:** e1003683

Aitchitt M, Ainsworth CC, Thangavelu M (1993) A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the data palm (*Phoenix dactylifera* L.). Plant Molecular Biology Reporter **11:** 317-319

Alexandersson E, Saalbach G, Larsson C, Kjellbom P (2004) *Arabidopsis* plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. Plant and Cell Physiology **45:** 1543-1556

Altmann T (1998) Recent advances in brassinosteroid molecular genetics. Current opinion in plant biology **1:** 378-383

Alzhanova DV, Napuli AJ, Creamer R, Dolja VV (2001) Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. The EMBO journal **20:** 6997-7007

Amari K, Boutant E, Hofmann C, Schmitt-Keichinger C, Fernandez-Calvino L, Didier P, Lerich A, Mutterer J, Thomas CL, Heinlein M, Mely Y, Maule AJ, Ritzenthaler C (2010) A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. PLoS Pathog **6:** e1001119

Amari K, Lerich A, Schmitt-Keichinger C, Dolja VV, Ritzenthaler C (2011) Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors. PLoS Pathog **7:** e1002327

Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. (2000) Nature **408:** 796-815

Andersson MX, Kourtchenko O, Dangl JL, Mackey D, Ellerström M (2006) Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal **47:** 947-959

Angell SM, Davies C, Baulcombe DC (1996) Cell-to-cell movement of *Potato virus X* is associated with a change in the size-exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana clevelandii*. Virology **216:** 197-201

Anthony RG, Henriques R, Helfer A, Meszaros T, Rios G, Testerink C, Munnik T, Deak M, Koncz C, Bogre L (2004) A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. Embo Journal **23:** 572-581

Aoki K, Kragler F, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ (2002) A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. Proc Natl Acad Sci U S A **99:** 16342-16347

Apparsundaram S, Ferguson SM, George AL, Jr., Blakely RD (2000) Molecular cloning of a human, hemicholinium-3-sensitive choline transporter. Biochem Biophys Res Commun **276:** 862-867

Arisz SA, Testerink C, Munnik T (2009) Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. Biochim Biophys Acta **1791:** 869-875

Ashby J, Boutant E, Seemanpillai M, Sambade A, Ritzenthaler C, Heinlein M (2006) *Tobacco mosaic virus* movement protein functions as a structural microtubule-associated protein. J Virol **80:** 8329-8344

Avisar D, Prokhnevsky AI, Dolja VV (2008) Class VIII myosins are required for plasmodesmatal localization of a closterovirus Hsp70 homolog. J Virol **82:** 2836-2843

Badelt K, White R, Overall R, Vesk M (1994) Ultrastructural specializations of the cell wall sleeve around plasmodesmata. American Journal of Botany**:** 1422-1427

Baluška F, Curckova F, Kendrick-Jones J, Volkmann D (2001) Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength? Plant Physiology **126:** 39-46

Baluška F, Šamaj J, Napier R, Volkmann D (1999) Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. The Plant Journal **19:** 481-488

Baron CL, Malhotra V (2002) Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. Science **295:** 325-328

Barratt DP, Kölling K, Graf A, Pike M, Calder G, Findlay K, Zeeman SC, Smith AM (2011) Callose synthase GSL7 is necessary for normal phloem transport and inflorescence growth in Arabidopsis. Plant Physiol **155:** 328-341

Baudouin E, Meskiene I, Hirt H (1999) Unsaturated fatty acids inhibit MP2C, a protein phosphatase 2C involved in the wound-induced MAP kinase pathway regulation. The Plant Journal **20:** 343-348

Bayer EM, Bottrill AR, Walshaw J, Vigouroux M, Naldrett MJ, Thomas CL, Maule AJ (2006) Arabidopsis cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. Proteomics **6:** 301-311

Bayer EM, Thomas CL, Maule AJ (2004) Plasmodesmata in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. Protoplasma **223:** 93-102

Becker D, Kemper E, Schell J, Masterson R (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant molecular biology **20:** 1195-1197

BeGora MD, Macleod MJ, McCarry BE, Summers PS, Weretilnyk EA (2010) Identification of phosphomethylethanolamine N-methyltransferase from *Arabidopsis* and its role in choline and phospholipid metabolism. J Biol Chem **285:** 29147-29155

Bell CJ, Ecker JR (1994) Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. Genomics **19:** 137-144

Bell K, Oparka K (2011) Imaging plasmodesmata. Protoplasma **248:** 9-25

Benitez-Alfonso Y, Cilia M, Roman AS, Thomas CL, Maule AJ, Hearn S, Jackson D (2009) Control of *Arabidopsis* meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. Proceedings of the National Academy of Sciences **106:** 3615-3620

Benitez-Alfonso Y, Faulkner C, Pendle A, Miyashima S, Helariutta Y, Maule AJ (2013) Symplastic intercellular connectivity regulates lateral root patterning. Developmental cell **26:** 136-147

Benitez-Alfonso Y, Faulkner C, Ritzenthaler C, Maule AJ (2010) Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. Molecular plant-microbe interactions **23:** 1403-1412

Benitez-Alfonso Y, Jackson D (2009) Redox homeostasis regulates plasmodesmal communication in *Arabidopsis* meristems. Plant Signal Behav **4:** 655-659

Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**:** 289-300

Benschop J, Mohammed S, O'Flaherty M, Heck AJ, Slijper M, Menke F (2007) Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. Molecular & Cellular Proteomics **6:** 1198-1214

Bhat RA, Panstruga R (2005) Lipid rafts in plants. Planta **223:** 5-19

Bigay J, Gounon P, Robineau S, Antonny B (2003) Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. Nature **426:** 563-566

Blackman LM, Harper JD, Overall RL (1999) Localization of a centrin-like protein to higher plant plasmodesmata. European journal of cell biology **78:** 297-304

Blackman LM, Overall RL (1998) Immunolocalisation of the cytoskeleton to plasmodesmata of *Chara corallina*. The Plant Journal **14:** 733-741

Blackwood RA, Ernst JD (1990) Characterization of Ca^{2+}-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. Biochem J **266:** 195-200

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian journal of biochemistry and physiology **37:** 911-917

Bligny R, Foray MF, Roby C, Douce R (1989) Transport and phosphorylation of choline in higher plant cells. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. J Biol Chem **264:** 4888-4895

Blusztajn JK (1998) Choline, a vital amine. Science **281:** 794-795

Bogdanov M, Dowhan W, Vitrac H (2014) Lipids and topological rules governing membrane protein assembly. Biochim Biophys Acta **1843:** 1475-1488

Bogdanov M, Heacock PN, Dowhan W (2002) A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. EMBO J **21:** 2107-2116

Bogdanov M, Xie J, Heacock P, Dowhan W (2008) To flip or not to flip: lipid-protein charge interactions are a determinant of final membrane protein topology. J Cell Biol **182:** 925-935

Bolognese CP, McGraw P (2000) The isolation and characterization in yeast of a gene for Arabidopsis S-adenosylmethionine:phospho-ethanolamine N-methyltransferase. Plant Physiol **124:** 1800-1813

Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, MacAskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. Plant physiology **137:** 104-116

Botha C, Cross R, Van Bel A, Peter C (2000) Phloem loading in the sucrose-export-defective (*SXD-1*) mutant maize is limited by callose deposition at plasmodesmata in bundle sheath—vascular parenchyma interface. Protoplasma **214:** 65-72

Botha C, Hartley B, Cross R (1993) The ultrastructure and computer-enhanced digital image analysis of plasmodesmata at the Kranz mesophyll-bundle sheath interface of *Themeda triandra* var. *imberbis* (Retz) A. Camus in conventionally-fixed blades. Annals of Botany **72:** 255-261

Boyko V, Ashby JA, Suslova E, Ferralli J, Sterthaus O, Deom CM, Heinlein M (2002) Intramolecular complementing mutations in *Tobacco mosaic virus* movement protein confirm a role for microtubule association in viral RNA transport. J Virol **76:** 3974-3980

Boyko V, Ferralli J, Ashby J, Schellenbaum P, Heinlein M (2000) Function of microtubules in intercellular transport of plant virus RNA. Nat Cell Biol **2:** 826-832

Boyko V, Ferralli J, Heinlein M (2000) Cell-to-cell movement of TMV RNA is temperature-dependent and corresponds to the association of movement protein with microtubules. Plant J **22:** 315-325

Boyko V, Hu Q, Seemanpillai M, Ashby J, Heinlein M (2007) Validation of microtubule-associated *Tobacco mosaic virus* RNA movement and involvement of microtubule-aligned particle trafficking. Plant J **51:** 589-603

Boyko V, van der Laak J, Ferralli J, Suslova E, Kwon MO, Heinlein M (2000) Cellular targets of functional and dysfunctional mutants of *Tobacco mosaic virus* movement protein fused to green fluorescent protein. J Virol **74:** 11339-11346

Brecknock S, Dibbayawan TP, Vesk M, Vesk PA, Faulkner C, Barton DA, Overall RL (2011) High resolution scanning electron microscopy of plasmodesmata. Planta **234:** 749-758

Brill LM, Nunn RS, Kahn TW, Yeager M, Beachy RN (2000) Recombinant T*obacco mosaic virus* movement protein is an RNA-binding, α-helical membrane protein. Proceedings of the National Academy of Sciences **97:** 7112-7117

Broquet AH, Thomas G, Masliah J, Trugnan G, Bachelet M (2003) Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. Journal of Biological Chemistry **278:** 21601-21606

Brown MF (1997) Influence of nonlamellar-forming lipids on rhodopsin. Current topics in membranes **44:** 285-356

Burch-Smith TM, Stonebloom S, Xu M, Zambryski PC (2011) Plasmodesmata during development: re-examination of the importance of primary, secondary, and branched plasmodesmata structure versus function. Protoplasma **248:** 61-74

Burch-Smith TM, Zambryski PC (2010) Loss of INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT (ISE)1 or ISE2 increases the formation of secondary plasmodesmata. Curr Biol **20:** 989-993

Burch-Smith TM, Zambryski PC (2012) Plasmodesmata paradigm shift: regulation from without versus within. Annual review of plant biology **63:** 239-260

Cacas J-L, Furt F, Le Guédard M, Schmitter J-M, Buré C, Gerbeau-Pissot P, Moreau P, Bessoule J-J, Simon-Plas F, Mongrand S (2012) Lipids of plant membrane rafts. Prog Lipid Res **51:** 272-299

Camoni L, Di Lucente C, Pallucca R, Visconti S, Aducci P (2012) Binding of phosphatidic acid to 14-3-3 proteins hampers their ability to activate the plant plasma membrane H^+-ATPase. IUBMB Life **64:** 710-716

Cantrill L, Overall R, Goodwin P (1999) Cell-to-cell communication via plant endomembranes. Cell Biology International **23:** 653-661

Carluccio AV, Zicca S, Stavolone L (2014) Hitching a ride on vesicles: *Cauliflower mosaic virus* movement protein trafficking in the endomembrane system. Plant Physiol

Carmona-Salazar L, El Hafidi M, Enriquez-Arredondo C, Vazquez-Vazquez C, Gonzalez de la Vara LE, Gavilanes-Ruiz M (2011) Isolation of detergent-resistant membranes from plant photosynthetic and non-photosynthetic tissues. Anal Biochem **417:** 220-227

Chapman S, Hills G, Watts J, Baulcombe D (1992) Mutational analysis of the coat protein gene of *Potato virus X*: effects on virion morphology and viral pathogenicity. Virology **191:** 223-230

Chen C, Li S, McKeever DR, Beattie GA (2013) The widespread plant-colonizing bacterial species *Pseudomonas syringae* detects and exploits an extracellular pool of choline in hosts. Plant J **75:** 891-902

Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. Nature **468:** 527-532

Chen X-Y, Kim J-Y (2009) Callose synthesis in higher plants. Plant Signal Behav **4:** 489-492

Cho W, Stahelin RV (2005) Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. Annu Rev Biophys Biomol Struct **34:** 119-151

Christensen NM, Faulkner C, Oparka K (2009) Evidence for unidirectional flow through plasmodesmata. Plant Physiol **150:** 96-104

Citovsky V, McLean BG, Zupan JR, Zambryski P (1993) Phosphorylation of *Tobacco mosaic virus* cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. Genes & Development **7:** 904-910

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The plant journal **16:** 735-743

Clouse SD (2011) Brassinosteroids. The Arabidopsis Book**:** e0151

Clouse SD, Feldmann KA (1999) Molecular genetics of brassinosteroid action. Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones. Springer-Verlag, Tokyo**:** 163-190

Corda D, Carcedo CH, Bonazzi M, Luini A, Spano S (2002) Molecular aspects of membrane fission in the secretory pathway. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS **59:** 1819-1832

Cordy JM, Hussain I, Dingwall C, Hooper NM, Turner AJ (2003) Exclusively targeting β-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates β-site processing of the amyloid precursor protein. Proceedings of the National Academy of Sciences **100:** 11735-11740

Cornell R (1989) Cholinephosphotransferase. Phosphatidylcholine metabolism. CRC Press, Boca Raton, FL**:** 47-64

Cornell RB, Horwitz AF (1980) Apparent coordination of the biosynthesis of lipids in cultured cells: its relationship to the regulation of the membrane sterol: phospholipid ratio and cell cycling. The Journal of cell biology **86:** 810-819

Crawford KM, Zambryski PC (2000) Characterization of two forms of plant intercellular protein movement: subcellular address controls cell-to-cell transportability. Curr Biol **10:** 1032-1040

Crawford KM, Zambryski PC (2000) Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. Curr Biol **10:** 1032-1040

Crawford KM, Zambryski PC (2001) Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. Plant Physiology **125:** 1802-1812

Cruz-Ramirez A, Lopez-Bucio J, Ramirez-Pimentel G, Zurita-Silva A, Sanchez-Calderon L, Ramirez-Chavez E, Gonzalez-Ortega E, Herrera-Estrella L (2004) The *xipotl* mutant of Arabidopsis reveals a critical role for phospholipid metabolism in root system development and epidermal cell integrity. Plant Cell **16:** 2020-2034

Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. Nucleic acids research **13:** 4777-4788

Dettmer J, Ursache R, Campilho A, Miyashima S, Belevich I, O'Regan S, Mullendore DL, Yadav SR, Lanz C, Beverina L, Papagni A, Schneeberger K, Weigel D, Stierhof YD, Moritz T, Knoblauch M, Jokitalo E, Helariutta Y (2014) CHOLINE TRANSPORTER-LIKE1 is required for sieve plate development to mediate long-distance cell-to-cell communication. Nat Commun **5:** 4276

Devaux PF (1991) Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. Biochemistry **30:** 1163-1173

Devaux PF (2000) Is lipid translocation involved during endo- and exocytosis? Biochimie **82:** 497-509

Ding B, Haudenshield JS, Hull RJ, Wolf S, Beachy RN, Lucas WJ (1992) Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the *Tobacco mosaic virus* movement protein in transgenic tobacco plants. The Plant Cell Online **4:** 915-928

Ding B, Kwon MO, Warnberg L (1996) Evidence that actin filaments are involved in controlling the permeability of plasmodesmata in tobacco mesophyll. The Plant Journal **10:** 157-164

Ding B, Turgeon R, Parthasarathy MV (1992) Substructure of freeze-substituted plasmodesmata. Protoplasma **169:** 28-41

Dolja VV, Kreuze JF, Valkonen J (2006) Comparative and functional genomics of closteroviruses. Virus research **117:** 38-51

Dong X, Hong Z, Chatterjee J, Kim S, Verma DPS (2008) Expression of callose synthase genes and its connection with Npr1 signaling pathway during pathogen infection. Planta **229:** 87-98

Dragsten PR, Blumenthal R, Handler JS (1981) Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? Nature **294:** 718-722

Du Y, Zhao J, Chen T, Liu Q, Zhang H, Wang Y, Hong Y, Xiao F, Zhang L, Shen Q, Liu Y (2013) Type I J-domain NbMIP1 proteins are required for both *Tobacco mosaic virus* infection and plant innate immunity. PLoS Pathog **9:** e1003659

Duckett CM, Oparka KJ, Prior DA, Dolan L, Roberts K (1994) Dye-coupling in the root epidermis of Arabidopsis is progressively reduced during development. Development **120:** 3247-3255

Eastmond PJ, Quettier AL, Kroon JT, Craddock C, Adams N, Slabas AR (2010) Phosphatidic acid phosphohydrolase 1 and 2 regulate phospholipid synthesis at the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. Plant Cell **22:** 2796-2811

Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic acids research **19:** 1349

Ehlers K, Kollmann R (1996) Formation of branched plasmodesmata in regenerating *Solanum nigrum*-protoplasts. Planta **199:** 126-138

Ehlers K, Kollmann R (2001) Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin, and functioning. Protoplasma **216:** 1-30

Ehlers K, van Bel AJ (2010) Dynamics of plasmodesmal connectivity in successive interfaces of the cambial zone. Planta **231:** 371-385

Epel BL (2009) Plant viruses spread by diffusion on ER-associated movement-protein-rafts through plasmodesmata gated by viral induced host β-1,3-glucanases. *In* Semin Cell Dev Biol, Vol 20. Elsevier, pp 1074-1081

Epel BL, Kuchuck B, Kotlizky G, Shurtz S, Erlanger M, Yahalom A (1995) Isolation and characterization of plasmodesmata. Methods in cell biology **50:** 237-253

Epel BL, van Lent JW, Cohen L, Kotlizky G, Katz A, Yahalom A (1996) A 41 kDa protein isolated from maize mesocotyl cell walls immunolocalizes to plasmodesmata. Protoplasma **191:** 70-78

Esau K, Thorsch J (1984) The sieve plate of *Echium* (Boraginaceae): developmental aspects and response of P-protein to protein digestion. Journal of ultrastructure research **86:** 31-45

Esau K, Thorsch J (1985) Sieve plate pores and plasmodesmata, the communication channels of the symplast: ultrastructural aspects and developmental relations. American journal of botany**:** 1641-1653

Escobar NM, Haupt S, Thow G, Boevink P, Chapman S, Oparka K (2003) High-throughput viral expression of cDNA–green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. The Plant Cell Online **15:** 1507-1523

Fan L, Zheng S, Cui D, Wang X (1999) Subcellular distribution and tissue expression of phospholipase D□, D□, and D□ in Arabidopsis. Plant Physiol **119:** 1371-1378

Fan L, Zheng S, Wang XM (1997) Antisense suppression of phospholipase D□ retards abscisic acid- and ethylene-promoted senescence of postharvest Arabidopsis leaves. Plant Cell **9:** 2183-2196

Faulkner CR, Akman OE, Bell K, Jeffree C, Oparka K (2008) Peeking into pit fields: a multiple twinning model of secondary plasmodesmata formation in tobacco. Plant Cell **20:** 1504-1518

Faulkner CR, Blackman LM, Collings DA, Cordwell SJ, Overall RL (2009) Anti-tropomyosin antibodies co-localise with actin microfilaments and label plasmodesmata. European journal of cell biology **88:** 357-369

Faulkner CR, Blackman LM, Cordwell SJ, Overall RL (2005) Proteomic identification of putative plasmodesmatal proteins from *Chara corallina*. Proteomics **5:** 2866-2875

Faulkner CR, Maule AJ (2011) Opportunities and successes in the search for plasmodesmal proteins. Protoplasma **248:** 27-38

Feng Z, Chen X, Bao Y, Dong J, Zhang Z, Tao X (2013) Nucleocapsid of *Tomato spotted wilt* tospovirus forms mobile particles that traffic on an actin/endoplasmic reticulum network driven by myosin XI-K. New Phytol

Fernandez-Calvino L, Faulkner CR, Walshaw J, Saalbach G, Bayer E, Benitez-Alfonso Y, Maule AJ (2011) Arabidopsis plasmodesmal proteome. PLoS One **6**

Ferralli J, Ashby J, Fasler M, Boyko V, Heinlein M (2006) Disruption of microtubule organization and centrosome function by expression of *Tobacco mosaic virus* movement protein. J Virol **80:** 5807-5821

Fichtenbauer D, Xu XM, Jackson D, Kragler F (2012) The chaperonin CCT8 facilitates spread of tobamovirus infection. Plant Signal Behav **7:** 318-321

Fitzgibbon J, Beck M, Zhou J, Faulkner CR, Robatzek S, Oparka K (2013) A developmental framework for complex plasmodesmata formation revealed by large-scale imaging of the *Arabidopsis* leaf epidermis. Plant Cell **25:** 57-70

Fitzgibbon J, Bell K, King E, Oparka K (2010) Super-resolution imaging of plasmodesmata using three-dimensional structured illumination microscopy. Plant Physiol **153:** 1453-1463

Fleurat-Lessard P, Bouché-Pillon S, Leloup C, Lucas W, Serrano R, Bonnemain J-L (1995) Absence of plasma membrane H^+-ATPase in plasmodesmata located in pit-fields of the young reactive pulvinus of *Mimosa pudica* L. Protoplasma **188:** 180-185

Florentino LH, Santos AA, Fontenelle MR, Pinheiro GL, Zerbini FM, Baracat-Pereira MC, Fontes EP (2006) A PERK-like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. J Virol **80:** 6648-6656

Fondong VN (2013) Geminivirus protein structure and function. Molecular Plant Pathology **14:** 635-649

Foresti O, Denecke J (2008) Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function. Traffic **9:** 1599-1612

Fry SC (2001) Plant cell walls. eLS

Fujiki M, Kawakami S, Kim RW, Beachy RN (2006) Domains of *Tobacco mosaic viru*s movement protein essential for its membrane association. Journal of General Virology **87:** 2699-2707

Gallagher KL, Benfey PN (2009) Both the conserved GRAS domain and nuclear localization are required for SHORT-ROOT movement. The Plant Journal **57:** 785-797

Geiger O, López-Lara IM, Sohlenkamp C (2013) Phosphatidylcholine biosynthesis and function in bacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids **1831:** 503-513

Genoves A, Navarro JA, Pallas V (2010) The intra- and intercellular movement of *Melon necrotic spot virus* (MNSV) depends on an active secretory pathway. Mol Plant Microbe Interact **23:** 263-272

Ghoshroy S, Lartey R, Sheng J, Citovsky V (1997) Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. Annual review of plant biology **48:** 27-50

Golomb L, Abu-Abied M, Belausov E, Sadot E (2008) Different subcellular localizations and functions of Arabidopsis myosin VIII. BMC plant biology **8:** 3

Goodwin P (1983) Molecular size limit for movement in the symplast of the Elodea leaf. Planta **157:** 124-130

Gorovits R, Moshe A, Ghanim M, Czosnek H (2013) Recruitment of the host plant heat shock protein 70 by *Tomato yellow leaf curl virus* coat protein is required for virus infection. PLoS One **8:** e70280

Gout E, Bligny R, Roby C, Douce R (1990) Transport of phosphocholine in higher plant cells: ^{31}P nuclear magnetic resonance studies. Proc Natl Acad Sci U S A **87:** 4280-4283

Grabski S, De Feijter AW, Schindler M (1993) Endoplasmic reticulum forms a dynamic continuum for lipid diffusion between contiguous soybean root cells. The Plant Cell Online **5:** 25-38

Graham TR, Kozlov MM (2010) Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. Current opinion in cell biology **22:** 430-436

Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ, Reynolds SH, Enns LC, Burtner C, Johnson JE, Odden AR (2003) Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. Genetics **164:** 731-740

Grefen C, Donald N, Hashimoto K, Kudla J, Schumacher K, Blatt MR (2010) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. The Plant Journal **64:** 355-365

Grennan AK (2007) Lipid rafts in plants. Plant Physiol **143:** 1083-1085

Gross SD, Anderson RA (1998) Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. Cellular signalling **10:** 699-711

Grumbach ES, Diehl DM, Mazzeo JR (2004) A sensitive ESI-MS HILIC method for the analysis of acetylcholine and choline. LC GC NORTH AMERICA **22:** 74-75

Grzybek M, Chorzalska A, Bok E, Hryniewicz-Jankowska A, Czogalla A, Diakowski W, Sikorski AF (2006) Spectrin–phospholipid interactions: Existence of multiple kinds of binding sites? Chem Phys Lipids **141:** 133-141

Guenoune-Gelbart D, Elbaum M, Sagi G, Levy A, Epel BL (2008) *Tobacco mosaic virus* (TMV) replicase and movement protein function synergistically in facilitating TMV spread by lateral diffusion in the plasmodesmal desmotubule of *Nicotiana benthamiana*. Molecular Plant-Microbe Interactions **21:** 335-345

Guseman JM, Lee JS, Bogenschutz NL, Peterson KM, Virata RE, Xie B, Kanaoka MM, Hong Z, Torii KU (2010) Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in Arabidopsis *CHORUS* (*GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8*). Development **137:** 1731-1741

Hancock JF (2006) Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. Nature Reviews Molecular Cell Biology **7:** 456-462

Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER, Robertson D, Mansoor S (2013) Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. Nat Rev Micro **11:** 777-788

Harries PA, Park JW, Sasaki N, Ballard KD, Maule AJ, Nelson RS (2009) Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for sustained intercellular movement. Proc Natl Acad Sci U S A **106:** 17594-17599

Harries PA, Schoelz JE, Nelson RS (2009) Covering common ground: F-actin-dependent transport of plant viral protein inclusions reveals a novel mechanism for movement utilized by unrelated viral proteins. Plant Signal Behav **4:** 454-456

Hartwig T, Corvalan C, Best NB, Budka JS, Zhu J-Y, Choe S, Schulz B (2012) Propiconazole is a specific and accessible brassinosteroid (BR) biosynthesis inhibitor for *Arabidopsis* and maize. PloS one **7:** e36625

Haywood V, Kragler F, Lucas WJ (2002) Plasmodesmata: Pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. Plant Cell **14:** S303-S325

He J-X, Fujioka S, Li T-C, Kang SG, Seto H, Takatsuto S, Yoshida S, Jang J-C (2003) Sterols regulate development and gene expression in Arabidopsis. Plant physiology **131:** 1258-1269

Heginbotham L, Kolmakova-Partensky L, Miller C (1998) Functional reconstitution of a prokaryotic K^+-channel. The Journal of general physiology **111:** 741-749

Heinlein M, Epel BL, Padgett HS, Beachy RN (1995) Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. Science **270:** 1983-1985

Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser M-T, Benfey PN (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. Cell **101:** 555-567

Hepler P (1982) Endoplasmic reticulum in the formation of the cell plate and plasmodesmata. Protoplasma **111:** 121-133

Hoessli DC, Ilangumaran S, Soltermann A, Robinson PJ, Borisch B (2000) Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: the concept of signaling platform. Glycoconjugate journal **17:** 191-197

Hofius D (2003) Identifizierung molekularer Faktoren des plasmodesmalen Makromolekül-und Assimilattransportes in Pflanzen. Dissertation (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Hofius D, Hajirezaei M-R, Geiger M, Tschiersch H, Melzer M, Sonnewald U (2004) RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. Plant Physiology **135:** 1256-1268

Hofius D, Herbers K, Melzer M, Omid A, Tacke E, Wolf S, Sonnewald U (2001) Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the *potato leafroll virus* movement protein in transgenic tobacco plants. Plant J **28:** 529-543

Hofius D, Maier AT, Dietrich C, Jungkunz I, Bornke F, Maiss E, Sonnewald U (2007) Capsid protein-mediated recruitment of host DnaJ-like proteins is required for *Potato virus Y* infection in tobacco plants. J Virol **81:** 11870-11880

Hofmann J, Youssef-Banora M, de Almeida-Engler J, Grundler FM (2010) The role of callose deposition along plasmodesmata in nematode feeding sites. Molecular Plant-Microbe Interactions **23:** 549-557

Holdaway-Clarke TL, Walker NA, Hepler PK, Overall RL (2000) Physiological elevations in cytoplasmic free calcium by cold or ion injection result in transient closure of higher plant plasmodesmata. Planta **210:** 329-335

Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W (1990) Atomic model of the actin filament. Nature **347:** 44-49

Howard AR, Heppler ML, Ju H-J, Krishnamurthy K, Payton ME, Verchot-Lubicz J (2004) *Potato virus X* TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves. Virology **328:** 185-197

Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. Advances in bioinformatics **2008**

Hu J, Shibata Y, Voss C, Shemesh T, Li Z, Coughlin M, Kozlov MM, Rapoport TA, Prinz WA (2008) Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules. Science **319:** 1247-1250

Huang S, Gao L, Blanchoin L, Staiger CJ (2006) Heterodimeric capping protein from *Arabidopsis* is regulated by phosphatidic acid. Mol Biol Cell **17:** 1946-1958

Huang Z, Andrianov VM, Han Y, Howell SH (2001) Identification of Arabidopsis proteins that interact with the *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) movement protein. Plant Mol Biol **47:** 663-675

Hung CJ, Huang YW, Liou MR, Lee YC, Lin NS, Meng M, Tsai CH, Hu CC, Hsu YH (2014) Phosphorylation of coat protein by protein kinase CK2 regulates cell-to-cell movement of *Bamboo mosaic virus* through modulating RNA binding. Mol Plant Microbe Interact **27:** 1211-1225

Imlau A, Truernit E, Sauer N (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. Plant Cell **11:** 309-322

Inazu M (2014) Choline transporter-like proteins CTLs/SLC44 family as a novel molecular target for cancer therapy. Biopharmaceutics & drug disposition **35:** 431-449

Ishidate K, Nakazawa Y (1992) Choline/ethanolamine kinase from rat kidney. Methods in enzymology **209:** 121

Ivanov KI, Puustinen P, Gabrenaite R, Vihinen H, Ronnstrand L, Valmu L, Kalkkinen N, Makinen K (2003) Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection. Plant Cell **15:** 2124-2139

Jackson AO, Lim HS, Bragg J, Ganesan U, Lee MY (2009) Hordeivirus replication, movement, and pathogenesis. Annu Rev Phytopathol **47:** 385-422

Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RGW (2007) Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. Nat Cell Biol **9:** 7-14

Janda M, Planchais S, Djafi N, Martinec J, Burketova L, Valentova O, Zachowski A, Ruelland E (2013) Phosphoglycerolipids are master players in plant hormone signal transduction. Plant Cell Rep **32:** 839-851

Jander G, Norris SR, Rounsley SD, Bush DF, Levin IM, Last RL (2002) Arabidopsis map-based cloning in the post-genome era. Plant Physiol **129:** 440-450

Janmey PA, Lindberg U (2004) Cytoskeletal regulation: rich in lipids. Nature Reviews Molecular Cell Biology **5:** 658-666

Jarsch IK, Ott T (2011) Perspectives on remorin proteins, membrane rafts, and their role during plant-microbe interactions. Mol Plant Microbe Interact **24:** 7-12

Jones D, Blancaflor E, Kochian L, Gilroy S (2006) Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. Plant, Cell & Environment **29:** 1309-1318

Jones MGK (1976) The origin and development of plasmodesmata. *In* Intercellular communication in plants: Studies on plasmodesmata. Springer, pp 81-105

Jones PL, Willey DL, Gacesa P, Harwood JL (1998) Isolation, characterisation and expression of a cDNA for pea cholinephosphate cytidylyltransferase. Plant Mol Biol **37:** 179-185

Kachroo A, Kachroo P (2009) Fatty acid-derived signals in plant defense. Annu Rev Phytopathol **47:** 153-176

Kaido M, Inoue Y, Takeda Y, Sugiyama K, Takeda A, Mori M, Tamai A, Meshi T, Okuno T, Mise K (2007) Downregulation of the *NbNACa1* gene encoding a movement-protein-interacting protein reduces cell-to-cell movement of *Brome mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana*. Molecular Plant-Microbe Interactions **20:** 671-681

Karasev AV, Kashina AS, Gelfand VI, Dolja VV (1992) HSP70-related 65 kDa protein of *Beet yellows closterovirus* is a microtubule-binding protein. FEBS letters **304:** 12-14

Karger EM, Frolova OY, Fedorova NV, Baratova LA, Ovchinnikova TV, Susi P, Makinen K, Ronnstrand L, Dorokhov YL, Atabekov JG (2003) Dysfunctionality of a *Tobacco mosaic virus* movement protein mutant mimicking threonine 104 phosphorylation. Journal of General Virology **84:** 727-732

Karimi M, Inzé D, Depicker A (2002) GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Trends Plant Sci **7:** 193-195

Karnovsky MJ, Kleinfeld AM, Hoover RL, Klausner RD (1982) The concept of lipid domains in membranes. The Journal of cell biology **94:** 1-6

Karpova OV, Ivanov KI, Rodionova NP, Dorokhov YL, Atabekov JG (1997) Nontranslatability and dissimilar behavior in plants and protoplasts of viral RNA and movement protein complexes formed *in vitro*. Virology **230:** 11-21

Karpova OV, Rodionova NP, Ivanov KI, Kozlovsky SV, Dorokhov YL, Atabekov JG (1999) Phosphorylation of *Tobacco mosaic virus* movement protein abolishes its translation repressing ability. Virology **261:** 20-24

Kawakami S, Padgett HS, Hosokawa D, Okada Y, Beachy RN, Watanabe Y (1999) Phosphorylation and/or presence of serine 37 in the movement protein of *Tomato mosaic tobamovirus* is essential for intracellular localization and stability *in vivo*. The Journal of Virology **73:** 6831-6840

Kearns BG, McGee TP, Mayinger P, Gedvilaite A, Phillips SE, Kagiwada S, Bankaitis VA (1997) Essential role for diacylglycerol in protein transport from the yeast Golgi complex.

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C (2012) Geneious Basic: an integrated and

extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics **28:** 1647-1649

Keogh MR, Courtney PD, Kinney AJ, Dewey RE (2009) Functional characterization of phospholipid N-methyltransferases from Arabidopsis and soybean. J Biol Chem **284:** 15439-15447

Kierszniowska S, Seiwert B, Schulze WX (2009) Definition of *Arabidopsis* sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-ß-cyclodextrin and quantitative proteomics. Mol Cell Proteomics **8:** 612-623

Kim HJ, Ok SH, Bahn SC, Jang J, Oh SA, Park SK, Twell D, Ryu SB, Shin JS (2011) Endoplasmic reticulum- and Golgi-localized phospholipase A_2 plays critical roles in *Arabidopsis* pollen development and germination. Plant Cell **23:** 94-110

Kim I, Cho E, Crawford K, Hempel FD, Zambryski PC (2005) Cell-to-cell movement of GFP during embryogenesis and early seedling development in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A **102:** 2227-2231

Kim I, Hempel FD, Sha K, Pfluger J, Zambryski PC (2002) Identification of a developmental transition in plasmodesmatal function during embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Development **129:** 1261-1272

Kim I, Zambryski PC (2005) Cell-to-cell communication via plasmodesmata during *Arabidopsis* embryogenesis. Curr Opin Plant Biol **8:** 593-599

Kim J-Y, Rim Y, Wang J, Jackson D (2005) A novel cell-to-cell trafficking assay indicates that the KNOX homeodomain is necessary and sufficient for intercellular protein and mRNA trafficking. Genes & Development **19:** 788-793

Kim J-Y, Yuan Z, Jackson D (2003) Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in *Arabidopsis*. Development **130:** 4351-4362

Kim JY, Yuan Z, Cilia M, Khalfan-Jagani Z, Jackson D (2002) Intercellular trafficking of a *KNOTTED1* green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences **99:** 4103-4108

Kim WC, Ko JH, Han KH (2012) Identification of a cis-acting regulatory motif recognized by MYB46, a master transcriptional regulator of secondary wall biosynthesis. Plant Mol Biol **78:** 489-501

Kinney AJ, Clarkson DT, Loughman BC (1987) The regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in rye (*Secale cereale*) roots. Stimulation of the nucleotide pathway by low temperature. Biochem J **242:** 755-759

Kleinow T, Nischang M, Beck A, Kratzer U, Tanwir F, Preiss W, Kepp G, Jeske H (2009) Three C-terminal phosphorylation sites in the *Abutilon mosaic virus* movement protein affect symptom development and viral DNA accumulation. Virology **390:** 89-101

Kobayashi K, Otegui MS, Krishnakumar S, Mindrinos M, Zambryski P (2007) *INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT 2* encodes a putative DEVH box RNA helicase involved in plasmodesmata function during *Arabidopsis* embryogenesis. Plant Cell **19:** 1885-1897

Kodaki T, Yamashita S (1987) Yeast phosphatidylethanolamine methylation pathway. Cloning and characterization of two distinct methyltransferase genes. Journal of Biological Chemistry **262:** 15428-15435

Kollmann R, Glockmann C (1999) Multimorphology and nomenclature of plasmodesmata in higher plants. *In* Plasmodesmata. Springer, pp 149-172

Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. The Plant Journal **4:** 403-410

Kragler F (2013) Plasmodesmata: intercellular tunnels facilitating transport of macromolecules in plants. Cell Tissue Res **352:** 49-58

Kramer SR, Goregaoker SP, Culver JN (2011) Association of the *Tobacco mosaic virus* 126 kDa replication protein with a GDI protein affects host susceptibility. Virology **414:** 110-118

Krenz B, Jeske H, Kleinow T (2012) The induction of stromule formation by a plant DNA-virus in epidermal leaf tissues suggests a novel intra- and intercellular macromolecular trafficking route. Front Plant Sci **3:** 291

Krenz B, Windeisen V, Wege C, Jeske H, Kleinow T (2010) A plastid-targeted heat shock cognate 70 kDa protein interacts with the *Abutilon mosaic virus* movement protein. Virology **401:** 6-17

Kronberg K (2008) Physiologische und molekulargenetische Charakterisierung PLRV-MP17:GFP-exprimierender *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen. Dissertation (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Kronberg K, Vogel F, Rutten T, Hajirezaei MR, Sonnewald U, Hofius D (2007) The silver lining of a viral agent: increasing seed yield and harvest index in Arabidopsis by ectopic expression of the *Potato leaf roll virus* movement protein. Plant Physiol **145:** 905-918

Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. The EMBO journal **22:** 2623-2633

Kwik J, Boyle S, Fooksman D, Margolis L, Sheetz MP, Edidin M (2003) Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. Proceedings of the National Academy of Sciences **100:** 13964-13969

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. nature **227:** 680-685

Lagace TA, Ridgway ND (2013) The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum. Biochim Biophys Acta **1833:** 2499-2510

Laloi M, Perret A-M, Chatre L, Melser S, Cantrel C, Vaultier M-N, Zachowski A, Bathany K, Schmitter J-M, Vallet M, Lessire R, Hartmann M-A, Moreau P (2007) Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. Plant Physiology **143:** 461-472

Lam AD, Tryoen-Toth P, Tsai B, Vitale N, Stuenkel EL (2008) SNARE-catalyzed fusion events are regulated by Syntaxin1A-lipid interactions. Mol Biol Cell **19:** 485-497

Laporte C, Vetter G, Loudes AM, Robinson DG, Hillmer S, Stussi-Garaud C, Ritzenthaler C (2003) Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of *Grapevine fanleaf virus* movement protein in tobacco BY-2 cells. Plant Cell **15:** 2058-2075

Lasserre R, Guo X-J, Conchonaud F, Hamon Y, Hawchar O, Bernard A-M, Soudja SMH, Lenne P-F, Rigneault H, Olive D (2008) Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. Nature chemical biology **4:** 538-547

Lazarowitz SG, Beachy RN (1999) Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. Plant Cell **11:** 535-548

Lee A (1977) Lipid phase transitions and phase diagrams I. Lipid phase transitions. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes **472:** 237-281

Lee AG (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. Biochim Biophys Acta **1666:** 62-87

Lee J-Y (2008) Phosphorylation of movement proteins by the plasmodesmal-associated protein kinase. *In* Plant Virology Protocols. Springer, pp 625-639

Lee J-Y, Yoo B-C, Rojas MR, Gomez-Ospina N, Staehelin LA, Lucas WJ (2003) Selective trafficking of non-cell-autonomous proteins mediated by NtNCAPP1. Science **299:** 392-396

Lee JY, Lu H (2011) Plasmodesmata: the battleground against intruders. Trends Plant Sci **16:** 201-210

Lee JY, Taoka K, Yoo BC, Ben-Nissan G, Kim DJ, Lucas WJ (2005) Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. Plant Cell **17:** 2817-2831

Lee JY, Wang X, Cui W, Sager R, Modla S, Czymmek K, Zybaliov B, van Wijk K, Zhang C, Lu H, Lakshmanan V (2011) A plasmodesmata-localized protein mediates crosstalk between cell-to-cell communication and innate immunity in *Arabidopsis*. Plant Cell **23:** 3353-3373

Lefebvre B, Furt F, Hartmann M-A, Michaelson LV, Carde J-P, Sargueil-Boiron F, Rossignol M, Napier JA, Cullimore J, Bessoule J-J (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. Plant Physiology **144:** 402-418

Lefebvre B, Timmers T, Mbengue M, Moreau S, Hervé C, Tóth K, Bittencourt-Silvestre J, Klaus D, Deslandes L, Godiard L (2010) A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. Proceedings of the National Academy of Sciences **107:** 2343-2348

Leisner SM, Turgeon R (1993) Movement of virus and photoassimilate in the phloem: a comparative analysis. Bioessays **15:** 741-748

Lemmon MA (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. Nature reviews Molecular cell biology **9:** 99-111

Levy A, Erlanger M, Rosenthal M, Epel BL (2007) A plasmodesmata-associated ß-1,3-glucanase in Arabidopsis. Plant J **49:** 669-682

Lewis JD, Lazarowitz SG (2010) *Arabidopsis* synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. Proc Natl Acad Sci U S A **107:** 2491-2496

Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, Debono A, Durrett TP, Franke RB, Graham IA, Katayama K, Kelly AA, Larson T, Markham JE, Miquel M, Molina I, Nishida I, Rowland O, Samuels L, Schmid KM, Wada H, Welti R, Xu C, Zallot R, Ohlrogge J (2013) Acyl-lipid metabolism. Arabidopsis Book **11:** e0161

Li G, Xue H-W (2007) Arabidopsis PLDζ2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response. The Plant Cell Online **19:** 281-295

Li N, Sun L, Zhang L, Song Y, Hu P, Li C, Hao FS (2014) AtrbohD and AtrbohF negatively regulate lateral root development by changing the localized accumulation of superoxide in primary roots of *Arabidopsis*. Planta**:** 1-12

Li Z, Agellon LB, Allen TM, Umeda M, Jewell L, Mason A, Vance DE (2006) The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. Cell Metab **3:** 321-331

Lim H-S, Bragg JN, Ganesan U, Lawrence DM, Yu J, Isogai M, Hammond J, Jackson AO (2008) Triple gene block protein interactions involved in movement of *Barley stripe mosaic virus*. Journal of virology **82:** 4991-5006

Lim RH, Aebi U, Fahrenkrog B (2008) Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex. Histochemistry and Cell Biology **129:** 105-116

Linding R, Russell RB, Neduva V, Gibson TJ (2003) GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder. Nucleic acids research **31:** 3701-3708

Lingwood D, Simons K (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. science **327:** 46-50

Link K, Vogel F, Sonnewald U (2011) PD trafficking of *Potato leaf roll virus* movement protein in Arabidopsis depends on site-specific protein phosphorylation. Front Plant Sci **2:** 18

Lins L, Brasseur R (2008) Tilted peptides: a structural motif involved in protein membrane insertion? Journal of Peptide Science **14:** 416-422

Litvak V, Dahan N, Ramachandran S, Sabanay H, Lev S (2005) Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. Nat Cell Biol **7:** 225-234

Liu N, Lin Z, Guan L, Gaughan G, Lin G (2014) Antioxidant enzymes regulate reactive oxygen species during pod elongation in *Pisum sativum* and *Brassica chinensis*. PLoS One **9:** e87588

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

London E (2005) How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1746:** 203-220

Lough TJ, Lee RH, Emerson SJ, Forster RL, Lucas WJ (2006) Functional analysis of the 5′ untranslated region of potexvirus RNA reveals a role in viral replication and cell-to-cell movement. Virology **351:** 455-465

Lu L, Du Z, Qin M, Wang P, Lan H, Niu X, Jia D, Xie L, Lin Q, Wu Z (2009) Pc4, a putative movement protein of *Rice stripe virus*, interacts with a type I DnaJ protein and a small Hsp of rice. Virus Genes **38:** 320-327

Lucas WJ, Bouché-Pillon S, Jackson DP, Nguyen L, Baker L, Ding B, Hake S (1995) Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. Science **270:** 1980-1983

Lucas WJ, Ding B, van der Schoot C (1993) Tansley Review No. 58. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. New Phytologist**:** 435-476

Lucas WJ, Ham BK, Kim JY (2009) Plasmodesmata - bridging the gap between neighboring plant cells. Trends Cell Biol **19:** 495-503

Lucas WJ, Lee JY (2004) Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. Nat Rev Mol Cell Biol **5:** 712-726

Lukowitz W, Gillmor CS, Scheible W-R (2000) Positional cloning in Arabidopsis. Why it feels good to have a genome initiative working for you. Plant Physiology **123:** 795-806

Machova E, O'Regan S, Newcombe J, Meunier FM, Prentice J, Dove R, Lisa V, Dolezal V (2009) Detection of choline transporter-like 1 protein CTL1 in neuroblastoma x glioma cells and in the CNS, and its role in choline uptake. J Neurochem **110:** 1297-1309

Mahalka AK, Kirkegaard T, Jukola LT, Jäättelä M, Kinnunen PK (2014) Human heat shock protein 70 (Hsp70) as a peripheral membrane protein. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1838:** 1344-1361

Maksymiw R, Sui SF, Gaub H, Sackmann E (1987) Electrostatic coupling of spectrin dimers to phosphatidylserine-containing lipid lamellae. Biochemistry **26:** 2983-2990

Mandal MK, Chandra-Shekara AC, Jeong RD, Yu K, Zhu S, Chanda B, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P (2012) Oleic acid-dependent modulation of NITRIC OXIDE ASSOCIATED1 protein levels regulates nitric oxide-mediated defense signaling in *Arabidopsis*. Plant Cell **24:** 1654-1674

Marmagne A, Ferro M, Meinnel T, Bruley C, Kuhn L, Garin J, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G (2007) A high content in lipid-modified peripheral proteins and integral receptor kinases features in the *Arabidopsis* plasma membrane proteome. Molecular & Cellular Proteomics **6:** 1980-1996

Marsh D (2007) Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes. Biophys J **93:** 3884-3899

Martínez-Gil L, Sánchez-Navarro JA, Cruz A, Pallás V, Pérez-Gil J, Mingarro I (2009) Plant virus cell-to-cell movement is not dependent on the transmembrane disposition of its movement protein. Journal of Virology **83:** 5535-5543

Mathioudakis MM, Veiga R, Ghita M, Tsikou D, Medina V, Canto T, Makris AM, Livieratos IC (2012) *Pepino mosaic virus* capsid protein interacts with a tomato heat shock protein cognate 70. Virus Res **163:** 28-39

Matsushita Y, Hanazawa K, Yoshioka K, Oguchi T, Kawakami S, Watanabe Y, Nishiguchi M, Nyunoya H (2000) *In vitro* phosphorylation of the movement protein of *Tomato mosaic tobamovirus* by a cellular kinase. J Gen Virol **81:** 2095-2102

Matsushita Y, Yoshioka K, Shigyo T, Takahashi H, Nyunoy H (2002) Phosphorylation of the movement protein of *Cucumber mosaic virus* in transgenic tobacco plants. Virus Genes **24:** 231-234

Maule AJ (2008) Plasmodesmata: structure, function and biogenesis. Curr Opin Plant Biol **11:** 680-686

Mayor S, Viola A, Stan RV, del Pozo MA (2006) Flying kites on slippery slopes at keystone. EMBO reports **7:** 1089-1093

McGeachy KD, Barker H (2000) *Potato mop-top virus* RNA can move long distance in the absence of coat protein: evidence from resistant, transgenic plants. Molecular Plant-Microbe Interactions **13:** 125-128

McGee JD, Roe JL, Sweat TA, Wang X, Guikema JA, Leach JE (2003) Rice phospholipase D isoforms show differential cellular location and gene induction. Plant and Cell Physiology **44:** 1013-1026

McGee TP, Skinner HB, Whitters EA, Henry SA, Bankaitis VA (1994) A phosphatidylinositol transfer protein controls the phosphatidylcholine content of yeast Golgi membranes. J Cell Biol **124:** 273-287

McLaughlin S (1977) Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. Current topics in membranes and transport **9:** 71-144

McLaughlin S, Murray D (2005) Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. Nature **438:** 605-611

McLaughlin S, Wang J, Gambhir A, Murray D (2002) PIP2 and proteins: interactions, organization, and information flow. Annual review of biophysics and biomolecular structure **31:** 151-175

McLean BG, Zupan J, Zambryski PC (1995) *Tobacco mosaic virus* movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. Plant Cell **7:** 2101-2114

McLoughlin F, Galvan-Ampudia CS, Julkowska MM, Caarls L, van der Does D, Lauriere C, Munnik T, Haring MA, Testerink C (2012) The Snf1-related protein kinases SnRK2.4 and SnRK2.10 are involved in maintenance of root system architecture during salt stress. Plant J **72:** 436-449

Medina V, Peremyslov VV, Hagiwara Y, Dolja VV (1999) Subcellular localization of the HSP70-homolog encoded by beet yellows closterovirus. Virology **260:** 173-181

Mehterov N, Balazadeh S, Hille J, Toneva V, Mueller-Roeber B, Gechev T (2012) Oxidative stress provokes distinct transcriptional responses in the stress-tolerant *atr7* and stress-sensitive *loh2 Arabidopsis thaliana* mutants as revealed by multi-parallel quantitative real-time PCR analysis of ROS marker and antioxidant genes. Plant Physiology and Biochemistry **59:** 20-29

Meijer HJ, Munnik T (2003) Phospholipid-based signaling in plants. Annu Rev Plant Biol **54:** 265-306

Melcher U (2000) The '30K'superfamily of viral movement proteins. Journal of General Virology **81:** 257-266

Melser S, Molino D, Batailler B, Peypelut M, Laloi M, Wattelet-Boyer V, Bellec Y, Faure JD, Moreau P (2011) Links between lipid homeostasis, organelle morphodynamics and protein trafficking in eukaryotic and plant secretory pathways. Plant Cell Rep **30:** 177-193

Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG, Buchanan BB (2010) A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive

of a role in intercellular communication. Proceedings of the National Academy of Sciences **107:** 3900-3905

Michel V, Bakovic M (2009) The solute carrier 44A1 is a mitochondrial protein and mediates choline transport. FASEB J **23:** 2749-2758

Michel V, Bakovic M (2012) The ubiquitous choline transporter SLC44A1. Cent Nerv Syst Agents Med Chem **12:** 70-81

Michel V, Yuan Z, Ramsubir S, Bakovic M (2006) Choline transport for phospholipid synthesis. Exp Biol Med (Maywood) **231:** 490-504

Minami A, Fujiwara M, Furuto A, Fukao Y, Yamashita T, Kamo M, Kawamura Y, Uemura M (2009) Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. Plant Cell Physiol **50:** 341-359

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends in plant science **9:** 490-498

Módena NA, Zelada AM, Conte F, Mentaberry A (2008) Phosphorylation of the TGBp1 movement protein of *Potato virus X* by a *Nicotiana tabacum* CK2-like activity. Virus Research **137:** 16-23

Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneu M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. J Biol Chem **279:** 36277-36286

Moon H, Hazebroek J, Hildebrand DF (2000) Changes in fatty acid composition in plant tissues expressing a mammalian Δ9 desaturase. Lipids **35:** 471-479

Morel J, Claverol S, Mongrand S, Furt F, Fromentin J, Bessoule J-J, Blein J-P, Simon-Plas F (2006) Proteomics of plant detergent-resistant membranes. Molecular & Cellular Proteomics **5:** 1396-1411

Morozov SY, Solovyev AG (2003) Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. Journal of General Virology **84:** 1351-1366

Mou Z (2002) Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in Arabidopsis. The Plant Cell Online **14:** 2031-2043

Mousley CJ, Tyeryar KR, Vincent-Pope P, Bankaitis VA (2007) The Sec14-superfamily and the regulatory interface between phospholipid metabolism and membrane trafficking. Biochim Biophys Acta **1771:** 727-736

Munnik T (2001) Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. Trends Plant Sci **6:** 227-233

Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. Nature biotechnology **20:** 87-90

Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. Nature **413:** 307-311

Nakamura S, Mano S, Tanaka Y, Ohnishi M, Nakamori C, Araki M, Niwa T, Nishimura M, Kaminaka H, Nakagawa T (2010) Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, *bar*, as a selection marker for plant transformation. Bioscience, biotechnology, and biochemistry **74:** 1315-1319

Nakamura T, Fujiwara R, Ishiguro N, Oyabu M, Nakanishi T, Shirasaka Y, Maeda T, Tamai I (2010) Involvement of choline transporter-like proteins, CTL1 and CTL2, in glucocorticoid-induced acceleration of phosphatidylcholine synthesis via increased choline uptake. Biological and Pharmaceutical Bulletin **33:** 691-696

Nakamura Y, Andres F, Kanehara K, Liu YC, Dormann P, Coupland G (2014) Arabidopsis florigen FT binds to diurnally oscillating phospholipids that accelerate flowering. Nat Commun **5:** 3553

Nakamura Y, Koizumi R, Shui G, Shimojima M, Wenk MR, Ito T, Ohta H (2009) *Arabidopsis* lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation. Proc Natl Acad Sci U S A **106:** 20978-20983

Niehl A, Heinlein M (2011) Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. Protoplasma **248:** 75-99

Nishida I, Swinhoe R, Slabas AR, Murata N (1996) Cloning of *Brassica napus* CTP: phosphocholine cytidylyltransferase cDNAs by complementation in a yeast *cct* mutant. Plant Mol Biol **31:** 205-211

O'Regan S, Traiffort E, Ruat M, Cha N, Compaore D, Meunier FM (2000) An electric lobe suppressor for a yeast choline transport mutation belongs to a new family of transporter-like proteins. Proc Natl Acad Sci U S A **97:** 1835-1840

Okazaki Y, Saito K (2014) Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. Plant J

Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I (2000) Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. Nat Neurosci **3:** 120-125

Olesen P (1979) The neck constriction in plasmodesmata. Planta **144:** 349-358

Oparka KJ (2004) Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? Trends Plant Sci **9:** 33-41

Oparka KJ, Murphy R, Derrick PM, Prior DAM, Smith JAC (1991) Modification of the pressure-probe technique permits controlled intracellular microinjection of fluorescent probes. Journal of Cell Science **98:** 539-544

Oparka KJ, Prior DAM, Crawford JW (1994) Behavior of plasma membrane, cortical ER and plasmodesmata during plasmolysis of onion epidermal cells. Plant Cell and Environment **17:** 163-171

Oparka KJ, Roberts AG, Boevink P, Santa Cruz S, Roberts I, Pradel KS, Imlau A, Kotlizky G, Sauer N, Epel B (1999) Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. Cell **97:** 743-754

Ossowski S, Schneeberger K, Clark RM, Lanz C, Warthmann N, Weigel D (2008) Sequencing of natural strains of *Arabidopsis thaliana* with short reads. Genome Res **18:** 2024-2033

Ouko MO, Sambade A, Brandner K, Niehl A, Pena E, Ahad A, Heinlein M, Nick P (2010) Tobacco mutants with reduced microtubule dynamics are less susceptible to TMV. Plant J **62:** 829-839

Overall RL, Blackman LM (1996) A model of the macromolecular structure of plasmodesmata. Trends in Plant Science **1:** 307-311

Paape M, Solovyev AG, Erokhina TN, Minina EA, Schepetilnikov MV, Lesemann DE, Schiemann J, Morozov SY, Kellmann JW (2006) At-4/1, an interactor of the *Tomato spotted wilt virus* movement protein, belongs to a new family of plant proteins capable of directed intra- and intercellular trafficking. Mol Plant Microbe Interact **19:** 874-883

Patell Villoo M, Jain R, Shinde M, Settu L (2010) Identification and characterization of natural chemical entities by liquid chromatography and mass spectrometry lC-MS/MS and uses thereof. *In*. AVESTHAGEN LTD

Peiro A, Martinez-Gil L, Tamborero S, Pallas V, Sanchez-Navarro JA, Mingarro I (2014) The *Tobacco mosaic virus* movement protein associates with but does not integrate into biological membranes. J Virol **88:** 3016-3026

Perbal M-C, Haughn G, Saedler H, Schwarz-Sommer Z (1996) Non-cell-autonomous function of the *Antirrhinum* floral homeotic proteins *DEFICIENS* and *GLOBOSA* is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. Development **122:** 3433-3441

Perbal M-C, Thomas CL, Maule AJ (1993) *Cauliflower mosaic virus* gene I product (P1) forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts. Virology **195:** 281-285

Peremyslov VV, Hagiwara Y, Dolja VV (1999) HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. Proc Natl Acad Sci U S A **96:** 14771-14776

Perraki A, Binaghi M, Mecchia MA, Gronnier J, German-Retana S, Mongrand S, Bayer E, Zelada AM, Germain V (2014) StRemorin1.3 hampers *Potato virus X* TGBp1 ability to increase plasmodesmata permeability, but does not interfere with its silencing suppressor activity. FEBS Lett **588:** 1699-1705

Perraki A, Cacas JL, Crowet JM, Lins L, Castroviejo M, German-Retana S, Mongrand S, Raffaele S (2012) Plasma membrane localization of *Solanum tuberosum* remorin from group 1, homolog 3 is mediated by conformational changes in a novel C-terminal anchor and required for the restriction of *Potato virus X* movement. Plant Physiol **160:** 624-637

Pike LJ (2009) The challenge of lipid rafts. Journal of lipid research **50:** S323-S328

Pilot JD, East JM, Lee AG (2001) Effects of phospholipid headgroup and phase on the activity of diacylglycerol kinase of *Escherichia coli*. Biochemistry **40:** 14891-14897

Porter MY, Koelle MR (2010) RSBP-1 is a membrane-targeting subunit required by the $G\alpha_q$-specific but not the $G\alpha_o$-specific R7 regulator of G protein signaling in *Caenorhabditis elegans*. Molecular biology of the cell **21:** 232-243

Pouwels J, van der Velden T, Willemse J, Borst JW, van Lent J, Bisseling T, Wellink J (2004) Studies on the origin and structure of tubules made by the movement protein of *Cowpea mosaic virus*. J Gen Virol **85:** 3787-3796

Powell W, Machray GC, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in plant science **1:** 215-222

Prasch CM, Sonnewald U (2013) Simultaneous application of heat, drought, and virus to Arabidopsis plants reveals significant shifts in signaling networks. Plant Physiol **162:** 1849-1866

Prokhnevsky AI, Peremyslov VV, Dolja VV (2005) Actin cytoskeleton is involved in targeting of a viral Hsp70 homolog to the cell periphery. J Virol **79:** 14421-14428

Radford JE, Vesk M, Overall RL (1998) Callose deposition at plasmodesmata. Protoplasma **201:** 30-37

Radford JE, White RG (1998) Localization of a myosin-like protein to plasmodesmata. The Plant Journal **14:** 743-750

Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekeur T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noirot E, Satiat-Jeunemaitre B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Reymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule JJ, Mongrand S (2009) Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs *Potato virus X* movement. Plant Cell **21:** 1541-1555

Reichelt S, Knight AE, Hodge TP, Baluska F, Samaj J, Volkmann D, Kendrick-Jones J (1999) Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. The Plant Journal **19:** 555-567

Revers F, Le Gall O, Candresse T, Maule AJ (1999) New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. Molecular Plant-Microbe Interactions **12:** 367-376

Reymond P, Kunz B, Paul-Pletzer K, Grimm R, Eckerskorn C, Farmer EE (1996) Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. The Plant Cell Online **8:** 2265-2276

Rinne PL, Kaikuranta PM, Van Der Schoot C (2001) The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. The Plant Journal **26:** 249-264

Rinne PL, Welling A, Vahala J, Ripel L, Ruonala R, Kangasjärvi J, van der Schoot C (2011) Chilling of dormant buds hyperinduces *FLOWERING LOCUS T* and recruits GA-inducible 1, 3-β-glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. The Plant Cell Online **23:** 130-146

Robards AW (1971) The ultrastructure of plasmodesmata. Protoplasma **72:** 315-323

Robards AW, Lucas WJ (1990) Plasmodesmata. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **41:** 369-419

Roberts AG (2005) Plasmodesmal structure and development. Plasmodesmata**:** 1-32

Roberts AG, Cruz SS, Roberts IM, Prior DA, Turgeon R, Oparka KJ (1997) Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. The Plant Cell Online **9:** 1381-1396

Roberts AG, Oparka KJ (2003) Plasmodesmata and the control of symplastic transport. Plant, Cell & Environment **26:** 103-124

Roberts I, Boevink P, Roberts A, Sauer N, Reichel C, Oparka K (2001) Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. Protoplasma **218:** 31-44

Rossin A, Kral R, Lounnas N, Chakrabandhu K, Mailfert S, Marguet D, Hueber A-O (2010) Identification of a lysine-rich region of Fas as a raft nanodomain targeting signal necessary for Fas-mediated cell death. Experimental cell research **316:** 1513-1522

Ruan Y-L, Llewellyn DJ, Furbank RT (2001) The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K^+ transporters and expansin. The Plant Cell Online **13:** 47-60

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Kragler F (2004) The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. Curr Opin Plant Biol **7:** 641-650

Russin WA, Evert RF, Vanderveer PJ, Sharkey TD, Briggs SP (1996) Modification of a specific class of plasmodesmata and loss of sucrose export ability in the *sucrose export defective1* maize mutant. The Plant Cell Online **8:** 645-658

Rutschow HL, Baskin TI, Kramer EM (2011) Regulation of solute flux through plasmodesmata in the root meristem. Plant Physiol **155:** 1817-1826

Ryu SB (2004) Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. Trends Plant Sci **9:** 229-235

Sager R, Lee JY (2014) Plasmodesmata in integrated cell signalling: insights from development and environmental signals and stresses. J Exp Bot **65:** 6337-6358

Sagi G, Katz A, Guenoune-Gelbart D, Epel BL (2005) Class 1 reversibly glycosylated polypeptides are plasmodesmal-associated proteins delivered to plasmodesmata via the Golgi apparatus. The Plant Cell Online **17:** 1788-1800

Saito M, Saito M (2013) Involvement of sphingolipids in ethanol neurotoxicity in the developing brain. Brain sciences **3:** 670-703

Sambade A, Brandner K, Hofmann C, Seemanpillai M, Mutterer J, Heinlein M (2008) Transport of TMV movement protein particles associated with the targeting of RNA to plasmodesmata. Traffic **9:** 2073-2088

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor. *In*. New York: Cold spring harbor laboratory press

Samuilova O, Santala J, Valkonen JP (2013) Tyrosine phosphorylation of the triple gene block protein 3 regulates cell-to-cell movement and protein interactions of *Potato mop-top virus*. Journal of virology **87:** 4313-4321

Sánchez-Navarro J, Fajardo T, Zicca S, Pallás V, Stavolone L (2010) *Caulimoviridae* tubule-guided transport is dictated by movement protein properties. Journal of Virology **84:** 4109-4112

Sankarshanan M, Ma Z, Iype T, Lorenz U (2007) Identification of a novel lipid raft-targeting motif in Src homology 2-containing phosphatase 1. The Journal of Immunology **179:** 483-490

Sasaki N, Kaido M, Okuno T, Mise K (2005) Coat protein-independent cell-to-cell movement of bromoviruses expressing *Brome mosaic virus* movement protein with

an adaptation-related amino acid change in the central region. Archives of virology **150:** 1231-1240

Saxena IM, Brown Jr RM (2000) Cellulose synthases and related enzymes. Curr Opin Plant Biol **3:** 523-531

Schapire AL, Voigt B, Jasik J, Rosado A, Lopez-Cobollo R, Menzel D, Salinas J, Mancuso S, Valpuesta V, Baluska F (2008) Arabidopsis synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. The Plant Cell Online **20:** 3374-3388

Schenkel LC, Singh RK, Michel V, Zeisel SH, da Costa K-A, Johnson AR, Mudd HS, Bakovic M (2014) Mechanism of choline deficiency and membrane alteration in postural orthostatic tachycardia syndrome primary skin fibroblasts. The FASEB Journal**:** fj. 14-258566

Schmid KJ, Sörensen TR, Stracke R, Törjék O, Altmann T, Mitchell-Olds T, Weisshaar B (2003) Large-scale identification and analysis of genome-wide single nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. Genome Research **13:** 1250-1257

Schneider WJ, Vance DE (1979) Conversion of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine in rat liver. Partial purification and characterization of the enzymatic activities. Journal of Biological Chemistry **254:** 3886-3891

Schoelz JE, Harries PA, Nelson RS (2011) Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. Molecular plant **4:** 813-831

Scholthof HB (2005) Plant virus transport: motions of functional equivalence. Trends Plant Sci **10:** 376-382

Schrick K, Fujioka S, Takatsuto S, Stierhof YD, Stransky H, Yoshida S, Jürgens G (2004) A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and cellulose in *Arabidopsis*. The Plant Journal **38:** 227-243

Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. Plant Cell **18:** 1121-1133

Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Kröber S, Amasino RA, Coupland G (2006) The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. Genes & development **20:** 898-912

Seemanpillai M, Elamawi R, Ritzenthaler C, Heinlein M (2006) Challenging the role of microtubules in *Tobacco mosaic virus* movement by drug treatments is disputable. J Virol **80:** 6712-6715

Sessions A, Yanofsky MF, Weigel D (2000) Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. Science **289:** 779-781

Shahollari B, Peskan-Berghöfer T, Oelmüller R (2004) Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. Physiologia Plantarum **122:** 397-403

Shahollari B, Varma A, Oelmüller R (2005) Expression of a receptor kinase in *Arabidopsis* roots is stimulated by the basidiomycete *Piriformospora indica* and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. Journal of plant physiology **162:** 945-958

Shibata Y, Hu J, Kozlov MM, Rapoport TA (2009) Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. Annu Rev Cell Dev Biol **25:** 329-354

Shimizu T, Yoshii A, Sakurai K, Hamada K, Yamaji Y, Suzuki M, Namba S, Hibi T (2009) Identification of a novel tobacco DnaJ-like protein that interacts with the movement protein of *Tobacco mosaic virus*. Arch Virol **154:** 959-967

Silvius J (2005) Lipid microdomains in model and biological membranes: how strong are the connections? Quarterly reviews of biophysics **38:** 373-383

Simon-Plas F, Perraki A, Bayer E, Gerbeau-Pissot P, Mongrand S (2011) An update on plant membrane rafts. Current opinion in plant biology **14:** 642-649

Simons K, Vaz WL (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **33:** 269-295

Simpson C, Thomas C, Findlay K, Bayer E, Maule AJ (2009) An *Arabidopsis* GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking. Plant Cell **21:** 581-594

Sivaguru M, Fujiwara T, Šamaj J, Baluška F, Yang Z, Osawa H, Maeda T, Mori T, Volkmann D, Matsumoto H (2000) Aluminum-induced 1→ 3-β-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. Plant Physiol **124:** 991-1006

Soellick TR, Uhrig JF, Bucher GL, Kellmann JW, Schreier PH (2000) The movement protein NSm of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. Proc Natl Acad Sci U S A **97:** 2373-2378

Sokolova M, Prufer D, Tacke E, Rohde W (1997) The *Potato leafroll virus* 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. FEBS Lett **400:** 201-205

Stadler R, Wright KM, Lauterbach C, Amon G, Gahrtz M, Feuerstein A, Oparka KJ, Sauer N (2005) Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. The Plant Journal **41:** 319-331

Staehelin LA, Hepler PK (1996) Cytokinesis in higher plants. Cell **84:** 821-824

Stanley WM (1935) Isolation of a crystalline protein possessing the properties of *Tobacco mosaic virus*. Science **81:** 644-645

Starling A, Dalton K, East J, Oliver S, Lee A (1996) Effects of phosphatidylethanolamines on the activity of the Ca^{2+}-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Biochem. J **320:** 309-314

Stonebloom S, Burch-Smith T, Kim I, Meinke D, Mindrinos M, Zambryski P (2009) Loss of the plant DEAD-box protein ISE1 leads to defective mitochondria and increased cell-to-cell transport via plasmodesmata. Proc Natl Acad Sci U S A **106:** 17229-17234

Storms MM, Kormelink R, Peters D, Van Lent JW, Goldbach RW (1995) The nonstructural NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* induces tubular structures in plant and insect cells. Virology **214:** 485-493

Su S, Liu Z, Chen C, Zhang Y, Wang X, Zhu L, Miao L, Wang XC, Yuan M (2010) *Cucumber mosaic virus* movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco. Plant Cell **22:** 1373-1387

Tacke E, Prufer D, Schmitz J, Rohde W (1991) The *Potato leafroll* luteovirus 17k protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. Journal of General Virology **72:** 2035-2038

Tacke E, Schmitz J, Prüfer D, Rohde W (1993) Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of *Potato leafroll luteovirus* identifies an amphipathic α-helix as the domain for protein/protein interactions. Virology **197:** 274-282

Takeda A, Kaido M, Okuno T, Mise K (2004) The C-terminus of the movement protein of *Brome mosaic virus* controls the requirement for coat protein in cell-to-cell movement and plays a role in long-distance movement. Journal of general virology **85:** 1751-1761

Taliansky M, Mayo MA, Barker H (2003) *Potato leafroll virus:* a classic pathogen shows some new tricks. Molecular plant pathology **4:** 81-89

Tang N, Bamford P, Jones J, He M, Kane MA, Mooney SM, Bearer CF (2014) Choline partially prevents the impact of ethanol on the lipid raft dependent functions of L1 cell adhesion molecule. Alcoholism: Clinical and Experimental Research **38:** 2722-2730

Taoka K-i, Ham B-K, Xoconostle-Cázares B, Rojas MR, Lucas WJ (2007) Reciprocal phosphorylation and glycosylation recognition motifs control NCAPP1 interaction with pumpkin phloem proteins and their cell-to-cell movement. The Plant Cell Online **19:** 1866-1884

Tasseva G, Richard L, Zachowski A (2004) Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt stress involves choline kinases in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett **566:** 115-120

Terry B, Matthews E, Haseloff J (1995) Molecular characterization of recombinant green fluorescent protein by fluorescence correlation microscopy. Biochemical and biophysical research communications **217:** 21-27

Testerink C, Larsen PB, van der Does D, van Himbergen JA, Munnik T (2007) Phosphatidic acid binds to and inhibits the activity of *Arabidopsis* CTR1. J Exp Bot **58:** 3905-3914

Testerink C, Munnik T (2005) Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. Trends Plant Sci **10:** 368-375

Testerink C, Munnik T (2011) Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. J Exp Bot **62:** 2349-2361

Testerink N, van der Sanden MH, Houweling M, Helms JB, Vaandrager AB (2009) Depletion of phosphatidylcholine affects endoplasmic reticulum morphology and protein traffic at the Golgi complex. J Lipid Res **50:** 2182-2192

Thomas CL, Bayer EM, Ritzenthaler C, Fernandez-Calvino L, Maule AJ (2008) Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. PLoS Biol **6:** e7

Thompson Jr GA, Okuyama H (2000) Lipid-linked proteins of plants. Progress in lipid research **39:** 19-39

Thompson T, Tillack TW (1985) Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. Annual review of biophysics and biophysical chemistry **14:** 361-386

Thran M (2012) Identifizierung und Charakterisierung von Silencing Suppressoren in Arabidopsis. Universitätsbibliothek der Universität Erlangen-Nürnberg

Thran M, Link K, Sonnewald U (2012) The Arabidopsis *DCP2* gene is required for proper mRNA turnover and prevents transgene silencing in Arabidopsis. Plant J **72:** 368-377

Tian Q, Olsen L, Sun B, Lid SE, Brown RC, Lemmon BE, Fosnes K, Gruis DF, Opsahl-Sorteberg HG, Otegui MS, Olsen OA (2007) Subcellular localization and functional domain studies of DEFECTIVE KERNEL1 in maize and *Arabidopsis* suggest a model for aleurone cell fate specification involving CRINKLY4 and SUPERNUMERARY ALEURONE LAYER1. Plant Cell **19:** 3127-3145

Tilsner J, Amari K, Torrance L (2011) Plasmodesmata viewed as specialised membrane adhesion sites. Protoplasma **248:** 39-60

Traiffort E, O'Regan S, Ruat M (2013) The choline transporter-like family SLC44: Properties and roles in human diseases. Molecular aspects of medicine **34:** 646-654

Traiffort E, Ruat M, O'Regan S, Meunier FM (2005) Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants. J Neurochem **92:** 1116-1125

Trutnyeva K, Bachmaier R, Waigmann E (2005) Mimicking carboxyterminal phosphorylation differentially effects subcellular distribution and cell-to-cell movement of *Tobacco mosaic virus* movement protein. Virology **332:** 563-577

Tucker EB (1990) Calcium-loaded 1, 2-bis (2-aminophenoxy) ethane-N, N, N′, N′-tetraacetic acid blocks cell-to-cell diffusion of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. Planta **182:** 34-38

Tucker EB, Boss WF (1996) Mastoparan-induced intracellular Ca^{2+} fluxes may regulate cell-to-cell communication in plants. Plant physiology **111:** 459-467

Tucker JE, Mauzerall D, Tucker EB (1989) Symplastic transport of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea* is diffusive and includes loss to the vacuole. Plant Physiol **90:** 1143-1147

Turgeon R, Medville R (1998) The absence of phloem loading in willow leaves. Proceedings of the National Academy of Sciences **95:** 12055-12060

Turgeon R, Medville R (2004) Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. Plant Physiol **136:** 3795-3803

Turgeon R, Wolf S (2009) Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. Annu Rev Plant Biol **60:** 207-221

Uchiyama A, Shimada-Beltran H, Levy A, Zheng JY, Javia PA, Lazarowitz SG (2014) The Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates the cell-to-cell movement of diverse plant viruses. Front Plant Sci **5:** 584

Ueki S, Citovsky V (2005) Identification of an interactor of cadmium ion-induced glycine-rich protein involved in regulation of callose levels in plant vasculature. Proc Natl Acad Sci U S A **102:** 12089-12094

Uemura M, Joseph RA, Steponkus PL (1995) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. Plant Physiol **109:** 15-30

Ülker B, Peiter E, Dixon DP, Moffat C, Capper R, Bouche N, Edwards R, Sanders D, Knight H, Knight MR (2008) Getting the most out of publicly available T-DNA insertion lines. Plant Journal **56:** 665-677

Urbanus SL, Martinelli AP, Aizza LC, Dornelas MC, Angenent GC, Immink RG (2010) Intercellular transport of epidermis-expressed MADS domain transcription factors and their effect on plant morphology and floral transition. The Plant Journal **63:** 60-72

Üstün Ş (2013) Funktionelle Charakterisierung von Typ-III Effektorproteinen in Pflanzen (Dissertation). Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Üstün S, Bartetzko V, Börnke F (2013) The *Xanthomonas campestris* type III effector XopJ targets the host cell proteasome to suppress salicylic-acid mediated plant defence. PLoS pathogens **9:** e1003427

Valiyaveetil FI, Zhou Y, MacKinnon R (2002) Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K^+-channel. Biochemistry **41:** 10771-10777

van den Bogaart G, Meyenberg K, Risselada HJ, Amin H, Willig KI, Hubrich BE, Dier M, Hell SW, Grubmuller H, Diederichsen U, Jahn R (2011) Membrane protein sequestering by ionic protein-lipid interactions. Nature **479:** 552-555

van der Rest B, Boisson AM, Gout E, Bligny R, Douce R (2002) Glycerophosphocholine metabolism in higher plant cells. Evidence of a new glyceryl-phosphodiester phosphodiesterase. Plant Physiol **130:** 244-255

Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, Van den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort R, Schell J (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability.

van Meer G (2005) Cellular lipidomics. The EMBO Journal **24:** 3159-3165

van Meer G, Sprong H (2004) Membrane lipids and vesicular traffic. Curr Opin Cell Biol **16:** 373-378

van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. Nat Rev Mol Cell Biol **9:** 112-124

Vance DE (1990) Phosphatidylcholine metabolism: masochistic enzymology, metabolic regulation, and lipoprotein assembly. Biochemistry and Cell Biology **68:** 1151-1165

Vance DE, Li Z, Jacobs RL (2007) Hepatic phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, unexpected roles in animal biochemistry and physiology. Journal of Biological Chemistry **282:** 33237-33241

Vance DE, Ridgway ND (1988) The methylation of phosphatidylethanolamine. Progress in Lipid Research **27:** 61-79

Vatén A, Dettmer J, Wu S, Stierhof Y-D, Miyashima S, Yadav SR, Roberts CJ, Campilho A, Bulone V, Lichtenberger R (2011) Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. Developmental cell **21:** 1144-1155

Verchot-Lubicz J (2005) A new cell-to-cell transport model for potexviruses. Molecular plant-microbe interactions **18:** 283-290

Verchot-Lubicz J, Torrance L, Solovyev AG, Morozov SY, Jackson AO, Gilmer D (2010) Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses. Molecular plant-microbe interactions **23:** 1231-1247

Verma DPS, Hong Z (2001) Plant callose synthase complexes. Plant Mol Biol **47:** 693-701

Viehweger K (2002) Elicitor-activated phospholipase A_2 generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H^+ pool for pH signaling via the activation of Na^+-dependent proton fluxes. The Plant Cell Online **14:** 1509-1525

Vijayapalani P, Maeshima M, Nagasaki-Takekuchi N, Miller WA (2012) Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. PLoS Pathog **8:** e1002639

Viktorov A, Yurkiv V (2008) Effects of ethanol and lipopolysaccharide on the sphingomyelin cycle in rat hepatocytes. Bulletin of experimental biology and medicine **146:** 753-755

Voeltz GK, Prinz WA (2007) Sheets, ribbons and tubules - how organelles get their shape. Nature Reviews Molecular Cell Biology **8:** 258-264

Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM, Rapoport TA (2006) A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. Cell **124:** 573-586

Vogel F (2009) Molekulare Analyse des Makromolekültransports in Pflanzen anhand eines viralen Transportproteins. PhD thesis. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

Vogel F, Hofius D, Paulus KE, Jungkunz I, Sonnewald U (2011) The second face of a known player: Arabidopsis silencing suppressor AtXRN4 acts organ-specifically. New Phytol **189:** 484-493

Vogel F, Hofius D, Sonnewald U (2007) Intracellular trafficking of *Potato leafroll virus* movement protein in transgenic Arabidopsis. Traffic **8:** 1205-1214

Volkmann D, Mori T, Tirlapur U, Konig K, Fujiwara T, Kendrick-Jones J, Baluska F (2003) Unconventional myosins of the plant-specific class VIII: endocytosis, cytokinesis, plasmodesmata/pit-fields, and cell-to-cell coupling. Cell biology international **27:** 289-291

Voll L, Häusler RE, Hecker R, Weber A, Weissenböck G, Fiene G, Waffenschmidt S, Flügge U-I (2003) The phenotype of the *Arabidopsis cue1* mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway. The Plant Journal **36:** 301-317

von Bargen S, Salchert K, Paape M, Piechulla B, Kellmann JW (2001) Interactions between the *Tomato spotted wilt virus* movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. Plant Physiology and Biochemistry **39:** 1083-1093

Wada T, Kurata T, Tominaga R, Koshino-Kimura Y, Tachibana T, Goto K, Marks MD, Shimura Y, Okada K (2002) Role of a positive regulator of root hair development, *CAPRICE*, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. Development **129:** 5409-5419

Waigmann E, Chen MH, Bachmaier R, Ghoshroy S, Citovsky V (2000) Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of *Tobacco mosaic virus* cell-to-cell movement protein. EMBO J **19:** 4875-4884

Waigmann E, Citovsky V (2001) Phosphorylation of viral movement proteins - regulation of cell-to-cell trafficking. Trends in Microbiology **9:** 8

Waigmann E, Turner A, Peart J, Roberts K, Zambryski P (1997) Ultrastructural analysis of leaf trichome plasmodesmata reveals major differences from mesophyll plasmodesmata. Planta **203:** 75-84

Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K, Kudla J (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. Plant J **40:** 428-438

Wang C, Wang X (2001) A novel phospholipase D of Arabidopsis that is activated by oleic acid and associated with the plasma membrane. Plant Physiol **127:** 1102-1112

Wang X, Bogdanov M, Dowhan W (2002) Topology of polytopic membrane protein subdomains is dictated by membrane phospholipid composition. EMBO J **21:** 5673-5681

Wang X, Sager R, Cui W, Zhang C, Lu H, Lee JY (2013) Salicylic acid regulates Plasmodesmata closure during innate immune responses in *Arabidopsis*. Plant Cell **25:** 2315-2329

Watanabe Y, Ogawa T, Okada Y (1992) *In vivo* phosphorylation of the 30-kDa protein of *Tobacco mosaic virus*. FEBS Letters **313:** 181-184

Weichert N, Kaltenborn E, Hector A, Woischnik M, Schams A, Holzinger A, Kern S, Griese M (2011) Some *ABCA3* mutations elevate ER stress and initiate apoptosis of lung epithelial cells. Respir Res **12:** 4

Welti R, Li W, Li M, Sang Y, Biesiada H, Zhou HE, Rajashekar CB, Williams TD, Wang X (2002) Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis. J Biol Chem **277:** 31994-32002

Wen R-H, Hajimorad M (2010) Mutational analysis of the putative *pipo* of *Soybean mosaic virus* suggests disruption of PIPO protein impedes movement. Virology **400:** 1-7

Wenig U, Meyer S, Stadler R, Fischer S, Werner D, Lauter A, Melzer M, Hoth S, Weingartner M, Sauer N (2013) Identification of MAIN, a factor involved in genome stability in the meristems of *Arabidopsis thaliana*. Plant J **75:** 469-483

Weretilnyk EA, Smith DD, Wilch GA, Summers PS (1995) Enzymes of choline synthesis in spinach (response of phospho-base N-methyltransferase activities to light and salinity). Plant physiology **109:** 1085-1091

White R, Badelt K, Overall R, Vesk M (1994) Actin associated with plasmodesmata. Protoplasma **180:** 169-184

Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, Weigel D (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis. Science **309:** 1056-1059

Wille AC, Lucas WJ (1984) Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. Planta **160:** 129-142

Willmer C, Sexton R (1979) Stomata and plasmodesmata. Protoplasma **100:** 113-124

Wolf S, Deom CM, Beachy RN, Lucas WJ (1989) Movement protein of *Tobacco mosaic virus* modifies plasmodesmatal size exclusion limit. Science **246:** 377-379

Wolfenstetter S, Wirsching P, Dotzauer D, Schneider S, Sauer N (2012) Routes to the tonoplast: the sorting of tonoplast transporters in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. Plant Cell **24:** 215-232

Wright KM, Wood NT, Roberts AG, Chapman S, Boevink P, Mackenzie KM, Oparka KJ (2007) Targeting of TMV movement protein to plasmodesmata requires the actin/ER network: evidence from FRAP. Traffic **8:** 21-31

Xie B, Wang X, Zhu M, Zhang Z, Hong Z (2011) *CalS7* encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem. The Plant Journal **65:** 1-14

Xie J, Bogdanov M, Heacock P, Dowhan W (2006) Phosphatidylethanolamine and monoglucosyldiacylglycerol are interchangeable in supporting topogenesis and

function of the polytopic membrane protein lactose permease. Journal of Biological Chemistry **281:** 19172-19178

Xu XM, Jackson D (2010) Lights at the end of the tunnel: new views of plasmodesmal structure and function. Curr Opin Plant Biol **13:** 684-692

Xu XM, Wang J, Xuan Z, Goldshmidt A, Borrill PG, Hariharan N, Kim JY, Jackson D (2011) Chaperonins facilitate KNOTTED1 cell-to-cell trafficking and stem cell function. Science **333:** 1141-1144

Yamazaki T, Takata N, Uemura M, Kawamura Y (2010) *Arabidopsis* synaptotagmin SYT1, a type I signal-anchor protein, requires tandem C2 domains for delivery to the plasma membrane. Journal of Biological Chemistry **285:** 23165-23176

Yang JS, Gad H, Lee SY, Mironov A, Zhang L, Beznoussenko GV, Valente C, Turacchio G, Bonsra AN, Du G, Baldanzi G, Graziani A, Bourgoin S, Frohman MA, Luini A, Hsu VW (2008) A role for phosphatidic acid in COPI vesicle fission yields insights into Golgi maintenance. Nat Cell Biol **10:** 1146-1153

Yu L, Nie J, Cao C, Jin Y, Yan M, Wang F, Liu J, Xiao Y, Liang Y, Zhang W (2010) Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. New Phytol **188:** 762-773

Yuan Z, Chen H, Chen Q, Omura T, Xie L, Wu Z, Wei T (2011) The early secretory pathway and an actin-myosin VIII motility system are required for plasmodesmatal localization of the NSvc4 protein of *Rice stripe virus*. Virus Res **159:** 62-68

Zambryski P, Crawford K (2000) Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. Annual review of cell and developmental biology **16:** 393-421

Zauber H, Burgos A, Garapati P, Schulze WX (2014) Plasma membrane lipid-protein interactions affect signaling processes in sterol-biosynthesis mutants in *Arabidopsis thaliana*. Front Plant Sci **5:** 78

Zavaliev R, Sagi G, Gera A, Epel BL (2010) The constitutive expression of *Arabidopsis* plasmodesmal-associated class 1 reversibly glycosylated polypeptide impairs plant development and virus spread. J Exp Bot **61:** 131-142

Zavaliev R, Ueki S, Epel BL, Citovsky V (2011) Biology of callose (ß-1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. Protoplasma **248:** 117-130

Zeisel SH (1981) Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. Annual review of nutrition **1:** 95-121

Zeisel SH (1993) Choline phospholipids: signal transduction and carcinogenesis. The FASEB journal **7:** 551-557

Zeisel SH, Blusztajn JK (1994) Choline and human nutrition. Annual review of nutrition **14:** 269-296

Zeisel SH, Da Costa K, Franklin PD, Alexander EA, Lamont J, Sheard N, Beiser A (1991) Choline, an essential nutrient for humans. The FASEB journal **5:** 2093-2098

Zhang Q, Lin F, Mao T, Nie J, Yan M, Yuan M, Zhang W (2012) Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. Plant Cell **24:** 4555-4576

Zhang W, Bogdanov M, Pi J, Pittard AJ, Dowhan W (2003) Reversible topological organization within a polytopic membrane protein is governed by a change in membrane phospholipid composition. Journal of Biological Chemistry **278:** 50128-50135

Zhang W, Campbell HA, King SC, Dowhan W (2005) Phospholipids as determinants of membrane protein topology: phosphatidylethanolamine is required for the proper topological organizaton of the γ-aminobutric acid permease (GabP) of *Escherichia coli* Journal of Biological Chemistry **280:** 26032-26038

Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X (2004) Phospholipase D□1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. Proc Natl Acad Sci U S A **101:** 9508-9513

Zhang W, Wang C, Qin C, Wood T, Olafsdottir G, Welti R, Wang X (2003) The oleate-stimulated phospholipase D, PLD□, and phosphatidic acid decrease H_2O_2-induced cell death in Arabidopsis. Plant Cell **15:** 2285-2295

Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, Li M, Yan M, Wang R, Wang L, Welti R, Zhang W, Wang X (2009) Phospholipase D□1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. Plant Cell **21:** 2357-2377

Zhu T, Lucas W, Rost T (1998) Directional cell-to-cell communication in the *Arabidopsis* root apical meristem I. An ultrastructural and functional analysis. Protoplasma **203:** 35-47

Abkürzungsverzeichnis

A.thaliana	*Arabidopsis thaliana*
A. tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
ABA	Abszisinsäure (engl. *abscisic acid*)
BiFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaMV	*Cauliflower mosaic virus*
CAPS	*cleaved amplified polymorphic sequences*
cDNA	*copy desoxyribonucleic acid*, komplementäre DNA
cds	*coding sequence*, kodierende Sequenz
cm	Zentimeter
CP	*capsid/coat protein*, Kapsid-/Hüllprotein
CMV	*Cucumber mosaic virus*
Col-0	Columbia-0
d	Tag(e)
DD	*disordered domain*
DIM	*detergent-insoluble membrane*
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	*day(s) post infiltration/inoculation*, Tag(e) nach Infiltration
DT	Desmotubulus
E. coli	*Escherichia coli*
EMS	Etylmethansulfonat
ER	endoplasmatischen Retikulum
FEN	Fenpropimorph
FLIM	*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*
FRAP	*Fluorescence Recovery After Photobleaching*
FRET	*Förster Resonance Energy Transfer*
g	Gramm
xg	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GFP	*green fluorescent protein*, grün fluoreszierendes Protein

h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IN/Dels	Insertionen/Deletionen
kb	Kilobasen
kDa	kiloDalton
KLSM	Konfokale Laserscanning Mikroskopie
l	Liter
Ler	Landsberg *erecta*
M/m	Mol/molar
Mbp	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MP	Movementprotein
NCAP	*non cell autonomous protein*
nm	Nanometer
oD600	optische Dichte bei 600 nm
Pcz	Propiconazol
PD	Plasmodesmata
PtdCho	Phosphatidylcholin
PA	*Phosphatidic acid*, Phosphatidsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PLRV	*Potato leafroll virus*
PM	Plasmamembran
PtdIns	Phosphatidylinositol
PthEth	Phosphatidylethanolamin
PVX	*Potato virus X*
PVY	*Potato virus Y*
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	*reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies
rpm	*revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde(n)
S	Serin

SAM	*shoot apical meristem*, Sprossapikalmeristem
SEL	*size exclusion limit*, molekulare Ausschlussgröße der PD
siRNAs	*small interfering RNA*
SNP	*single nucleotide polymorphism*
SL	Sphingolipide
SSLP	*simple sequence length polymorphism*
St	Sterole
TLC	Dünnschichtchromatographie
TMV	*Tobacco mosaic virus*
TMD	Transmembrandomänen
VLCFA	*very long chain fatty acids*, langkettige Fettsäuren
vRNA	virale RNA
WT	Wildtyp
ZW	Zellwand
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Anhang

Tabelle 17: Verwendete Oligonukleotide für Deletionsanalysen, Substitutionen, *cher1-4* und amiRNA_*CHER1,* RT-PCR sowie Lokalisierung und BIFC.

Konstrukt	Primer	Sequenz 5' – 3'
Deletionen		
MP17fl	KL1	CACCAACAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGG
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17Δ 1-18	KL3	CACCAACAATGGGCGCGCTAACAGAGTTCAGCC
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17Δ 110-156	KL1	CACCAACAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGG
	KL4	GAAGTAAGATGCTTGTGATCTTATACTCATGG
MP17Δ 1-109	KL7	CACCAACAATGAGTTCGTCAGCGAGG
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17Δ 1-99	KL20	CACCAACAATGATGAGTATAAGATCACAAGCATCTTACTTC
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17Δ 1-89	KL21	CACCAACAATGCATTCAAGGATGGAATACTCAAGGC
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17Δ 1-79	KL22	CACCAACAATGCCTTCGGGCCGAGTCTATCAG
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17Δ 1-66	KL23	CACCAACAATGCAAAGGACAACCTCATGGGCAAC
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17Δ 1-53	KL24	CACCAACAATGTTCCCCGAGGACGAGGC
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17Δ 1-40	KL25	CACCAACAATGGTAGAAGAGGAGGCAATCGCCG
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17Δ 1-27	KL26	CACCAACAATGTTATGGTCACGGCCTCTGGG
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
Substitutionen		
MP17A69-81		
A	KL1	CACCAACAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGG
	KL28	AGTCTGATAGACTCGGCCCGCAGGTGCAACTTCCTTGGGAGCTGCCCATGCG GCTGCCCTTTGTAAACACGAATGTC

B	KL27	GACATTCGTGTTTACAAAGGGCAGCCGCATGGGCAGCTCCCAAGGAAGTTGC ACCTGCGGGCCGAGTCTATCAGACT
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17A136-143		
A	KL1	CACCAACAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGG
	KL13	CGCCGCCCTTCGTAATTTGGCAGCCGCGGCCGCAGGAGCGGCGGGATGATA CTTTGCAATGGG
B	KL12	CCCATTGCAAAGTATCATCCCGCCGCTCCTGCGGCCGCGGCTGCCAAATTAC GAAGGGCGGCG
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17AaII		Template MP17A136-143, Primer wie bei MP17A69-81
MP17D71		
A	KL1	CACCAACAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGG
	KL30	CTTGGGAGCTGCCCAGTCGGCTGCCCTTTGTAA
B	KL29	TTACAAAGGGCAGCCGACTGGGCAGCTCCCAAG
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17D79		
A	KL1	CACCAACAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGG
	KL32	GACTCGGCCCGCAGGGTCAACTTCCTTGGGAGC
B	KL31	GCTCCCAAGGAAGTTGACCCTGCGGGCCGAGTC
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
MP17D7179		Template MP17D71, Primer wie bei MP17D79
MP17Δ110-156D71		Template MP17D71, Primer wie bei MP17Δ 110-156
MP17K1		
A	KL1	CACCAACAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGG
	KL122	GAAGGTGAAACTTCCCTGGGAGTTGCCCATG
B	KL121	CATGGGCAACTCCCAGGGAAGTTTCACCTTC
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC

MP17K2		
K2 fw	KL123	CACCATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGGAGGCGAAGAAGGCAATCCCTT
K2 rv	KL124	TCCGCGCCTGATAAGTCTTGGCGCCGCCCTTCGTAATCTGGAACTTGTTGACGTAGGACTGGAGGGATGATACCTTGCAATGGGG
Primer für Überlagerung von A and B	KL1	CACCAACAATGTCAATGGTGGTGTACAACAACCAAGG
	KL2	TCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
Kandidaten-Sequenzierung		
Seq. SNP K1_ fw	KL97	CGTCACAAGGTATTGAGAATTCACTCATAG
Seq. SNP K1_ rv	KL98	TTCTTCCTCTGTTTCTCTTGCTTCTTC
Seq. SNP K2_ fw	KL99	GTGTGGGAGCCCTATGACAGC
Seq. SNP K2_ rv	KL100	GCATGATAAACACGTTTGAGTTCCTTATGATC
Seq. SNP K3_ fw	KL101	CAGCAGATGGGTGGTGTTAATATTCAAG
Seq. SNP K3_ rv	KL102	ACATGAAAGTATGGGTCATGCTCACC
CHER1 T-DNA Insertionslinie und amiRNA-Klonierung		
cher1-4 LP	KL63	ATGAAGTGGATGGCGTTACAG
cher1-4 RP	KL64	GTATCATCAGAAGGTGCAGGG
SALK LBb1.3	KL107	ATTTTGCCGATTTCGGAAC
Seq. Insertion fw 1	KL117	TCCGCCGAATTCTCATGGCA
Seq. Insertion fw 2	KL118	CGGTTAACCGTAATGCCTACATAATG
amiRNA_*CHER* I	KL111	gaTATTGACAATCATTGAAGCCCtctctctttgtattcc
amiRNA_*CHER* II	KL112	gaGGGCTTCAATGATTGTCAATAtcaaagagaatcaatga
amiRNA_*CHER* III	KL113	gaGGACTTCAATGATAGTCAATTtcacaggtcgtgatatg
amiRNA_*CHER* IV	KL114	gaAATTGACTATCATTGAAGTCCtctacatatatattcct
amiRNA A	KL115	CTG CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA C
amiRNA B	KL116	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA G
CHER1 und ami_*CHER1* RT-PCR		
Seq. SNP K3_ fw	KL101	CAGCAGATGGGTGGTGTTAATATTCAAG
RT CHER1 neu rv	KL157	TAGCAGCTACCTTGAGGACTG

AtAct1-5’	KL8	GCGATGAAGCTCAATCCAAACGAGG
AtAct1-3’	KL9	GGTCACGACCAGCAAGATCAAGACG
CHER1 Lokalisierung und BIFC		
NotI-At3g15380 TOPO fw	KL164	GCGGCCGCCCCTTCACCATGAGAGGACCTTTAGGAGCA
At3g15380-Stop-AscI TOPO rv	KL165	GGCGCGCCACCCTTGTGAGTAAGACTCTGAACCTCT
At3g15380+Stop-AscI TOPO rv	KL166	GGCGCGCCACCCTTTCAGTGAGTAAGACTCTGAACCTCT
MP17fl rv - Stop	KL180	TCATCCGCGCTTGATAAGTTTTGGC
Seq. CHER1_fw1	KL154	GGCTCTTGGTTCACTCATTGT
Seq. CHER1_fw2	KL155	CGGTTAACCGTAATGCCTACATAATG
Seq. CHER1_rv	KL156	TCATCCCCGCTATTACCTGTTT
Nachweis von MP17		
LB1 (FV56)	KL158	GCC CTT TGA CGT TGG AGT CCA CGT TC
NM_genom2 (FV172)	KL159	GTGTTCGTGTGTGTATATGACTACGGC
NM_genom_1 (FV (171)	KL160	CAACTTACGGCAGAGTAAAAATCGC

Tabelle 18: SSLP-Marker nach Lukowitz et al. (2000) für Grobkartierung.

Primer		Sequenz 5’ – 3’	Position [bp]	Col-0	L*er*
Chromosom 1					
F21M12	1	TTACTTTTTGCCTCTTGTCATTG	3212191	200	< 200
	2	GGCTTTCTCGAAATCTGTCC			
ciw12	1	AGGTTTTATTGCTTTTCACA	9621344	128	115
	2	CTTTCAAAAGCACATCACA			
ciw1	1	ACATTTTCTCAATCCTTACTC	18367549	159	135
	2	GAGAGCTTCTTTATTTGTGAT			
nga280	1	GGCTCCATAAAAAGTGCACC	20877364	105	85
	2	CTGATCTCACGGACAATAGTGC			
nga111	1	TGTTTTTTAGGACAAATGGCG	27356874	130	162
	2	CTCCAGTTGGAAGCTAAAGGG			
Chromosom 2					
ciw2	1	CCCAAAAGTTAATTATACTGT	1194603	105	90
	2	CCGGGTTAATAATAAATGT			

ciw3	1	GAAACTCAATGAAATCCACTT	6409928	230	200
	2	TGAACTTGTTGTGAGCTTTGA			
nga1126	1	GCACAGTCCAAGTCACAACC	11702237	191	199
	2	CGCTACGCTTTTCGGTAAAG			
nga168	1	GAGGACATGTATAGGAGCCTCG	16298919	151	135
	2	TCGTCTACTGCACTGCCG			
Chromosom 3					
nga162	1	CTCTGTCACTCTTTTCCTCTGG	4608284	107	89
	2	CATGCAATTTGCATCTGAGG			
ciw11	1	CCCCGAGTTGAGGTATT	9775545	179	230
	2	GAAGAAATTCCTAAAGCATTC			
ciw4	1	GTTCATTAAACTTGCGTGTGT	6409928	190	215
	2	TACGGTCAGATTGAGTGATTC			
nga6	1	ATGGAGAAGCTTACACTGATC	23042025	143	123
	2	TGGATTTCTTCCTCTCTTCAC			
Chromosom 4					
ciw5	1	GGTTAAAAATTAGGGTTACGA	737954	164	144
	2	AGATTTACGTGGAAGCAAT			
ciw6	1	CTCGTAGTGCACTTTCATCA	7892620	162	148
	2	CACATGGTTAGGGAAACAATA			
ciw7	1	AATTTGGAGATTAGCTGGAAT	11524362	130	123
	2	CCATGTTGATGATAAGCACAA			
nga1107	1	CGACGAATCGACAGAATTAGG	18096131	150	140
	2	GCGAAAAAACAAAAAAATCCA			
Chromosom 5					
CTR1.2	1	CCACTTGTTTCTCTCTCTAG	979763	159	143
	2	TATCAACAGAAACGCACCGAG			
ciw8	1	TAGTGAAACCTTTCTCAGAT	7485588	100	135
	2	TTATGTTTTCTTCAATCAGTT			
PHYC	1	CTCAGAGAATTCCCAGAAAAATCT	14025127	207	222
	2	AAACTCGAGAGTTTTGTCTAGATC			
ciw9	1	CAGACGTATCAAATGACAAATG	17061229	165	145
	2	GACTACTGCTCAAACTATTCGG			
ciw10	1	CCACATTTTCCTTCTTTCATA	24548097	140	130
	2	CAACATTTAGCAAATCAACTT			

Tabelle 19: Liste aller Oligonukleotide zur Kartierung der Mutante SO15A

	Primer		**Sequenz 5' – 3'**	**Position [bp]**	**Col-0**	***Ler***
M1	3-AC016827-0956	1	ATTTGTAGATCGTTGAACAT	2243047	129	117
		2	TTAGTGCAATAACAGAGAGA			
M2	3-AB022219-2564	1	GAATCTTGTAATCTGGTGC	6014083	173	143
		2	TACGTATACTTATTCAGTTGATC			
M3	3-AB025634-3261	1	TAACCACAGCTATGAGGTCG	7649966	192	179
		2	GATTGATAACTTTAATTGGCCC			
M4	3-AP000382-3764	1	GCCATTTTGGGAATGAAAC	8829586	105	96
		2	GGGTGAAAGGTGAAAACTCT			

M5	3-AB022220-2047	1	TGATTGATACATGGAGTTAC	4801108	155	144
		2	AAGTGAGCATAAGCATATTC			
M6	3-AP000370-2145	1	TGACTGCTTGCACGTGAT	5032563	106	97
		2	CTCTCTTCCGCCGCGAAAT			
M7	3-AB017071-2266	1	TCGTGTTTTTGTCCAAAGTT	5315290	188	167
		2	CGGGTCTGCTCATTCTTC			
M8	3-AC001645-2352	1	CGTCGTTTAGTGGATGTGTA	5518698	188	149
		2	CGGTGATAATGATTAATGAG			
M9	3-AB022217-2402	1	ACCTGTTCAGTCTATGTTAC	5634662	218	165
		2	GGGAATTATTAACATTATCA			
M10	3-AB022217-2433	1	TTAACTGTTTTGTGGTAGTC	5707030	183	161
		2	TGTGTATTCCCACTATACTG			
M11	3-AB026636-2493	1	CGCAAATTTTAATCGGTGA	5847694	159	120
		2	AGAGATCCACGCAAGCTCTA			
M12	470487	1	AGAAGCATCGTTTTCATGTC	4825425	128	119
		2	CGTCAACGTACCACACA			
M13	470473	1	ATTTAGGAGGCGATGGC	4862259	120	108
		2	AAGGAAGCTTTGTATCGCT			
M14	CER454153	1	CACCTTTATAAAGGATCCAGA	5024647	143	132
		2	AAAAAAAACAGGATCGTGTG			
M15	CER456061	1	TATATAGTTTACAAGACGTCCG	5264625	115	107
		2	TGTTGGTTTGGTTGTAGA			

Tabelle 20: *Next-generation sequencing* SNP-Analyse der 402 kb Region. In den 402 kb auf Chromosom 3 zwischen Position 4862259 bp und 5264624 bp konnten insgesamt 198 SNPs identifiziert werden. Die Mutation, die den Phänotyp in SO15A auslöst, muss homozygot vorliegen, was für nur 35 der 198 SNPs der Fall war (siehe Tabellenspalte „heterozygot"; FALSCH, wenn homozygot). Von diesen 35 SNPs lagen sechs SNPs nicht in Exons (lila unterlegt), 22 SNPs wurden bereits bei einer SNP-Analyse zwischen Col-0 mit Bur-0 und Tsu-1 (Ossowski et al., 2008; grau unterlegt) beschrieben und drei SNPs (hellblau unterlegt) erhielten bei TAIR Treffer in „*transposable element genes*". Von den vier restlichen Kandidaten (türkis unterlegt) fiel SNP#147 weg, da es sich hierbei um eine stumme Mutation (Leucin bleibt erhalten) handelt, wodurch SNP#144, SNP#168 und SNP#196 als potentiell Phänotyp-auslösende SNPs in der Mutante SO15A übrig blieben.

Seqid	Start	Score	Genotyp	Referenz	Coverage	heterozygot
Chr3	4862244	0	Y	T	26	WAHR
Chr3	4862278	0	R	A	41	WAHR
Chr3	4862483	0	Y	T	39	WAHR
Chr3	4862581	0,264717	C	T	15	FALSCH
Chr3	4862603	0	S	G	17	WAHR
Chr3	4862687	0,000158	M	C	12	WAHR
Chr3	4862708	0,44198	G	A	6	FALSCH
Chr3	4862720	0	T	A	8	FALSCH
Chr3	4862881	0	W	T	33	WAHR
Chr3	4862906	0	K	T	24	WAHR
Chr3	4863018	0	K	T	45	WAHR
Chr3	4863028	0	K	T	43	WAHR
Chr3	4864524	0	M	A	51	WAHR

Chr3	4865035	0	K	G	42	WAHR
Chr3	4865155	0	K	G	42	WAHR
Chr3	4865325	0	M	A	43	WAHR
Chr3	4865620	0	Y	T	34	WAHR
Chr3	4866132	0,095616	W	A	8	WAHR
Chr3	4866318	0	Y	C	33	WAHR
Chr3	4866411	0,046139	Y	T	22	WAHR
Chr3	4866866	0	K	T	24	WAHR
Chr3	4866882	0,001194	W	A	18	WAHR
Chr3	4867414	0,004923	Y	T	14	WAHR
Chr3	4867651	0,093113	Y	C	15	WAHR
Chr3	4867654	0,062242	K	T	11	WAHR
Chr3	4867660	0,000042	Y	C	12	WAHR
Chr3	4868045	0	R	G	33	WAHR
Chr3	4868831	0,028158	M	C	33	WAHR
Chr3	4869091	0,002698	Y	C	28	WAHR
Chr3	4869104	0	Y	T	38	WAHR
Chr3	4869618	0	Y	T	32	WAHR
Chr3	4869709	0,002579	R	A	11	WAHR
Chr3	4872438	0,000556	Y	T	19	WAHR
Chr3	4872912	0,834658	G	A	37	FALSCH
Chr3	4872988	0	S	G	26	WAHR
Chr3	4873013	0	Y	T	32	WAHR
Chr3	4873522	0	M	A	15	WAHR
Chr3	4873526	0	A	T	8	FALSCH
Chr3	4873567	0	W	T	32	WAHR
Chr3	4873876	0,000069	R	A	13	WAHR
Chr3	4874486	0,022435	S	G	15	WAHR
Chr3	4874896	0,000325	R	G	17	WAHR
Chr3	4875045	0	S	G	25	WAHR
Chr3	4876178	0	M	C	26	WAHR
Chr3	4876326	0	S	G	41	WAHR
Chr3	4876347	0	Y	T	17	WAHR
Chr3	4876448	0	S	C	40	WAHR
Chr3	4876781	0	S	G	17	WAHR
Chr3	4876841	0,00066	S	G	18	WAHR
Chr3	4876847	0,003535	M	A	19	WAHR
Chr3	4876964	0	Y	C	31	WAHR
Chr3	4877003	0	R	A	55	WAHR
Chr3	4877346	0,097286	S	C	13	WAHR
Chr3	4877357	0,327595	C	A	15	FALSCH
Chr3	4877614	0	A	G	20	FALSCH
Chr3	4877682	0	Y	C	45	WAHR

Chr3	4877923	0	K	T	21	WAHR
Chr3	4877932	0	M	C	16	WAHR
Chr3	4877961	0,081829	R	A	8	WAHR
Chr3	4878113	0,000204	Y	T	30	WAHR
Chr3	4878115	0	Y	T	30	WAHR
Chr3	4878119	0	R	G	34	WAHR
Chr3	4878282	0	Y	C	32	WAHR
Chr3	4878298	0	Y	T	43	WAHR
Chr3	4878471	0	Y	C	35	WAHR
Chr3	4878545	0	K	T	29	WAHR
Chr3	4879048	0,073761	M	C	16	WAHR
Chr3	4879580	0,089232	S	G	14	WAHR
Chr3	4880140	0	S	C	17	WAHR
Chr3	4880247	0,000024	R	A	17	WAHR
Chr3	4880925	0	M	C	53	WAHR
Chr3	4881427	0	W	A	29	WAHR
Chr3	4881431	0	W	T	33	WAHR
Chr3	4882412	0	Y	C	36	WAHR
Chr3	4883280	0	K	T	32	WAHR
Chr3	4883417	0	Y	C	42	WAHR
Chr3	4883651	0	R	A	38	WAHR
Chr3	4883683	0	R	A	31	WAHR
Chr3	4883815	0	M	A	29	WAHR
Chr3	4884124	0	W	A	53	WAHR
Chr3	4884516	0	Y	T	44	WAHR
Chr3	4886836	0	M	A	32	WAHR
Chr3	4886865	0,003714	Y	C	26	WAHR
Chr3	4887028	0	S	G	26	WAHR
Chr3	4887087	0,008059	Y	T	18	WAHR
Chr3	4887122	0	S	C	33	WAHR
Chr3	4887139	0,002831	Y	T	25	WAHR
Chr3	4887195	0	W	A	34	WAHR
Chr3	4887228	0	S	C	36	WAHR
Chr3	4887349	0	M	A	54	WAHR
Chr3	4887442	0	S	G	33	WAHR
Chr3	4887920	0	K	G	34	WAHR
Chr3	4888880	0	W	A	15	WAHR
Chr3	4888909	0,00016	R	G	22	WAHR
Chr3	4888921	0,08643	Y	T	26	WAHR
Chr3	4888923	0,009797	Y	C	26	WAHR
Chr3	4888954	0,016784	R	G	25	WAHR
Chr3	4888961	0,004346	K	G	19	WAHR
Chr3	4888986	0,000238	M	A	10	WAHR

Chr3	4894818	0,001701	W	A	9	WAHR
Chr3	4911455	0	R	G	18	WAHR
Chr3	4913779	0,000015	A	T	4	FALSCH
Chr3	4914783	0,000065	R	G	16	WAHR
Chr3	4917930	0,006571	Y	C	10	WAHR
Chr3	4920360	0	M	A	18	WAHR
Chr3	4922199	0,000201	W	A	18	WAHR
Chr3	4924271	0	M	A	23	WAHR
Chr3	4925640	0	S	C	13	WAHR
Chr3	4925965	0,015758	W	T	13	WAHR
Chr3	4926041	0	Y	T	40	WAHR
Chr3	4927839	0,001845	Y	T	54	WAHR
Chr3	4927917	0	W	A	44	WAHR
Chr3	4927927	0	R	A	38	WAHR
Chr3	4928105	0	R	A	26	WAHR
Chr3	4928120	0,000198	R	G	17	WAHR
Chr3	4928187	0	R	G	19	WAHR
Chr3	4928229	0,000776	S	C	30	WAHR
Chr3	4928243	0,001699	W	T	32	WAHR
Chr3	4928342	0	R	G	51	WAHR
Chr3	4928926	0,096987	Y	T	9	WAHR
Chr3	4929099	0,061407	R	G	17	WAHR
Chr3	4929339	0,000115	Y	T	11	WAHR
Chr3	4929342	0,097136	Y	C	11	WAHR
Chr3	4929683	0,000967	Y	T	15	WAHR
Chr3	4930182	0,018963	R	A	19	WAHR
Chr3	4931335	0	A	G	6	FALSCH
Chr3	4931754	0,001759	Y	C	12	WAHR
Chr3	4932735	0,022405	W	T	9	WAHR
Chr3	4932914	0,000232	W	A	11	WAHR
Chr3	4932927	0,00259	R	G	11	WAHR
Chr3	4934019	0,048394	Y	C	10	WAHR
Chr3	4935694	0	S	G	32	WAHR
Chr3	4936385	0,000024	W	T	11	WAHR
Chr3	4936983	0,01165	W	T	22	WAHR
Chr3	4937361	0	W	T	21	WAHR
Chr3	4939813	0	C	A	11	FALSCH
Chr3	4939842	0	G	C	8	FALSCH
Chr3	4939889	0	T	A	12	FALSCH
Chr3	4939992	0,000425	R	G	9	WAHR
Chr3	4940015	0,05288	Y	C	6	WAHR
Chr3	4940306	0,011348	R	G	6	WAHR
Chr3	4940447	0,001512	M	C	26	WAHR

Chr3	4940550	0	C	T	10	FALSCH
Chr3	4940915	0	C	G	7	FALSCH
Chr3	4941639	0	A	T	9	FALSCH
Chr3	4942652	0,093441	Y	C	19	WAHR
Chr3	4942932	0,013115	A	G	19	FALSCH
Chr3	4943377	0,001356	W	T	21	WAHR
Chr3	4943387	0,026255	Y	T	13	WAHR
Chr3	4943573	0,004724	Y	T	10	WAHR
Chr3	4943817	0,053961	K	G	6	WAHR
Chr3	4943857	0,096837	Y	C	9	WAHR
Chr3	4944429	0,020703	Y	T	9	WAHR
Chr3	4944621	0,907846	A	T	18	FALSCH
Chr3	4944732	0	M	C	24	WAHR
Chr3	4944817	0,677562	G	A	5	FALSCH
Chr3	4944835	0,677562	A	C	5	FALSCH
Chr3	4944916	0,082662	W	A	7	WAHR
Chr3	4951532	0	K	G	35	WAHR
Chr3	4957499	0,000077	Y	C	17	WAHR
Chr3	4957679	0,000024	M	C	16	WAHR
Chr3	4957699	0,012073	K	T	7	WAHR
Chr3	4957985	0,000015	A	T	4	FALSCH
Chr3	4958396	0	R	A	23	WAHR
Chr3	4958405	0	M	A	20	WAHR
Chr3	4959685	0	S	C	21	WAHR
Chr3	4961402	0,007268	K	G	10	WAHR
Chr3	4963078	0,672656	C	A	4	FALSCH
Chr3	4963187	0,613459	A	C	6	FALSCH
Chr3	4963793	0,000195	M	A	12	WAHR
Chr3	4966851	0,003707	Y	C	11	WAHR
Chr3	4968502	0	A	G	8	FALSCH
Chr3	4973605	0,036205	M	C	11	WAHR
Chr3	4974948	0	R	A	23	WAHR
Chr3	4976914	0,030826	M	A	8	WAHR
Chr3	4977056	0,013106	M	A	7	WAHR
Chr3	4978028	0,074319	R	G	5	WAHR
Chr3	4980393	0	G	C	5	FALSCH
Chr3	4980495	0,842801	G	T	4	FALSCH
Chr3	4980849	0	T	A	5	FALSCH
Chr3	4982119	0	A	G	6	FALSCH
Chr3	4982254	0	T	C	5	FALSCH
Chr3	4987666	0,794529	C	A	3	FALSCH
Chr3	5004923	0,083696	K	T	18	WAHR
Chr3	5005485	0,000112	R	G	16	WAHR

Chr3	5029861	0	M	C	13	WAHR
Chr3	5070965	0,003686	W	T	22	WAHR
Chr3	5152245	0,0784	R	G	6	WAHR
Chr3	5152264	0,003906	T	C	3	FALSCH
Chr3	5154088	0,000015	A	T	4	FALSCH
Chr3	5154717	0	C	T	6	FALSCH
Chr3	5156322	0	C	T	6	FALSCH
Chr3	5156523	0,613459	G	C	6	FALSCH
Chr3	5168375	0	W	A	15	WAHR
Chr3	5168379	0,000261	K	T	14	WAHR
Chr3	5194520	0	A	G	17	FALSCH
Chr3	5261337	0,001215	M	A	13	WAHR
Chr3	5272057	0,097806	W	A	4	WAHR

Tabelle 21: Transkriptionelle Veränderungen von Genen, die mit dem Lipid Metabolismus assoziiert wurden. Gezeigt sind die transkriptionellen Veränderungen der identifizierten Loci als absolute Expressionsänderung (FC_{abs}) von *cher1-5* und *cher1-4* vs Col-0. Die potentielle Funktion wurde mittels Abgleich der Gene mit dem Kapitel "Acyl-Lipid Metabolism" des „Arabidopsis book" (Li-Beisson et al., 2013) und der TAIR Annotation ermittelt.

Locus	**Annotation**	**FC_{abs} vs Col-0** ***cher1-5***	***cher1-4***	**Potentielle Funktion**
Hochregulierte Transkripte				
AT2G28630	3-ketoacyl-CoA synthase 12	+ 13,5	+ 5,8	synthesis of VLCFA
AT4G29900	$Ca2^+$-transporting ATPase	+ 2,5	+ 2,6	PD, activated by calmodulin, transport of $Ca2^+$ from cytosol to ER
AT5G58570	hypothetical protein	+ 2,6	+ 2,6	
AT3G15650	phospholipase/carboxyl-esterase family protein	+ 3,9	+ 5,5	
AT2G02810	UDP-galactose transporter 1	+ 2,6	+ 2,5	plastid glycerolipid synthesis, transport of UDP-galactose and UDP-glucose from cytoplasm into Golgi and ER to ensure quality control of protein folding
AT4G34138	UDP-glucosyl transferase 73B1	+ 2,3	+ 2,1	plastid glycerolipid synthesis
AT2G26480	UDP-glucosyl transferase 76D1	+ 7,7	+ 8,1	
AT3G17770	Dihydroxyacetone kinase	+ 2,3	+ 2,1	galactolipid biosynthesis
AT2G38180	GDSL esterase/lipase	+ 4,2	+ 3,2	
AT4G15230	ABC transporter G family member 30	+ 3,8	+ 2,9	
Herunterregulierte Transkripte				
AT1G06080	delta-9 acyl-lipid desaturase 1	- 50,0	- 52,4	homologous to delta 9 acyl-lipid desaturases of cyanobacteria and acyl-CoA desaturases of yeast and mammals, involved in desaturation of VLCFAs to make monounsaturated VLCFAs, ER
AT4G34250	3-ketoacyl-CoA synthase 16	- 3,1	- 2,5	synthesis of VLCFA → sphingolipid synthesis, cuticular wax biosynthesis
AT1G65890	acyl activating enzyme 12	- 26,7	- 10,9	activates carboxylic acids by forming acyl CoAs
AT1G51300	acyl-protein thioesterase-related protein	- 2,1	- 2,2	
AT5G16340	AMP-binding protein 6	- 2,7	- 2,2	activates carboxylic acids by forming acyl CoAs
AT1G06100	delta-9 desaturase-like 2 protein	- 5,5	- 3,8	
AT5G63770	diacylglycerol kinase 2	- 3,2	- 2,9	golgi vesicle transport, generation of PA, involved in root elongation and plant development
AT5G22500	fatty acyl-CoA reductase 1	- 5,4	- 6,5	suberin biosynthetic process

AT3G44560	fatty acyl-CoA reductase 8	- 4,6	- 6,4	
AT2G38110	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6	- 2,6	- 2,8	synthesis of cardiolipin, involved in cutin assembly, phosphatidylglycerol biosynthetic process
AT2G38010	neutral ceramidase	- 2,1	- 2,0	hydrolysis of sphingolipid ceramide into sphingosine and free fatty acids, PD
AT2G38530	non-specific lipid-transfer protein 2	- 5,1	- 6,2	transfer of phospholipids over membranes, may play a role in wax or cutin deposition in cell walls of expanding epidermal cells and certain secretory tissues
AT5G61610	oleosin-like protein	- 4,5	- 3,6	lipid storage
AT4G34650	squalene synthase 2	- 2,0	- 2,1	sterol biosynthetic process
AT3G63200	PATATIN-like protein 9	- 5,9	- 3,7	lipid metabolic process, regulation of meristem growthPLAIIIB
AT3G23840	HXXXD-type acyl-transferase-like protein	- 2,3	- 2,0	wax biosynthesis
AT3G26125	cytochrome P450, family 86, subfamily C, polypeptide 2	- 5,1	- 9,1	cutin biosynthesis
AT1G65450	HXXXD-type acyl-transferase-like protein	- 9,3	- 7,2	cutin biosynthesis
AT5G41040	omega-hydroxypalmitate O-feruloyl transferase	- 18,6	- 20,7	suberin synthesis
AT5G25390	ethylene-responsive transcription factor SHINE 3	- 6,0	- 5,1	cuticular wax biosynthesis
AT5G11190	ethylene-responsive transcription factor SHINE 2	- 6,7	- 5,8	cuticular wax biosynthesis
AT3G28345	ABC transporter B family member 15	- 5,6	- 5,9	suberin formation
AT2G39350	ABC transporter G family member 1	- 4,5	- 5,2	suberin formation
AT2G37280	ABC transporter G family member 33	- 2,8	- 2,6	suberin formation
AT4G22010	protein SKU5 similar 4	- 2,2	- 2,3	PD, sterol biosynthesis
AT1G78500	pentacyclic triterpene synthase 6	- 3,5	- 3,0	sterol biosynthesis
AT2G45400	dihydroflavonol 4-reductase-like protein	- 2,7	- 2,6	sterol synthesis, regulation of BR levels, inactivation of BR
AT2G47780	Rubber elongation factor protein (REF)	- 3,6	- 4,6	fatty acid catabolic process
AT1G62290	phytepsin	- 3,4	- 2,7	lipid metabolic process
AT5G38020	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase-like protein	- 2,7	- 2,1	fatty acid synthesis, xylem development
AT1G24735	caffeoyl-CoA O-methyltransferase	- 2,4	- 2,4	
AT3G22620	bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin-like protein	- 8,7	- 7,4	
AT3G53980	bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin-like protein	- 6,6	- 10,9	
AT4G33550	bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin-like protein	- 3,0	- 3,4	
AT3G14210	epithiospecifier modifier 1	- 2,3	- 2,2	
AT1G58725	GDSL esterase/lipase	- 8,1	- 5,0	
AT2G04570	GDSL esterase/lipase	- 5,0	- 4,6	
AT1G54790	GDSL esterase/lipase	- 4,5	- 4,5	
AT3G50400	GDSL esterase/lipase	- 4,0	- 4,7	
AT5G45950	GDSL esterase/lipase	- 4,0	- 3,3	
AT1G54020	GDSL esterase/lipase	- 3,2	- 2,8	
AT2G24560	GDSL esterase/lipase	- 2,6	- 2,6	
AT1G53920	GDSL esterase/lipase 5	- 2,0	- 2,2	
AT3G59710	Rossmann-fold NAD(P)-binding domain-containing protein	- 3,9	- 2,6	

Transkriptionelle Änderungen potentiell *lipid raft*-assoziierter Proteine				
AT4G22010	protein SKU5 similar 4	- 2,2	- 2,3	
AT5G60660	putative aquaporin PIP2-4	- 4,0	- 5,9	
AT5G15630	COBRA-like protein 4	- 2,2	- 2,8	
AT1G13920	Remorin family protein	- 2,1	- 2,3	
AT3G57540	Remorin family protein	- 2,3	- 2,2	
AT1G70940	auxin efflux carrier component 3	- 2,1	- 2,0	

Tabelle 22: Stoffspezifische MS-Parameter für Cholin- und Phospholipidmessungen; Cholin (Cho oder C), Acetylcholin (ACho), Phosphatidyl- (P), Ethanolamin (E), Lyso- (L), Serin (S), Inositol (I), Phosphatidsäure (PA); Phospholipide sind durch die Summe der Kohlenstoffatome und die Anzahl der Doppelbindungen klassifiziert. *Precursor ions* (Q1 Masse), *fragment ions* (Q3 Masse). Potentiale in Volt für *declustering* (DP), *entrance* (EP), *collision cell entrance* (CEP), *collision energy* (CE), *collision cell exit* (CXP)

Stoff	**Q1 Masse**	**Q3 Masse**	**Zeit ms**	**DP (Volt)**	**EP (Volt)**	**CEP (Volt)**	**CE (Volt)**	**CXP (Volt)**
Cho	104.000	60.000	50.0	26.000	9.500	13.000	23.000	2.500
ACho	146.000	87.000	50.0	24.000	7.000	10.000	20.000	2.500
PE 34:1	718.700	239.400	50.0	60.000	8.500	34.000	43.000	3.000
PE 36:2	744.700	263.500	50.0	58.000	9.500	35.000	45.000	3.500
PE 38:4	768.600	341.400	50.0	65.000	6.500	39.000	43.000	4.500
PC 34:2	759.000	184.000	50.0	82.000	4.500	45.000	45.000	2.000
PC 36:1	761.000	184.000	50.0	82.000	8.500	40.000	45.000	2.000
PC 36:2	787.000	184.000	50.0	82.000	4.500	35.000	45.000	2.000
LPE 18:0	482.400	341.400	50.0	46.000	4.500	26.000	29.000	4.000
LPE 16:0	454.300	313.400	50.0	47.000	4.500	21.000	27.000	4.000
LPC 18:3	518.500	184.200	50.0	61.000	6.000	26.000	33.000	4.000
LPC 19:3	522.300	184.200	50.0	66.000	7.000	30.000	37.000	4.000
PS 36:5	812.700	208.200	50.0	116.000	7.000	38.000	43.000	4.000
PS 38:4	697.800	121.100	50.0	71.000	5.500	34.000	47.000	4.000
PA 38:5	725.800	121.100	50.0	81.000	9.000	38.000	53.000	4.000
PI 36:6	857.700	575.600	50.0	61.000	11.000	40.000	39.000	6.000
PI 34:2	835.400	575.600	50.0	16.000	6.000	44.000	45.000	6.000

Tabelle 23: Differentiell regulierte Gene zwischen *cher1-4*, *cher1-5* und Kontrollpflanzen Col-0. Die Identifizierung differentiell regulierter Gene zwischen *cher1-4*, *cher1-5* und Kontrollpflanzen mit einer absoluten Expressionsänderung ≥ 2.0 und P ≤ 0.05 ($FC_{abs)}$ erfolgte unter Verwendung des T-test unpaired und der Benjamini–Hochberg multiplen Testkorrektur. Gene, die für den charakteristischen Phänotyp verantwortlich sind, müssen sowohl in *cher1-4* als auch in *cher1-5* differentiell exprimiert sein. Zu diesem Zweck wurde ein Venn Diagramm der 1540 deregulierten Features für *cher1-5* und der 1317 deregulierten Features für *cher1-4* durch das Agilent GENESPRING XII Programm erstellt. Es konnten 960 Features detektiert warden, die in beiden Mutanten im Vergleich zu Col-0 differentiell exprimiert waren. Von diesen waren 240 Features hochreguliert und 720 herunterreguliert.

Probenname	FC_{abs} vs Col-0		Gensymbol		Genname
	cher1-5	*cher1-4*			
Hochregulierte Transkripte					
A_84_P14137	169,74	80,56	SAG29	AT5G13170	senescence-associated protein 29
A_84_P791978	39,83	48,64	AT1G13607	AT1G13607	defensin-like protein 286
A_84_P81249	40,04	40,24	AT2G44240	AT2G44240	hypothetical protein
A_84_P12972	24,85	25,74	AT4G36700	AT4G36700	cupin family protein
A_84_P115562	13,08	20,93	AT1G73325	AT1G73325	Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein
A_84_P549811	23,38	20,54	AT1G47395	AT1G47395	hypothetical protein
A_84_P788757	20,99	20,14	AT1G12030	AT1G12030	hypothetical protein
A_84_P524292	15,45	19,71	CSLB03	AT2G32530	cellulose synthase-like protein B3
A_84_P15382	17,71	17,14	CYP71A13	AT2G30770	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 13
A_84_P19508	20,46	17,02	AT4G23680	AT4G23680	SRPBCC ligand-binding domain-containing protein
A_84_P21264	12,52	16,21	BT2	AT3G48360	BTB and TAZ domain protein 2
A_84_P752326	17,92	15,40	AT1G62420	AT1G62420	hypothetical protein
A_84_P127561	18,02	15,26	AT4G15680	AT4G15680	monothiol glutaredoxin-S4
A_84_P789523	10,57	15,06	AT4	AT5G03545	hypothetical protein
A_84_P543604	11,98	12,96	AT1G47400	AT1G47400	hypothetical protein
A_84_P558934	19,85	12,89	AT3G12910	AT3G12910	no apical meristem domain-containing transcriptional regulator
A_84_P18626	16,74	12,40	ASE3	AT4G38880	amidophosphoribosyltransferase
A_84_P295824	14,99	11,76	BHLH038	AT3G56970	transcription factor ORG2
A_84_P57900	13,15	10,27	BHLH039	AT3G56980	transcription factor ORG3
A_84_P53340	8,80	8,82	AT4G15670	AT4G15670	monothiol glutaredoxin-S7
A_84_P76184	8,72	8,37	WRKY30	AT5G24110	WRKY DNA-binding protein 30
A_84_P564098	9,50	8,08	AT2G14247	AT2G14247	hypothetical protein
A_84_P10647	7,69	8,07	UGT76D1	AT2G26480	UDP-glucosyl transferase 76D1
A_84_P764611	9,68	8,00	AT4G08867	AT4G08867	hypothetical protein
A_84_P178774	9,03	7,30	BHLH100	AT2G41240	transcription factor bHLH100
A_84_P766473	6,35	7,14	AT5G25260	AT5G25260	Flotillin-like protein 2
A_84_P21818	6,12	7,08	AT1G65240	AT1G65240	aspartic proteinase-like protein 2
A_84_P15840	5,82	6,73	AGO3	AT1G31290	protein ARGONAUTE 3
A_84_P12970	8,22	6,66	AT4G17660	AT4G17660	protein kinase family protein
A_84_P10496	9,28	6,65	UGT85A1	AT1G22400	cytokinin-O-glucosyltransferase 2
A_84_P52140	6,02	6,62	AT1G24580	AT1G24580	RING/U-box domain-containing protein
A_84_P582920	5,91	6,51	BAP2	AT2G45760	BON1-associated protein 2

A_84_P264050	4,95	6,20	AT1G08310	AT1G08310	esterase/lipase/thioesterase-like protein
A_84_P558829	7,22	6,17	SAG13	AT2G29350	senescence-associated protein 13
A_84_P19294	7,84	5,99	AT1G26380	AT1G26380	FAD-binding and BBE domain-containing protein
A_84_P811412	7,89	5,88	DIN10	AT5G20250	putative galactinol--sucrose galactosyltransferase 6
A_84_P19135	13,46	5,83	KCS12	AT2G28630	3-ketoacyl-CoA synthase 12
A_84_P16226	7,08	5,75	AT1G14540	AT1G14540	peroxidase 4
A_84_P11098	5,25	5,63	CAT6	AT5G04770	cationic amino acid transporter 6
A_84_P16041	5,88	5,60	BHLH101	AT5G04150	transcription factor bHLH101
A_84_P752940	6,25	5,60	AT1G13608	AT1G13608	putative defensin-like protein 288
A_84_P10781	3,92	5,53	AT3G15650	AT3G15650	phospholipase/carboxylesterase family protein
A_84_P11438	4,58	5,52	SULTR1;2	AT1G78000	sulfate transporter 1.2
A_84_P850060	6,70	5,50	AT1G74770	AT1G74770	zinc ion binding protein
A_84_P10141	6,82	5,47	LECRKA4.2	AT5G01550	Lectin-domain containing receptor kinase A4.2
A_84_P596462	6,54	5,44	AT3G60700	AT3G60700	hypothetical protein
A_84_P12547	7,91	5,31	CYP71A12	AT2G30750	cytochrome P450 71A12
A_84_P20166	7,19	5,22	MLO12	AT2G39200	MLO-like protein 12
A_84_P22521	4,87	5,16	AT5G38780	AT5G38780	putative S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase
A_84_P192434	7,79	5,09	AT4G36850	AT4G36850	PQ-loop repeat family protein / transmembrane family protein
A_84_P511862	5,41	5,08	AT2G32550	AT2G32550	Cell differentiation, Rcd1-like protein
A_84_P12638	5,76	4,98	PYD4	AT3G08860	PYRIMIDINE 4
A_84_P511702	4,42	4,88	AT1G53625	AT1G53625	hypothetical protein
A_84_P528334	4,24	4,82	AT5G50915	AT5G50915	transcription factor bHLH137
A_84_P278800	5,32	4,77	AT4G15700	AT4G15700	monothiol glutaredoxin-S3
A_84_P526212	3,60	4,76	AT3G46880	AT3G46880	hypothetical protein
A_84_P12783	4,37	4,74	SMZ	AT3G54990	AP2-like ethylene-responsive transcription factor SMZ
A_84_P14186	4,51	4,70	AT1G05000	AT1G05000	putative tyrosine-protein phosphatase
A_84_P772807	3,46	4,59	AT1G68240	AT1G68240	transcription factor bHLH109
A_84_P717232	3,28	4,54		AT1G19968	
A_84_P12212	4,02	4,51	AT1G56060	AT1G56060	hypothetical protein
A_84_P19250	6,06	4,50	AT3G05400	AT3G05400	sugar transporter ERD6-like 12
A_84_P78199	5,09	4,44	AT5G25240	AT5G25240	hypothetical protein
A_84_P543246	3,70	4,41	AT4G37295	AT4G37295	hypothetical protein
A_84_P13086	6,24	4,35	AT5G44910	AT5G44910	Toll-Interleukin-Resistance domain-containing protein
A_84_P822379	4,05	4,31	AT3G28270	AT3G28270	hypothetical protein
A_84_P718920	4,88	4,28		AT5G05250	
A_84_P248365	3,48	4,24	AT4G37240	AT4G37240	hypothetical protein
A_84_P178304	4,44	4,19	AT4G15690	AT4G15690	monothiol glutaredoxin-S5
A_84_P752873	4,30	4,12	AT1G13609	AT1G13609	defensin-like protein 287
A_84_P717671	4,21	4,09	RTFL6	AT4G35783	protein rotundifolia like 6
A_84_P69204	5,35	4,05	AT1G21110	AT1G21110	O-methyltransferase family protein
A_84_P87419	4,08	4,01	AT3G25290	AT3G25290	putative auxin-responsive protein
A_84_P23485	4,93	3,99	YUC5	AT5G43890	YUCCA family monooxygenase

A_84_P769385	4,32	3,94		AT5G01732	
A_84_P21742	4,24	3,87	AT1G18990	AT1G18990	hypothetical protein
A_84_P148418	3,72	3,84	MT1C	AT1G07610	metallothionein 1C
A_84_P10518	5,32	3,80	AT1G50040	AT1G50040	hypothetical protein
A_84_P12873	5,94	3,79	AT4G19810	AT4G19810	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain
A_84_P15248	2,93	3,74	NIA1	AT1G77760	nitrate reductase [NADH]
A_84_P21337	3,79	3,72	NGA4	AT4G01500	AP2/B3-like transcriptional factor family protein
A_84_P20040	4,19	3,60	AT1G62370	AT1G62370	RING/U-box domain-containing protein
A_84_P12595	2,96	3,60	CSLB01	AT2G32610	cellulose synthase-like protein B1
A_84_P18829	4,20	3,59	ARR6	AT5G62920	two-component response regulator ARR6
A_84_P11119	4,07	3,54	KUF1	AT1G31350	F-box/kelch-repeat protein SKIP25
A_84_P64734	3,44	3,52	ALC	AT5G67110	transcription factor ALC
A_84_P22650	3,32	3,52	AT5G20740	AT5G20740	plant invertase/pectin methylesterase inhibitor domain-containing protein
A_84_P22812	5,04	3,51	ARR15	AT1G74890	two-component response regulator ARR15
A_84_P243495	3,86	3,47	AT4G15660	AT4G15660	monothiol glutaredoxin-S8
A_84_P162443	3,32	3,42	AT5G64510	AT5G64510	hypothetical protein
A_84_P19391	5,34	3,40	PAP22	AT3G52820	purple acid phosphatase 22
A_84_P17313	6,27	3,35	AT2G37770	AT2G37770	NAD(P)-linked oxidoreductase-like protein
A_84_P817892	4,48	3,35	PYL5	AT5G05440	abscisic acid receptor PYL5
A_84_P546454	3,85	3,32	AT2G31730	AT2G31730	basic helix-loop-helix domain-containing protein
A_84_P528136	4,39	3,30	CRK11	AT4G23190	cysteine-rich receptor-like protein kinase 11
A_84_P15370	2,89	3,29	PDIL2-2	AT1G04980	protein disulfide-isomerase A6
A_84_P23899	2,71	3,27	AT2G29500	AT2G29500	HSP20 family protein
A_84_P23845	3,43	3,26	UGT74F1	AT2G43840	UDP-glycosyltransferase 74 F1
A_84_P78019	3,08	3,24	AT1G72430	AT1G72430	SAUR-like auxin-responsive protein family
A_84_P257330	4,19	3,24	AT2G38180	AT2G38180	GDSL esterase/lipase
A_84_P573956	3,24	3,21	AT2G30760	AT2G30760	hypothetical protein
A_84_P836351	2,40	3,16	AT3G19230	AT3G19230	leucine-rich repeat-containing protein
A_84_P560220	3,24	3,14	AT5G46220	AT5G46220	hypothetical protein
A_84_P12528	4,48	3,09	PP2C5	AT2G40180	putative protein phosphatase 2C 30
A_84_P19923	4,07	3,09	UGT74E2	AT1G05680	Uridine diphosphate glycosyltransferase 74E2
A_84_P837979	3,16	3,00	ASL9	AT1G16530	LOB domain-containing protein 3
A_84_P799394	2,57	2,99	AT3G19680	AT3G19680	hypothetical protein
A_84_P226889	3,76	2,98	AT4G20000	AT4G20000	VQ motif-containing protein
A_84_P10290	3,40	2,97	OPT1	AT5G55930	oligopeptide transporter 1
A_84_P12493	2,84	2,96	AT2G30540	AT2G30540	monothiol glutaredoxin-S9
A_84_P724260	2,67	2,95		AT3G52748	
A_84_P20248	2,71	2,93	AT3G23230	AT3G23230	ethylene-responsive transcription factor ERF098
A_84_P765637	3,28	2,93		AT4G31248	
A_84_P20482	2,81	2,93	CKX4	AT4G29740	cytokinin dehydrogenase 4
A_84_P834504	3,75	2,92	PDR2	AT4G15230	ABC transporter G family member 30
A_84_P287800	3,31	2,90	AT2G44130	AT2G44130	F-box/kelch-repeat protein

A_84_P17955	3,77	2,84	UGT85A3	AT1G22380	UDP-glucosyl transferase 85A3
A_84_P845699	3,14	2,83	PMT5	AT3G18830	Polyol transporter 5
A_84_P20423	2,62	2,79	AT4G12090	AT4G12090	Cornichon family protein
A_84_P533868	4,46	2,78	AT1G49000	AT1G49000	hypothetical protein
A_84_P759928	2,84	2,76	AT3G26910	AT3G26910	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
A_84_P13130	3,29	2,76	CYP81F2	AT5G57220	cytochrome P450, family 81, subfamily F, polypeptide 2
A_84_P12371	3,00	2,75	AT1G16510	AT1G16510	SAUR-like auxin-responsive protein
A_84_P262890	2,69	2,71	AT4G17215	AT4G17215	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
A_84_P18718	3,26	2,70	GATA12	AT5G25830	GATA transcription factor 12
A_84_P17365	2,80	2,70	ATERDJ3A	AT3G08970	DnaJ domain-containing protein
A_84_P10660	3,68	2,69	GSTU1	AT2G29490	glutathione S-transferase
A_84_P67674	2,97	2,68	EXL5	AT2G17230	protein exordium like 5
A_84_P757131	2,90	2,66	AT2G01913	AT2G01913	hypothetical protein
A_84_P12219	2,41	2,62	BST1	AT5G65090	inositol-1,4,5 triphosphate 5-phosphatase-like protein
A_84_P11516	2,01	2,62	AT1G20380	AT1G20380	prolyl oligopeptidase-like protein
A_84_P532349	2,52	2,61	EXO70H4	AT3G09520	exocyst complex component 7
A_84_P133525	3,18	2,60	PSK4	AT3G49780	phytosulfokine-beta
A_84_P12497	2,91	2,60	UGT74F2	AT2G43820	UDP-glucosyltransferase 74F2
A_84_P206718	2,95	2,57	AT2G34510	AT2G34510	hypothetical protein
A_84_P703970	2,46	2,56	ACA10	AT4G29900	Ca2+-transporting ATPase
A_84_P248115	2,65	2,55	AT5G58570	AT5G58570	hypothetical protein
A_84_P135345	2,63	2,54	UTR1	AT2G02810	UDP-galactose transporter 1
A_84_P23380	2,48	2,54	LECRKA4.1	AT5G01540	Lectin-domain containing receptor kinase A4.1
A_84_P228659	3,15	2,53	AT2G32190	AT2G32190	hypothetical protein
A_84_P10002	2,40	2,53	MSRB4	AT4G04810	peptide methionine sulfoxide reductase B4
A_84_P544827	2,27	2,51	AOC1	AT3G25760	allene oxide cyclase 1
A_84_P823929	2,45	2,50	AT1G03850	AT1G03850	monothiol glutaredoxin-S13
A_84_P13726	3,02	2,49	EP3	AT3G54420	chitinase
A_84_P21889	2,88	2,47	AT1G74360	AT1G74360	putative LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
A_84_P565450	2,49	2,41	AT5G16980	AT5G16980	2-alkenal reductase
A_84_P525395	2,28	2,41	PIT1	AT4G02075	protein pitchoun 1
A_84_P11955	2,21	2,41	CGA1	AT4G26150	putative GATA transcription factor 22
A_84_P577990	2,45	2,37	AT5G44570	AT5G44570	hypothetical protein
A_84_P15324	2,36	2,37	ADR1	AT1G33560	disease resistance protein ADR1
A_84_P19052	2,40	2,36	TAA1	AT1G70560	tryptophan aminotransferase
A_84_P597566	2,42	2,36	SLAH3	AT5G24030	SLAC1 homologue 3
A_84_P69324	2,59	2,35	AT3G05320	AT3G05320	O-fucosyltransferase family protein
A_84_P797883	2,54	2,35	BTS	AT3G18290	zinc finger protein-like protein
A_84_P14649	2,59	2,35	MYB84	AT3G49690	transcription factor RAX3
A_84_P57010	2,48	2,34	LBD39	AT4G37540	LOB domain-containing protein 39
A_84_P79989	2,30	2,33	AT4G29520	AT4G29520	hypothetical protein
A_84_P18414	2,28	2,32	AT1G02610	AT1G02610	RING/FYVE/PHD zinc finger-containing protein

A_84_P17049	2,45	2,30	FRO3	AT1G23020	ferric reduction oxidase 3
A_84_P861110	2,61	2,30	AT4G19420	AT4G19420	putative Pectinacetylesterase
A_84_P21943	2,73	2,30	XTH30	AT1G32170	xyloglucan:xyloglucosyl transferase
A_84_P15168	2,26	2,29	ZIP5	AT1G05300	zinc transporter 5
A_84_P767978	2,43	2,29	AT5G25280	AT5G25280	serine-rich protein-like protein
A_84_P565021	2,31	2,29	CIPK3	AT2G26980	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 3
A_84_P21530	2,51	2,27	AT5G14120	AT5G14120	major facilitator protein
A_84_P18188	2,11	2,27	RBOH F	AT1G64060	respiratory burst oxidase
A_84_P20503	2,34	2,27	AT4G34760	AT4G34760	SAUR-like auxin-responsive protein 9
A_84_P11195	2,31	2,26	AT5G44680	AT5G44680	DNA-3-methyladenine glycosylase I
A_84_P17680	2,37	2,24	AT4G38860	AT4G38860	SAUR-like auxin-responsive protein
A_84_P552996	2,20	2,24	ROPGEF7	AT5G02010	RHO guanyl-nucleotide exchange factor 7
A_84_P19687	2,35	2,23	PRE1	AT5G39860	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding family protein
A_84_P65264	3,14	2,23	AT3G15356	AT3G15356	lectin-like protein
A_84_P16644	3,02	2,23	YUC2	AT4G13260	Flavin-binding monooxygenase family protein
A_84_P92099	2,26	2,21	AT2G32880	AT2G32880	TRAF-like family protein
A_84_P12120	2,63	2,21	AT5G39050	AT5G39050	HXXXD-type acyl-transferase-like protein
A_84_P150878	2,52	2,19	AT1G69760	AT1G69760	hypothetical protein
A_84_P22745	2,89	2,17	AT1G03220	AT1G03220	aspartyl protease-like protein
A_84_P157735	2,84	2,17	AT3G51400	AT3G51400	hypothetical protein
A_84_P21359	2,13	2,17	AT4G09530	AT4G09530	SAUR-like auxin-responsive protein
A_84_P16882	2,20	2,16	AT5G48540	AT5G48540	cysteine-rich repeat secretory protein 55
A_84_P768857	2,44	2,16	AT5G44572	AT5G44572	hypothetical protein
A_84_P14916	2,14	2,16	AT5G17980	AT5G17980	C2 calcium/lipid-binding and phosphoribosyltransferase C-terminal domain-containing protein
A_84_P11710	2,02	2,16	AT1G53080	AT1G53080	legume lectin-like protein
A_84_P16214	2,20	2,13	AT1G70800	AT1G70800	Calcium-dependent lipid-binding domain-containing protein
A_84_P85619	2,28	2,11	PP2-A11	AT1G63090	F-box protein PP2-A11
A_84_P18782	2,86	2,10	AT1G64380	AT1G64380	ethylene-responsive transcription factor ERF061
A_84_P196204	2,35	2,09	AT3G26040	AT3G26040	HXXXD-type acyl-transferase-like protein
A_84_P21409	2,22	2,09	BETA-OHASE 1	AT4G25700	beta-carotene hydroxylase
A_84_P11412	2,30	2,08	ARR4	AT1G10470	two-component response regulator ARR4
A_84_P203438	2,30	2,08	UGT73B1	AT4G34138	UDP-glucosyl transferase 73B1
A_84_P255030	2,03	2,07	AT4G13340	AT4G13340	leucine-rich repeat extensin-like protein 3
A_84_P236643	2,17	2,07	ILL6	AT1G44350	IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 6
A_84_P811064	2,29	2,07	AT3G17770	AT3G17770	Dihydroxyacetone kinase
A_84_P12896	2,56	2,06	SHB1	AT4G25350	phosphate transporter PHO1-4
A_84_P12186	2,51	2,06	AT5G57480	AT5G57480	AAA-type ATPase family protein
A_84_P15371	2,11	2,05	MYB70	AT2G23290	myb domain protein 70
A_84_P753286	2,18	2,03		AT1G31173	
A_84_P192974	2,22	2,02	AT5G65660	AT5G65660	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
A_84_P21308	2,03	2,02	AT1G21550	AT1G21550	putative calcium-binding protein CML44
A_84_P592665	2,49	2,01	GDU4	AT2G24762	glutamine dumper 4

Herunterregulierte Transkripte					
A_84_P20976	59,94	24,88	AT1G19210	AT1G19210	ethylene-responsive transcription factor ERF017
A_84_P20410	49,99	52,40	ADS1	AT1G06080	delta-9 acyl-lipid desaturase 1
A_84_P11046	31,53	14,66	RRTF1	AT4G34410	ethylene-responsive transcription factor ERF109
A_84_P53570	30,48	33,12	AT2G41810	AT2G41810	hypothetical protein
A_84_P14893	26,87	26,91	AT5G09530	AT5G09530	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
A_84_P10495	26,68	10,89	AAE12	AT1G65890	acyl activating enzyme 12
A_84_P573393	22,65	10,79	AT4G27654	AT4G27654	hypothetical protein
A_84_P23476	18,57	20,72	AT5G41040	AT5G41040	omega-hydroxypalmitate O-feruloyl transferase
A_84_P19028	17,45	7,03	ORA47	AT1G74930	ethylene-responsive transcription factor ERF018
A_84_P15293	16,13	16,97	CYP78A5	AT1G13710	cytochrome P450, family 78, subfamily A, polypeptide 5
A_84_P846960	14,61	10,47		AT4G33610	
A_84_P18908	14,45	5,15	AT1G33760	AT1G33760	ethylene-responsive transcription factor ERF022
A_84_P155385	14,21	13,76	AT4G17280	AT4G17280	putative auxin-responsive protein
A_84_P17343	13,94	7,63	ERF13	AT2G44840	ethylene-responsive transcription factor 13
A_84_P751526	12,35	7,46	AT1G72920	AT1G72920	Toll-Interleukin-Resistance domain-containing protein
A_84_P869736	11,88	15,72	AGL42	AT5G62165	protein agamous-like 42
A_84_P235233	11,36	9,96	AT4G36610	AT4G36610	hydrolase, alpha/beta fold family protein
A_84_P97916	11,20	7,30	AT4G29780	AT4G29780	hypothetical protein
A_84_P296724	10,59	5,32	AT5G51190	AT5G51190	ethylene-responsive transcription factor ERF105
A_84_P14874	10,39	9,39	AT1G62770	AT1G62770	plant invertase/pectin methylesterase inhibitor domain-containing protein
A_84_P15931	10,29	5,18	ERF5	AT5G47230	ethylene-responsive transcription factor 5
A_84_P15454	9,84	18,78	LAC2	AT2G29130	laccase 2
A_84_P851538	9,59	8,25	THI2.1	AT1G72260	thionin 2.1
A_84_P218238	9,35	7,20	AT1G65450	AT1G65450	HXXXD-type acyl-transferase-like protein
A_84_P233429	9,15	6,25	AT1G58390	AT1G58390	CC-NBS-LRR class disease resistance protein
A_84_P13948	9,02	4,79	AT5G09520	AT5G09520	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
A_84_P107712	8,81	8,75	AT2G21100	AT2G21100	disease resistance-responsive, dirigent domain-containing protein
A_84_P566753	8,78	7,11	RGF8	AT2G03830	hypothetical protein
A_84_P50790	8,73	7,42	AT3G22620	AT3G22620	bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin-like protein
A_84_P137009	8,38	8,07	PDF1.2	AT5G44420	defensin-like protein 16
A_84_P11481	8,27	6,63	AT1G68850	AT1G68850	peroxidase 11
A_84_P771113	8,14	4,99	AT1G59406	AT1G58725	GDSL esterase/lipase
A_84_P801431	8,13	4,84	AT1G68250	AT1G68250	hypothetical protein
A_84_P607864	7,96	5,68	GASA5	AT3G02885	GAST1 protein homolog 5
A_84_P310613	7,92	7,91	PDF1.2b	AT2G26020	putative defensin-like protein 15
A_84_P517162	7,50	7,95	PIA1	AT2G20630	putative protein phosphatase 2C 20
A_84_P584450	7,45	4,71	AT1G27890	AT1G27890	putative CCR4-associated factor 1-4
A_84_P836958	7,41	5,26	AT1G61470	AT1G61470	putative CCR4-associated factor 1-5
A_84_P153835	7,30	6,94	MEE3	AT2G21650	maternal effect embryo arrest 3 protein
A_84_P522306	7,29	4,75	AT1G27820	AT1G27820	putative CCR4-associated factor 1-3
A_84_P17463	7,26	4,35	AT3G44260	AT3G44260	putative CCR4-associated factor 1-9
A_84_P563858	7,14	5,47	AT4G38340	AT4G38340	RWP-RK domain-containing protein

A_84_P21874	6,97	4,77	STZ	AT1G27730	zinc finger protein STZ/ZAT10
A_84_P21946	6,88	4,21	NUDT21	AT1G73540	nudix hydrolase 21
A_84_P112782	6,79	10,19	AT3G50220	AT3G50220	hypothetical protein
A_84_P13010	6,73	5,83	SHN3	AT5G11190	ethylene-responsive transcription factor SHINE 2
A_84_P196694	6,71	6,72	PDF1.2c	AT5G44430	defensin-like protein 17
A_84_P21931	6,70	5,76	ERF11	AT1G28370	ethylene-responsive transcription factor 11
A_84_P601310	6,69	5,73	AT1G11070	AT1G11070	hypothetical protein
A_84_P567134	6,68	4,60	AT4G27657	AT4G27657	hypothetical protein
A_84_P13271	6,66	5,69	WRKY40	AT1G80840	putative WRKY transcription factor 40
A_84_P11239	6,65	6,25	AT5G56840	AT5G56840	myb-like transcription factor family protein
A_84_P246705	6,62	10,89	AT3G53980	AT3G53980	bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin-like protein
A_84_P160753	6,57	6,02	AT2G41800	AT2G41800	hypothetical protein
A_84_P239215	6,56	6,76	PDF1.3	AT2G26010	defensin-like protein 14
A_84_P15041	6,34	9,41	AT5G61890	AT5G61890	ethylene-responsive transcription factor ERF114
A_84_P521787	6,23	6,62	AT3G30340	AT3G30340	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
A_84_P767643	6,17	4,46	AT1G29620	AT1G29620 (Query coverage:98%)	Cytochrome C oxidase polypeptide VIB family protein
A_84_P19944	6,10	4,60	AT1G72910	AT1G72910	Toll-Interleukin-Resistance domain-containing protein
A_84_P11075	6,07	4,18	AT4G16140	AT4G16140	proline-rich family protein
A_84_P506967	6,02	4,99	OFP10	AT5G22240	Ovate family protein
A_84_P17582	6,00	4,17	ACS6	AT4G11280	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6
A_84_P11358	6,00	5,31	AT1G03820	AT1G03820	hypothetical protein
A_84_P826815	5,97	5,05	SHN2	AT5G25390	ethylene-responsive transcription factor SHINE 3
A_84_P15002	5,94	7,15	AT5G51890	AT5G51890	peroxidase 66
A_84_P22607	5,94	3,70	ERF104	AT5G61600	ethylene-responsive transcription factor ERF104
A_84_P14707	5,93	3,67	PLP9	AT3G63200	PATATIN-like protein 9
A_84_P755231	5,88	4,26	AT2G14270	AT2G30020 (MaxID: 98%)	Cytochrome C oxidase polypeptide VIB family protein
A_84_P10724	5,87	4,36	AT2G30020	AT2G30020	putative protein phosphatase 2C 25
A_84_P22327	5,74	6,67	AG	AT4G18960	MADS-box transcription factor
A_84_P299940	5,68	6,13	AT1G01355	AT1G01355	Putative endonuclease or glycosyl hydrolase
A_84_P832832	5,64	4,25	TBL30	AT2G40160	hypothetical protein
A_84_P503065	5,62	4,53	AT3G05470	AT3G05470	formin-like protein 11
A_84_P15535	5,60	3,90	IQD10	AT3G15050	protein IQ-domain 10
A_84_P10260	5,60	6,49	AT5G47340	AT5G47340	palmitoyl protein thioesterase family protein
A_84_P260340	5,60	4,93	AT1G76240	AT1G76240	hypothetical protein
A_84_P507561	5,58	5,86	AT3G21320	AT3G21320	hypothetical protein
A_84_P832213	5,57	5,85	AT3G28345	AT3G28345	ABC transporter B family member 15
A_84_P511590	5,55	6,85	AT1G07120	AT1G07120	hypothetical protein
A_84_P755281	5,53	4,28	AT2G05050	AT2G05050	protein phosphatase 2C-like protein
A_84_P603815	5,50	5,11	AT5G35540	AT5G35540	hypothetical protein
A_84_P14339	5,49	4,37	MLP165	AT1G35260	MLP-like protein 165
A_84_P608670	5,49	3,68	AT2G28580	AT2G28580	hypothetical protein
A_84_P613604	5,48	5,64	AT5G42710	AT5G42710	hypothetical protein
A_84_P11901	5,47	3,76	AT1G06100	AT1G06100	delta-9 desaturase-like 2 protein

A_84_P775912	5,46	3,61		AT3G60170	
A_84_P147508	5,45	5,36	AT5G49280	AT5G49280	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
A_84_P23436	5,45	6,45	FAR1	AT5G22500	fatty acyl-CoA reductase 1
A_84_P534217	5,41	4,93	AT3G48240	AT3G48240	octicosapeptide/Phox/Bem1p domain-containing protein
A_84_P856377	5,33	3,34	AT1G72900	AT1G72900	Toll-Interleukin-Resistance domain-containing protein
A_84_P860303	5,27	4,59	AT3G23170	AT3G23170	hypothetical protein
A_84_P13405	5,25	6,07	ZW9	AT1G58270	TRAF-like protein
A_84_P22213	5,25	5,40	AT3G49160	AT3G49160	pyruvate kinase
A_84_P19609	5,15	5,25	LAC12	AT5G05390	laccase 12
A_84_P20649	5,14	3,67	AT5G44350	AT5G44350	ethylene-responsive nuclear protein -like protein
A_84_P21047	5,11	6,22	LTP2	AT2G38530	non-specific lipid-transfer protein 2
A_84_P89649	5,09	9,11	CYP86C2	AT3G26125	cytochrome P450, family 86, subfamily C, polypeptide 2
A_84_P20149	5,03	4,60	AT2G04570	AT2G04570	GDSL esterase/lipase
A_84_P66214	5,01	3,54	AT3G02840	AT3G02840	armadillo/beta-catenin-like repeat-containing protein
A_84_P515273	4,92	5,23	AT1G61255	AT1G61255	hypothetical protein
A_84_P14857	4,92	5,43	AT4G16750	AT4G16750	ethylene-responsive transcription factor ERF039
A_84_P22191	4,90	4,71	AT3G43670	AT3G43670	putative copper amine oxidase
A_84_P21458	4,88	3,50	BT5	AT4G37610	BTB and TAZ domain protein 5
A_84_P600236	4,86	4,22	AT5G22545	AT5G22545	hypothetical protein
A_84_P515014	4,84	6,06	TED7	AT5G48920	tracheary element differentiation-like protein 7
A_84_P10979	4,84	5,01	IRX1	AT4G18780	cellulose synthase A catalytic subunit 8 [UDP-forming]
A_84_P836406	4,83	4,31	AT1G15125	AT1G15125	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase domain-containing protein
A_84_P714600	4,83	2,95	ZF2	AT3G19580	zinc-finger protein 2
A_84_P121222	4,72	8,14	AT3G21330	AT3G21330	transcription factor bHLH87
A_84_P20677	4,71	3,58	SBT1.3	AT5G51750	subtilase 1.3
A_84_P824268	4,69	4,11	AT1G56660	AT1G56660	hypothetical protein
A_84_P13089	4,69	4,29		AT5G45730	
A_84_P279580	4,66	4,38	AT3G50800	AT3G50800	hypothetical protein
A_84_P787555	4,66	5,31	MAP70-5	AT4G17220	microtubule-associated proteins 70-5
A_84_P21248	4,62	6,38	FAR8	AT3G44560	fatty acyl-CoA reductase 8
A_84_P93079	4,56	6,52	HB33	AT1G75240	homeobox protein 33
A_84_P10458	4,53	4,54	AT1G54790	AT1G54790	GDSL esterase/lipase
A_84_P784874	4,53	4,90	PME2	AT1G53830	pectinesterase 2
A_84_P11260	4,52	3,64	AT5G61610	AT5G61610	oleosin-like protein
A_84_P259090	4,50	5,78	GAUT12	AT5G54690	alpha-1,4-galacturonosyltransferase
A_84_P830899	4,49	5,43	bHLH11	AT4G36060	transcription factor bHLH11
A_84_P17054	4,47	3,86	RAS1	AT1G09950	response to ABA and salt 1
A_84_P22045	4,46	4,89	LAC5	AT2G40370	laccase 5
A_84_P17328	4,46	5,16	AT2G39350	AT2G39350	ABC transporter G family member 1
A_84_P813455	4,45	5,41	IRX12	AT2G38080	laccase-4
A_84_P810559	4,45	3,01	HSPRO2	AT2G40000	HS1 PRO-1 2-like protein
A_84_P145709	4,44	5,24	AT1G13130	AT1G13130	Cellulase (glycosyl hydrolase family 5) protein
A_84_P21836	4,41	3,64	AT1G72940	AT1G72940	Toll-Interleukin-Resistance domain-containing protein

A_84_P18953	4,41	4,32	AT1G09610	AT1G09610	hypothetical protein
A_84_P10794	4,40	5,99	CTL2	AT3G16920	chitinase-like protein 2
A_84_P545700	4,39	3,82	AT3G23190	AT3G23190	HR-like lesion-inducing protein-like protein
A_84_P786068	4,39	4,54	PHO1	AT3G23430	phosphate transporter PHO1
A_84_P217688	4,36	3,60	AT1G76600	AT1G76600	hypothetical protein
A_84_P574263	4,34	3,94	AT4G25433	AT4G25433	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein
A_84_P518116	4,34	5,11	AT2G41610	AT2G41610	hypothetical protein
A_84_P17148	4,31	3,40	SBTI1.1	AT1G01900	subtilase-like protein
A_84_P518257	4,31	3,55	AT3G49070	AT3G49070	hypothetical protein
A_84_P22136	4,30	3,20	AHP4	AT3G16360	histidine-containing phosphotransfer protein 4
A_84_P10716	4,29	5,02	PID	AT2G34650	protein kinase-like protein
A_84_P17934	4,28	3,63	ZAT6	AT5G04340	putative c2h2 zinc finger transcription factor
A_84_P549446	4,28	5,06	AT4G35720	AT4G35720	hypothetical protein
A_84_P786570	4,26	6,38	PSK2	AT2G22860	phytosulfokine-beta
A_84_P10935	4,26	3,02	AT4G01380	AT4G01380	plastocyanin-like domain-containing protein
A_84_P549850	4,25	4,52	AT1G60190	AT1G60190	U-box domain-containing protein 19
A_84_P13182	4,24	5,51	IRX3	AT5G17420	cellulose synthase A catalytic subunit 7 [UDP-forming]
A_84_P21113	4,23	2,98	ERF38	AT2G35700	ethylene-responsive transcription factor ERF038
A_84_P74474	4,23	5,41	TBL34	AT2G38320	trichome birefringence-like 34 protein
A_84_P130716	4,21	3,06	AT2G27740	AT2G27740	hypothetical protein
A_84_P21787	4,19	2,77	AT1G04570	AT1G04570	integral membrane transporter family protein
A_84_P16570	4,16	5,05	AT3G56230	AT3G56230	BTB/POZ domain-containing protein
A_84_P23387	4,15	4,81	LAC11	AT5G03260	laccase 11
A_84_P768417	4,15	2,37	AT5G36490	AT5G36490	ECA1 gametogenesis related family protein
A_84_P829873	4,15	8,49	AT4G09990	AT4G09990	hypothetical protein
A_84_P13757	4,14	5,76	PIL2	AT3G62090	transcription factor PIF6
A_84_P797526	4,14	3,64	FER4	AT2G40300	ferritin 4
A_84_P501388	4,13	5,00	AT3G51220	AT3G51220	hypothetical protein
A_84_P24160	4,13	5,06	GLP10	AT3G62020	germin-like protein subfamily 2 member 4
A_84_P22510	4,09	3,53		AT5G28230	
A_84_P13990	4,07	3,68	AT5G26010	AT5G26010	putative protein phosphatase 2C 72
A_84_P751734	4,06	4,01		AT1G58130	
A_84_P11557	4,06	3,75	AT2G25820	AT2G25820	ethylene-responsive transcription factor ERF042
A_84_P137619	4,06	3,01	PBP1	AT5G54490	pinoid-binding protein 1
A_84_P285960	4,04	3,87	ATIM	AT5G52910	timeless family protein
A_84_P820634	4,04	3,42	AT5G59550	AT5G59550	C3H4 type zinc finger protein
A_84_P134445	4,03	3,69	AT5G60760	AT5G60760	2-phosphoglycerate kinase-related protein
A_84_P22306	4,02	5,42	AT1G06170	AT1G06170	transcription factor bHLH89
A_84_P582022	4,01	3,50	AT2G46760	AT2G46760	D-arabinono-1,4-lactone oxidase family protein
A_84_P21996	4,01	4,37	AT2G26390	AT2G26390	serpin-Z3
A_84_P827231	4,00	4,54	AT2G44260	AT2G44260	hypothetical protein
A_84_P12200	4,00	5,87	PIP2;4	AT5G60660	putative aquaporin PIP2-4
A_84_P13432	3,98	5,05	PRR1	AT1G32100	pinoresinol reductase 1
A_84_P20327	3,97	4,73	AT3G50400	AT3G50400	GDSL esterase/lipase

A_84_P530345	3,97	4,43	AT1G60110	AT1G60110	jacalin-like lectin domain-containing protein
A_84_P868333	3,97	3,30	AT5G45950	AT5G45950	GDSL esterase/lipase
A_84_P145939	3,97	3,55	AT2G28315	AT2G28315	nucleotide/sugar transporter-like protein
A_84_P192414	3,96	5,44	AT5G51790	AT5G51790	transcription factor bHLH120
A_84_P546682	3,95	7,15	JLO	AT4G00220	LOB domain-containing protein 30
A_84_P23323	3,95	5,08	TED6	AT1G43790	tracheary element differentiation-related 6 protein
A_84_P12366	3,94	5,23	XCP2	AT1G20850	Xylem cysteine proteinase 2
A_84_P83669	3,92	2,71	AT4G25410	AT4G25410	basic helix-loop-helix domain-containing protein
A_84_P19516	3,92	2,93	CBF2	AT4G25470	dehydration-responsive element-binding protein 1C
A_84_P18265	3,92	3,71	AT2G18480	AT2G18480	putative polyol transporter 3
A_84_P15926	3,92	2,71	RAC2	AT5G45970	Rac-like GTP-binding protein ARAC2
A_84_P811165	3,90	2,10	GH9C2	AT1G64390	endoglucanase 6
A_84_P20499	3,90	4,16	AT4G33810	AT4G33810	glycosyl hydrolase family 10 protein
A_84_P10143	3,86	5,07	AT5G01930	AT5G01930	mannan endo-1,4-beta-mannosidase 6
A_84_P11858	3,86	2,59	AT3G59710	AT3G59710	Rossmann-fold NAD(P)-binding domain-containing protein
A_84_P14424	3,83	3,42	AGL17	AT2G22630	agamous-like MADS-box protein AGL17
A_84_P23499	3,83	3,80	AT5G47330	AT5G47330	palmitoyl protein thioesterase family protein
A_84_P594594	3,83	4,75	AT3G22415	AT3G22415	hypothetical protein
A_84_P826766	3,81	3,49	AT5G58680	AT5G58680	armadillo/beta-catenin-like repeat-containing protein
A_84_P281230	3,81	3,58	BNQ2	AT5G15160	protein banquo 2
A_84_P751343	3,80	4,63		AT1G54660	
A_84_P811797	3,80	3,95	FER1	AT5G01600	ferritin heavy chain
A_84_P16621	3,77	3,96	AT4G05170	AT4G05170	basic helix-loop-helix domain-containing protein
A_84_P22892	3,77	3,12	MKK9	AT1G73500	MAP kinase kinase 9
A_84_P520839	3,77	4,95	AT3G16070	AT3G16070	hypothetical protein
A_84_P583901	3,76	2,79	AT3G20180	AT3G20180	putative copper transport protein
A_84_P20771	3,74	4,44	MC9	AT5G04200	metacaspase 9
A_84_P20549	3,74	3,66	FLA11	AT5G03170	fasciclin-like arabinogalactan protein 11
A_84_P585163	3,73	3,84	AT5G49120	AT5G49120	hypothetical protein
A_84_P22594	3,73	4,48	LAC16	AT5G58910	laccase 16
A_84_P12862	3,73	5,46	AT4G13190	AT4G13190	protein kinase family protein
A_84_P13165	3,73	2,51	AT5G65320	AT5G65320	transcription factor bHLH99
A_84_P179004	3,73	4,72	LBD15	AT2G40470	LOB domain-containing protein 15
A_84_P751000	3,72	4,85		AT1G18120	
A_84_P21591	3,72	3,23	ZF3	AT5G43170	zinc-finger protein 3
A_84_P548594	3,72	3,09	AT5G05840	AT5G05840	hypothetical protein
A_84_P787617	3,71	3,01	AT5G03270	AT5G03270	putative cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase LOG6
A_84_P11746	3,71	3,27	AT3G27400	AT3G27400	pectate lyase
A_84_P14027	3,70	4,00	CESA4	AT5G44030	cellulose synthase A catalytic subunit 4 [UDP-forming]
A_84_P848977	3,69	3,02	AT1G68600	AT1G68600	Aluminum activated malate transporter family protein
A_84_P14372	3,68	3,50	AT1G31710	AT1G31710	putative copper amine oxidase
A_84_P820750	3,68	3,02	AT1G23710	AT1G23710	hypothetical protein
A_84_P171073	3,68	2,92	AT1G35210	AT1G35210	hypothetical protein

A_84_P193944	3,67	2,97	AT5G66650	AT5G66650	hypothetical protein
A_84_P200834	3,66	3,48	AT1G58070	AT1G58070	hypothetical protein
A_84_P17320	3,65	4,05	CNGC14	AT2G24610	cyclic nucleotide gated channel
A_84_P179534	3,64	2,89	AT5G16200	AT5G16200	50S ribosomal protein-like protein
A_84_P814244	3,64	3,19	AT2G47270	AT2G47270	transcription factor bHLH151
A_84_P175581	3,64	5,10	AT2G05160	AT2G05160	zinc finger CCCH domain-containing protein 18
A_84_P73664	3,64	3,27	AT1G77855	AT1G77855	hypothetical protein
A_84_P21194	3,64	3,34	ERF1	AT3G23240	ethylene-responsive transcription factor 1B
A_84_P257260	3,62	4,60	AT2G47780	AT2G47780	Rubber elongation factor protein (REF)
A_84_P715787	3,62	3,17	AT1G32928	AT1G32928	hypothetical protein
A_84_P21430	3,60	4,10	AT4G30250	AT4G30250	AAA domain-containing protein
A_84_P18975	3,60	4,00	PUB18	AT1G10560	U-box domain-containing protein 18
A_84_P600168	3,57	2,70	AT5G01075	AT5G01075	Glycosyl hydrolase family 35 protein
A_84_P521598	3,56	3,33	AT2G22760	AT2G22760	transcription factor bHLH19
A_84_P168493	3,52	2,82	AT3G46620	AT3G46620	C3H4 type zinc finger protein
A_84_P14991	3,51	3,42	AT5G48740	AT5G48740	putative LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
A_84_P115902	3,51	3,30	TBL33	AT2G40320	protein trichome birefringence-like 33
A_84_P20377	3,50	4,28	AT3G62160	AT3G62160	HXXXD-type acyl-transferase-like protein
A_84_P10105	3,50	4,21	XCP1	AT4G35350	Xylem cysteine proteinase 1
A_84_P18211	3,50	2,98	AR781	AT2G26530	hypothetical protein
A_84_P706463	3,49	3,81	AT3G06778	AT3G06778	DnaJ-domain-containing protein
A_84_P500133	3,48	2,92	AT1G42980	AT1G42980	formin-like protein 12
A_84_P13964	3,47	3,14	AT5G14230	AT5G14230	hypothetical protein
A_84_P296664	3,47	4,41	DMP2	AT3G21550	hypothetical protein
A_84_P18980	3,46	3,03	AT1G78500	AT1G78500	pentacyclic triterpene synthase 6
A_84_P222669	3,46	3,73	EXT4	AT1G76930	extensin 4
A_84_P860280	3,45	4,93	NAP	AT1G69490	NAC domain-containing protein 29
A_84_P22720	3,45	2,83	2A6	AT1G03410	putative 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
A_84_P13751	3,45	3,13	AT3G60490	AT3G60490	ethylene-responsive transcription factor ERF035
A_84_P169473	3,43	4,90	AT5G30500	AT5G30500	putative galactinol synthase
A_84_P839263	3,43	2,75	AT1G62290	AT1G62290	phytepsin
A_84_P23649	3,43	3,78	AT1G31050	AT1G31050	basic helix-loop-helix domain-containing protein
A_84_P95079	3,43	3,21	AT5G38610	AT5G38610	plant invertase/pectin methylesterase inhibitor domain-containing protein
A_84_P15978	3,41	3,41	LAC17	AT5G60020	laccase 17
A_84_P178184	3,41	3,73	LNG1	AT5G15580	protein longifolia1
A_84_P24057	3,41	3,67	AT3G19620	AT3G19620	putative beta-D-xylosidase 5
A_84_P819307	3,41	3,99	AT2G43590	AT2G43590	chitinase-like protein
A_84_P23644	3,40	3,09	AT1G08340	AT1G08340	Rho GTPase activating protein with PAK-box/P21-Rho-binding domain
A_84_P21406	3,39	2,77	FSD1	AT4G25100	Superoxide dismutase [Fe]
A_84_P540393	3,39	2,53	AT3G28190	AT3G28190	hypothetical protein
A_84_P168383	3,39	3,13	AT5G49130	AT5G49130	mate efflux domain-containing protein
A_84_P172851	3,38	4,04	AT3G24535	AT3G24535	hypothetical protein
A_84_P51330	3,38	4,00	DAR5	AT5G66630	DA1-related protein 5
A_84_P23843	3,37	2,73	AT2G03200	AT2G03200	aspartyl protease-like protein

A_84_P22755	3,37	4,12	RNS3	AT1G26820	ribonuclease 3
A_84_P762759	3,36	2,86	AT3G55672	AT3G55672	self-incompatibility S1 family protein
A_84_P857254	3,36	3,03	SAPX	AT4G08390	L-ascorbate peroxidase
A_84_P21523	3,36	4,21	BEE1	AT1G18400	transcription factor BEE 1
A_84_P21269	3,35	2,77	AT1G48590	AT1G48590	calcium-dependent lipid-binding domain
A_84_P504795	3,35	4,03	IRX9	AT2G37090	nucleotide-diphospho-sugar transferases-like protein
A_84_P191974	3,35	3,33	AT5G03210	AT5G03210	hypothetical protein
A_84_P19588	3,32	3,42	EXLB1	AT4G17030	expansin-like B1
A_84_P827393	3,32	2,96		AT3G48650	
A_84_P14226	3,30	4,64	BCAT-2	AT1G10070	branched-chain-amino-acid aminotransferase 2
A_84_P760106	3,30	5,18		AT3G08885	
A_84_P818712	3,30	2,29	ENH1	AT5G17170	rubredoxin family protein
A_84_P21770	3,29	3,63	AT1G23060	AT1G23060	hypothetical protein
A_84_P768447	3,28	2,06	AT5G36350	AT5G36550 (MaxID: 98%)	ECA1 gametogenesis related family protein
A_84_P759256	3,28	2,60		AT3G44245	
A_84_P824100	3,28	2,96	AT2G16630	AT2G16630	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
A_84_P535346	3,27	3,03	AT5G22540	AT5G22540	hypothetical protein
A_84_P22112	3,27	2,68	AT1G53070	AT1G53070	legume lectin-like protein
A_84_P18494	3,27	3,89	NAC007	AT1G12260	NAC domain-containing protein 7
A_84_P22489	3,27	2,49	AT5G22250	AT5G22250	putative CCR4-associated factor 1-11
A_84_P20462	3,25	2,71	CBF1	AT4G25490	dehydration-responsive element-binding protein 1B
A_84_P562837	3,23	2,94	AT5G38090	AT5G38090	hypothetical protein
A_84_P569290	3,23	3,09	AT1G32670	AT1G32670	hypothetical protein
A_84_P763555	3,21	3,80		AT4G09480	
A_84_P540376	3,20	3,49	LSH4	AT3G23290	hypothetical protein
A_84_P570804	3,20	3,25	RIC4	AT5G16490	ROP-interactive CRIB motif-containing protein 4
A_84_P157885	3,20	3,37	AT4G39320	AT4G39320	microtubule-associated protein-like protein
A_84_P15194	3,20	2,82	AT1G54020	AT1G54020	GDSL esterase/lipase
A_84_P297054	3,19	4,57	GolS6	AT4G26250	galactinol synthase 6
A_84_P115172	3,19	3,58	RIC2	AT1G27380	ROP-interactive CRIB motif-containing protein 2
A_84_P12087	3,19	2,64	AT1G68650	AT1G68650	UPF0016 protein 5
A_84_P67084	3,18	2,95	AT1G25400	AT1G25400	hypothetical protein
A_84_P10436	3,18	2,62		AT1G09890	
A_84_P753210	3,18	2,32	AT1G45223	AT1G45223) (MaxID:95%)	hypothetical protein
A_84_P858347	3,18	2,90	DGK2	AT5G63770	diacylglycerol kinase 2
A_84_P768165	3,18	2,89	AT5G39365	AT5G39365	putative defensin-like protein 40
A_84_P15105	3,17	2,35	AT1G60095	AT1G60095	jacalin-like lectin domain-containing protein
A_84_P24091	3,17	2,93	EXLA3	AT3G45960	expansin-like A3
A_84_P12935	3,14	2,51	KCS16	AT4G34250	3-ketoacyl-CoA synthase 16
A_84_P117052	3,14	3,52	AT3G25640	AT3G25640	hypothetical protein
A_84_P869292	3,13	2,76	ERF-1	AT4G17500	ethylene-responsive transcription factor 1A
A_84_P15797	3,12	2,81	scpl30	AT4G15100	putative serine carboxypeptidase-like 30
A_84_P516811	3,11	2,06	AT5G52670	AT5G52670	putative copper transport protein

A_84_P554830	3,09	2,14	AT5G20635	AT5G20635	hypothetical protein
A_84_P188064	3,08	3,17	CLE6	AT2G31085	protein CLAVATA3/ESR-related 6
A_84_P13378	3,08	3,16	GH9B1	AT1G70710	endoglucanase 8
A_84_P569414	3,07	2,72	AT2G01610	AT2G01610	invertase/pectin methylesterase inhibitor-like protein
A_84_P831768	3,06	2,82		AT2G11240	
A_84_P20826	3,04	2,43	AT1G24330	AT1G24330	U-box domain-containing protein 6
A_84_P203658	3,03	3,35	AT2G44930	AT2G44930	hypothetical protein
A_84_P167943	3,03	3,05	ERF4	AT3G15210	ethylene-responsive transcription factor 4
A_84_P583210	3,01	3,42	AT4G33550	AT4G33550	bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin-like protein
A_84_P10323	3,00	2,90	AAP4	AT5G63850	amino acid permease 4
A_84_P759032	3,00	2,69		AT3G30211	
A_84_P285010	2,99	3,08	PGSIP1	AT3G18660	plant glycogenin-like starch initiation protein 1
A_84_P536931	2,99	3,15	AT3G63450	AT3G63450	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
A_84_P12779	2,98	4,77	AT3G54040	AT3G54040	PAR1 protein
A_84_P19132	2,97	3,12	ARF11	AT2G46530	auxin response factor 11
A_84_P19457	2,97	2,25	AT4G04750	AT4G04750	sugar transporter ERD6-like 14
A_84_P22538	2,97	2,76	AT5G43530	AT5G43530	Helicase protein with RING/U-box domain
A_84_P75664	2,97	2,68	AT2G36220	AT2G36220	hypothetical protein
A_84_P12573	2,97	2,65	AT2G44940	AT2G44940	ethylene-responsive transcription factor ERF034
A_84_P10415	2,96	2,68	MBP2	AT1G52030	myrosinase-binding protein 2
A_84_P787882	2,95	2,47	AT1G65920	AT1G65920	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family with FYVE zinc finger domain
A_84_P530258	2,95	2,73	AT1G21150	AT1G21150	Mitochondrial transcription termination factor family protein
A_84_P91139	2,95	3,19	TBL3	AT5G01360	hypothetical protein
A_84_P23114	2,94	2,58		AT3G21020	
A_84_P751783	2,94	3,74	GL22	AT1G02335	germin-like protein subfamily 2 member 2
A_84_P17663	2,94	3,51	AT4G34320	AT4G34320	hypothetical protein
A_84_P21392	2,93	2,84	AT4G21650	AT4G21650	Subtilase family protein
A_84_P11909	2,93	2,61	AT4G11210	AT4G11210	disease resistance-responsive, dirigent domain-containing protein
A_84_P851051	2,93	2,66	AGP4	AT5G10430	arabinogalactan protein 4
A_84_P24047	2,92	2,31	AT3G21950	AT3G21950	methyltransferase
A_84_P580762	2,92	3,62	AT3G43710	AT3G43710	putative F-box/kelch-repeat protein
A_84_P23686	2,92	2,95	HVA22G	AT1G75700	HVA22-like protein G
A_84_P816700	2,90	2,88	AT1G17745	AT1G17745	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
A_84_P291564	2,90	2,55	AT1G59850	AT1G59850	ARM repeat-containing protein
A_84_P765250	2,90	2,59	AT4G33130	AT4G33130	hypothetical protein
A_84_P15190	2,90	3,21	AT1G04330	AT1G04330	hypothetical protein
A_84_P15811	2,90	3,30	LAC10	AT5G01190	laccase 10
A_84_P15626	2,90	3,24	AT1G24030	AT1G24030	protein kinase-like protein
A_84_P13616	2,90	4,43	AT1G26450	AT1G26450	carbohydrate-binding X8 domain-containing protein
A_84_P97886	2,89	2,83	AT2G40130	AT2G40130	heat shock-related protein
A_84_P819549	2,89	2,45	AT5G41740	AT5G41740	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein
A_84_P17326	2,88	2,18	WRKY33	AT2G38470	putative WRKY transcription factor 33
A_84_P23516	2,88	2,45	CBF4	AT5G51990	dehydration-responsive element-binding protein 1D

A_84_P291544	2,87	3,00	AT4G00890	AT4G00890	proline-rich family protein
A_84_P587696	2,86	3,38	AT5G03510	AT5G03510	C2H2-type zinc finger protein
A_84_P502358	2,86	2,80		AT4G13470	
A_84_P598005	2,86	2,56	AT2G22890	AT2G22890	Kua-ubiquitin conjugating enzyme hybrid localisation domain-containing protein
A_84_P23938	2,85	2,56	PDR5	AT2G37280	ABC transporter G family member 33
A_84_P590991	2,84	4,22	AT3G12460	AT3G12460	DEDDy 3'-5' exonuclease domain-containing protein
A_84_P12677	2,84	2,23	IPT7	AT3G23630	adenylate isopentenyltransferase 7
A_84_P17929	2,84	3,07	GolS2	AT1G56600	galactinol synthase 2
A_84_P122532	2,84	2,83	AT5G67210	AT5G67210	hypothetical protein
A_84_P592920	2,84	2,40	AT4G01390	AT4G01390	TRAF-like family protein
A_84_P76869	2,83	2,92	AT1G02070	AT1G02070	hypothetical protein
A_84_P789302	2,83	2,20	KDR	AT1G26945	basic helix-loop-helix domain-containing protein
A_84_P12504	2,83	3,35	UGT71C1	AT2G29750	UDP-glucosyl transferase 71C1
A_84_P605175	2,82	3,33	AT2G39370	AT2G39370	hypothetical protein
A_84_P545592	2,82	2,46	AT2G39650	AT2G39650	hypothetical protein
A_84_P812841	2,80	2,67	AT3G08030	AT3G08030	hypothetical protein
A_84_P260410	2,80	2,57	AT1G78450	AT1G78450	SOUL heme-binding-like protein
A_84_P758492	2,79	3,17		AT2G20818	
A_84_P102956	2,78	3,30	AT4G34330	AT4G34330	hypothetical protein
A_84_P605779	2,78	2,88	AT1G12845	AT1G12845	hypothetical protein
A_84_P572473	2,78	2,66	AT4G21920	AT4G21920	hypothetical protein
A_84_P16775	2,77	2,74	NF-YA10	AT5G06510	nuclear transcription factor Y subunit A-10
A_84_P232979	2,77	2,46	RBE	AT5G06070	putative transcriptional regulator RABBIT EARS
A_84_P210838	2,77	2,35		AT2G04580	
A_84_P19161	2,76	3,10	BGLU33	AT2G32860	beta glucosidase 33
A_84_P606188	2,76	2,86	AT3G28007	AT3G28007	nodulin MtN3-like protein
A_84_P750319	2,75	2,45		AT1G19630	
A_84_P16308	2,74	2,63	BEN1	AT2G45400	dihydroflavonol 4-reductase-like protein
A_84_P81559	2,74	2,54	AT4G33560	AT4G33560	Wound-responsive family protein
A_84_P825596	2,74	3,05	CYCA2;3	AT1G15570	cyclin-A2-3
A_84_P70304	2,73	2,69	AT3G21310	AT3G21310	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
A_84_P822968	2,73	2,45	KNAT7	AT1G62990	homeobox protein knotted-1-like 7
A_84_P756412	2,73	2,26	AT2G15029	At2g15030	hypothetical protein
A_84_P752395	2,73	3,20	AT1G62870	AT1G62870	hypothetical protein
A_84_P14951	2,73	2,12	AT5G38020	AT5G38020	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase-like protein
A_84_P19451	2,72	2,73	GA1	AT4G02780	Ent-copalyl diphosphate synthase
A_84_P10075	2,72	3,01	NAC073	AT4G28500	NAC domain containing protein 73
A_84_P284290	2,72	3,10	AT4G26380	AT4G26380	cysteine/histidine-rich C1 domain-containing protein
A_84_P11868	2,72	2,48	AT3G62260	AT3G62260	putative protein phosphatase 2C 49
A_84_P10642	2,72	2,38	AT2G39850	AT2G39850	subtilisin-like serine protease
A_84_P14084	2,71	2,64	ROPGEF2	AT1G01700	Rop guanine nucleotide exchange factor 2
A_84_P736761	2,71	2,24	TUA4	AT1G04820	
A_84_P199304	2,71	3,83	PDF1.4	AT1G19610	defensin-like protein 19
A_84_P837016	2,71	4,25	ERS2	AT1G04310	ethylene response sensor 2

A_84_P275660	2,71	2,31	AGP14	AT5G56540	arabinogalactan protein 14
A_84_P761937	2,70	2,26	AT3G55665	AT3G55665	self-incompatibility S1 family protein
A_84_P15114	2,70	2,51	AT1G12380	AT1G12380	hypothetical protein
A_84_P857301	2,70	2,02	CZF1	AT2G40140	zinc finger CCCH domain-containing protein 29
A_84_P803684	2,69	2,79	EOL2	AT5G58550	protein ETO1-like 2
A_84_P769675	2,69	2,64	CPK28	AT5G66210	calcium-dependent protein kinase 28
A_84_P18294	2,69	2,43	IAA20	AT2G46990	auxin-responsive protein IAA20
A_84_P66984	2,69	2,84	AT1G64360	AT1G64360	hypothetical protein
A_84_P16667	2,68	2,33	AT4G22940	AT4G22940	protein kinase family protein
A_84_P596337	2,68	2,76	WOX5	AT3G11260	WUSCHEL-related homeobox 5
A_84_P591196	2,68	2,37	AT4G22560	AT4G22560	hypothetical protein
A_84_P19444	2,67	3,29	AT1G12160	AT1G12160	Flavin-binding monooxygenase family protein
A_84_P18041	2,67	3,00	AT1G32690	AT1G32690	hypothetical protein
A_84_P750377	2,67	2,99		AT1G21220	
A_84_P13196	2,67	2,84	AT5G09300	AT5G09300	2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component, alpha subunit
A_84_P10187	2,67	2,17	AT5G16340	AT5G16340	AMP-binding protein 6
A_84_P574794	2,67	2,07	AT2G20142	AT2G20142	Toll-Interleukin-Resistance domain-containing protein
A_84_P13282	2,66	2,22	AT1G75710	AT1G75710	C2H2-like zinc finger protein
A_84_P194234	2,66	2,86	AT1G33800	AT1G33800	hypothetical protein
A_84_P531612	2,65	3,10	AT4G04745	AT4G04745	hypothetical protein
A_84_P573931	2,64	2,60	AT2G22340	AT2G22340	hypothetical protein
A_84_P515003	2,64	3,16	AT5G45540	AT5G45540	hypothetical protein
A_84_P22168	2,63	2,32		AT3G21010	
A_84_P20577	2,63	3,71	AT5G11540	AT5G11540	D-arabinono-1,4-lactone oxidase family protein
A_84_P18681	2,62	2,68	RBK1	AT5G10520	ROP binding protein kinase 1
A_84_P23427	2,61	3,12	MYB43	AT5G16600	myb domain protein 43
A_84_P220848	2,61	2,58	RHS16	AT4G29180	protein root hair specific 16
A_84_P11903	2,61	2,54	ORA59	AT1G06160	ethylene-responsive transcription factor ERF094
A_84_P597767	2,60	3,17	AT1G12600	AT1G12600	UDP-N-acetylglucosamine transporter-like protein
A_84_P14482	2,60	2,63	AT2G24560	AT2G24560	GDSL esterase/lipase
A_84_P22531	2,60	2,23	AT5G41400	AT5G41400	RING/U-box domain-containing protein
A_84_P131556	2,59	2,98	TBL39	AT2G42570	protein trichome birefringence-like 39
A_84_P150658	2,59	2,29	DAR7	AT5G66610	protein DA1-related 7
A_84_P825992	2,59	2,08	WAVE1	AT2G34150	protein SCAR1
A_84_P311333	2,58	2,80	GPAT6	AT2G38110	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6
A_84_P510022	2,58	3,21	AT2G03180	AT2G03180	hypothetical protein
A_84_P14652	2,57	2,14	MAPKKK20	AT3G50310	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 20
A_84_P21087	2,57	2,10	AT2G02520	AT2G02520	RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase)-related family protein
A_84_P542240	2,56	2,14		AT4G01525	
A_84_P193424	2,56	2,25	JAZ1	AT1G19180	protein TIFY 10A
A_84_P761932	2,56	3,57	AT3G55252	AT3G55252	self-incompatibility S1 family protein
A_84_P836721	2,56	2,10	AT4G19520	AT4G19520	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein
A_84_P106252	2,56	3,02	HB28	AT3G50890	homeobox protein 28

A_84_P18911	2,56	2,45	AT1G75720	AT1G75720	hypothetical protein
A_84_P11175	2,56	2,62	PIN1	AT1G73590	auxin efflux carrier component 1
A_84_P804586	2,55	2,30	AT2G43150	AT2G43150	Proline-rich extensin-like family protein
A_84_P603366	2,55	2,80	arpc2b	AT2G33385	actin-related protein C2B
A_84_P602364	2,55	3,19	AT1G71015	AT1G71015	hypothetical protein
A_84_P224809	2,54	2,12	AT2G38790	AT2G38790	hypothetical protein
A_84_P237923	2,53	2,57	AT1G68470	AT1G68470	Exostosin family protein
A_84_P842320	2,52	3,04		AT5G43840	
A_84_P10939	2,52	2,31	AT4G02200	AT4G02200	protein dehydration-INDUCED 19-5
A_84_P10179	2,51	3,03	MYB46	AT5G12870	transcription factor MYB46
A_84_P837804	2,51	2,95	IAMT1	AT5G55250	IAA carboxylmethyltransferase 1
A_84_P534335	2,50	2,76	AT4G21970	AT4G21970	hypothetical protein
A_84_P13339	2,50	2,21	AT1G79630	AT1G79630	putative protein phosphatase 2C 18
A_84_P24159	2,50	2,40	AT3G61820	AT3G61820	aspartyl protease-like protein
A_84_P759168	2,49	2,12		AT3G30733	
A_84_P606494	2,49	3,43	GDU7	AT5G38770	glutamine dumper 7
A_84_P18778	2,48	2,08	AAP6	AT5G49630	amino acid permease 6
A_84_P202538	2,48	3,11	AT5G22550	AT5G22550	hypothetical protein
A_84_P20092	2,48	3,87	AT2G20470	AT2G20470	putative serine/threonine-protein kinase
A_84_P768685	2,48	3,38		AT5G27927	
A_84_P704129	2,47	2,15		AT5G53775	
A_84_P750226	2,47	2,73		AT1G47950	
A_84_P789317	2,46	3,11		AT3G56275	
A_84_P19808	2,46	3,56	MAP65-8	AT1G27920	microtubule-associated protein 65-8
A_84_P758488	2,46	2,83	AT2G18969	AT2G18969	hypothetical protein
A_84_P20495	2,46	2,71	AT4G32800	AT4G32800	ethylene-responsive transcription factor ERF043
A_84_P21574	2,46	3,04	AT5G38340	AT5G38340	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein
A_84_P14710	2,46	2,41	SIB1	AT3G56710	sigma factor binding protein 1
A_84_P310203	2,46	2,41	UPS1	AT2G03590	ureide permease 1
A_84_P808037	2,46	2,45	AT1G28400	AT1G28400	hypothetical protein
A_84_P167633	2,45	2,70	SPL5	AT3G15270	squamosa promoter-binding-like protein 5
A_84_P21229	2,45	3,52	AT3G21420	AT3G21420	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
A_84_P703501	2,45	2,91	AT4G13992	AT4G13992	cysteine/histidine-rich C1 domain-containing protein
A_84_P14899	2,44	2,61	CIPK5	AT5G10930	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 5
A_84_P18366	2,44	2,37	GRP5	AT3G20470	glycine-rich protein 5
A_84_P754519	2,44	3,58		AT1G48268	
A_84_P14198	2,43	2,58	AT1G67400	AT1G67400	ELMO/CED-12 domain-containing protein
A_84_P767772	2,43	2,39		AT5G39995	
A_84_P13368	2,43	2,98	ATSBT5.2	AT1G20160	Subtilisin-like serine endopeptidase-like protein
A_84_P17266	2,42	2,66	SSL1	AT2G41300	strictosidine synthase-like 1
A_84_P789063	2,42	2,20	AT5G20110	AT5G20110	dynein light chain type 1-like protein
A_84_P11844	2,41	2,12	AT1G24000	AT1G24000	polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport-like protein
A_84_P294984	2,41	2,38	AT1G24735	AT1G24735	caffeoyl-CoA O-methyltransferase
A_84_P12143	2,41	3,30	CYP707A3	AT5G45340	abscisic acid 8'-hydroxylase 3

A_84_P22388	2,41	2,51	AT4G33070	AT4G33070	pyruvate decarboxylase
A_84_P750237	2,41	2,73		AT1G69110	
A_84_P829463	2,40	2,74	AT5G17340	AT5G17340	Putative membrane lipoprotein
A_84_P309023	2,40	2,92	AT5G66440	AT5G66440	hypothetical protein
A_84_P802884	2,39	2,74	AT3G46300	AT3G46310	hypothetical protein
A_84_P842669	2,39	2,32	AT1G29720	AT1G29720	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
A_84_P753723	2,39	2,65	AT1G47497	AT1G47497	RNase H domain-containing protein
A_84_P768038	2,39	2,35	AT5G18403	AT5G18403	defensin-like protein 218
A_84_P67924	2,39	2,40	RGTA2	AT5G41820	RAB geranylgeranyl transferase alpha subunit 2
A_84_P568436	2,38	2,16	BRX-LIKE3	AT1G54180	BREVIS RADIX-like 3
A_84_P787776	2,38	2,05	AT3G56260	AT3G56260	hypothetical protein
A_84_P767638	2,38	2,21	AT5G52930	AT5G52930	hypothetical protein
A_84_P529333	2,37	2,17	DUF2	AT1G11420	agenet domain-containing protein
A_84_P242573	2,37	2,59	AT5G54470	AT5G54470	B-box type zinc finger-containing protein
A_84_P735102	2,37	3,04	AT5G15581	AT5G15581	hypothetical protein
A_84_P553411	2,37	2,28	AT1G71870	AT1G71870	protein novel ion carrier-2
A_84_P22967	2,37	2,09	UCP5	AT2G22500	uncoupling protein 5
A_84_P559167	2,36	2,42	AT4G32000	AT4G32000	protein kinase family protein
A_84_P210848	2,36	2,12	AT5G22930	AT5G22930	hypothetical protein
A_84_P249275	2,36	2,22	AT1G77460	AT1G77460	armadillo/beta-catenin-like repeat and C2 domain-containing protein
A_84_P12139	2,36	2,10	AT5G44400	AT5G44400	FAD-binding and BBE domain-containing protein
A_84_P17088	2,36	2,21	AT1G78530	AT1G78530	protein kinase-like protein
A_84_P14635	2,35	2,18	AT1G02460	AT1G02460	Pectin lyase-like protein
A_84_P18780	2,35	2,54	AT5G50120	AT5G50120	transducin/WD40 domain-containing protein
A_84_P14448	2,35	3,32	MEE23	AT2G34790	FAD-binding and BBE domain-containing protein
A_84_P22166	2,34	2,21	ESM1	AT3G14210	epithiospecifier modifier 1
A_84_P787324	2,34	2,36	AT4G36280	AT4G36280	histidine kinase-like ATPase domain-containing protein
A_84_P511022	2,34	2,13	AT2G43800	AT2G43800	formin-like protein 2
A_84_P22799	2,34	2,68	AT1G55760	AT1G55760	BTB/POZ domain-containing protein
A_84_P12622	2,33	2,70	NTL8	AT2G27300	protein NTM1-like 8
A_84_P702189	2,33	2,31	AT5G46877	AT5G46877	putative defensin-like protein 304
A_84_P565128	2,33	2,04	AT3G10750	AT3G10750	FBD domain-containing protein
A_84_P17671	2,33	2,34	FD	AT4G35900	protein FD
A_84_P259610	2,33	2,16	AT3G01240	AT3G01240	hypothetical protein
A_84_P23923	2,33	2,52	AT2G37900	AT2G37900	putative peptide/nitrate transporter
A_84_P753091	2,32	2,29	AT1G45215	AT1G45215	hypothetical protein
A_84_P849839	2,32	2,11	AT1G49475	AT1G49475	B3 domain-containing protein
A_84_P18263	2,31	2,80	AT2G38090	AT2G38090	myb/SANT-like DNA-binding domain-containing protein
A_84_P102366	2,31	3,06	AT3G15280	AT3G15280	hypothetical protein
A_84_P16097	2,30	2,28	AT1G24140	AT1G24140	matrix metalloprotease domain-containing protein
A_84_P16988	2,30	2,49	AT5G04330	AT5G04330	ferulate-5-hydroxylase
A_84_P11600	2,30	2,14	SDG21	AT2G24740	histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific SUVH8
A_84_P15366	2,30	2,40	AT1G11210	AT1G11210	hypothetical protein

A_84_P20359	2,30	2,17	AT3G57540	AT3G57540	Remorin family protein
A_84_P760097	2,30	2,00	GRF4	AT3G52910	growth-regulating factor 4
A_84_P210018	2,30	2,61	MEE53	AT4G10560	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
A_84_P13337	2,30	2,17	AT1G28390	AT1G28390	serine/threonine-protein kinase-like protein
A_84_P21445	2,29	2,03	AT4G33820	AT4G33820	glycosyl hydrolase family 10 protein
A_84_P768632	2,29	2,58	AT5G05598	AT5G05598	hypothetical protein
A_84_P766298	2,29	2,05	AT5G34881	AT5G34887	hypothetical protein
A_84_P533968	2,29	3,67	HB21	AT2G02540	homeobox protein 21
A_84_P23011	2,29	2,18	NRPE3B	AT2G15400	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3-B
A_84_P851667	2,28	2,03	AT3G23840	AT3G23840	HXXXD-type acyl-transferase-like protein
A_84_P17024	2,28	2,79	AT1G23460	AT1G23460	polygalacturonase
A_84_P824560	2,28	2,29		AT3G23090	
A_84_P751116	2,28	2,11	BGLU35	AT1G47600	myrosinase 5
A_84_P18795	2,27	2,16	ATK3	AT5G54670	kinesin 3
A_84_P12764	2,27	2,30	GATL2	AT3G50760	putative galacturonosyltransferase-like 2
A_84_P16558	2,26	2,01	CHX20	AT3G53720	cation/H(+) antiporter 20
A_84_P829642	2,26	2,44	AT1G30160	AT1G30160	hypothetical protein
A_84_P172581	2,25	2,16	AT3G03440	AT3G03440	armadillo/beta-catenin-like repeat-containing protein
A_84_P273250	2,25	2,63	AT5G56220	AT5G56220	nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding protein
A_84_P868105	2,25	2,41	AT3G61490	AT3G61490	polygalacturonase-like protein
A_84_P22133	2,25	2,18	BGLU43	AT3G18070	beta glucosidase 43
A_84_P784578	2,24	2,30	ENODL9	AT3G20570	early nodulin-like protein 9
A_84_P791064	2,23	3,06	AT5G50290	AT5G50290	hypothetical protein
A_84_P12232	2,23	2,80	IRX6	AT5G15630	COBRA-like protein 4
A_84_P769201	2,22	2,16	AT5G15008	AT5G15008	hypothetical protein
A_84_P19504	2,22	2,19	AT4G22730	AT4G22730	leucine-rich repeat protein kinase-like protein
A_84_P526357	2,22	2,46	AT4G27435	AT4G27435	hypothetical protein
A_84_P544339	2,21	2,38	XND1	AT5G64530	xylem NAC domain 1
A_84_P201968	2,21	2,23	AT2G18100	AT2G18100	hypothetical protein
A_84_P24121	2,21	2,20	AT3G52900	AT3G52900	hypothetical protein
A_84_P11937	2,21	2,34	sks4	AT4G22010	protein SKU5 similar 4
A_84_P820385	2,20	3,00	AT3G12700	AT3G12700	aspartyl protease family protein
A_84_P11887	2,19	2,22	AT4G02660	AT4G02660	Beige/BEACH and WD40 domain-containing protein
A_84_P218178	2,19	4,24	AT5G03795	AT5G03795	putative glycosyltransferase
A_84_P768444	2,18	2,64	AT5G36350	AT5G36470	ECA1 gametogenesis related family protein
A_84_P10788	2,18	3,49	HMT-1	AT3G25900	homocysteine S-methyltransferase 1
A_84_P294174	2,18	2,74	WRKY36	AT1G69810	putative WRKY transcription factor 36
A_84_P10263	2,18	2,42	TT10	AT5G48100	laccase-15
A_84_P167173	2,17	2,01	DREB1A	AT4G25480	dehydration-responsive element-binding protein 1A
A_84_P844453	2,17	2,08	MAP65-2	AT4G26760	microtubule-associated protein 65-2
A_84_P163793	2,16	2,01	AT3G15760	AT3G15760	hypothetical protein
A_84_P17974	2,16	2,45	FMO GS-OX4	AT1G62570	flavin-containing monooxygenase FMO GS-OX4
A_84_P291394	2,15	2,26	BOP2	AT2G41370	ankyrin repeat and BTB/POZ domain-containing protein

A_84_P754304	2,15	2,26		AT1G24733	
A_84_P13829	2,14	2,41	AT4G22590	AT4G22590	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein
A_84_P20511	2,14	2,20	AGP18	AT4G37450	Lysine-rich arabinogalactan protein 18
A_84_P14194	2,13	2,33	AT1G04040	AT1G04040	HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase
A_84_P17945	2,13	2,11	AT2G04060	AT2G04060	glycosyl hydrolase family 35 protein
A_84_P17026	2,13	2,21	AT1G51300	AT1G51300	acyl-protein thioesterase-related protein
A_84_P561646	2,13	2,06	AT3G28420	AT3G28420	Putative membrane lipoprotein
A_84_P14332	2,13	2,04	AT1G68420	AT1G68420	class II tRNA amino-acyl synthetase-like catalytic core domain-containing protein
A_84_P602497	2,12	2,05	COPT4	AT2G37925	copper transporter 4
A_84_P731211	2,12	2,12	AT3G55930	AT3G55930	Pre-mRNA-splicing factor 3
A_84_P15342	2,12	2,08	AT2G41820	AT2G41820	Leucine-rich repeat protein kinase-like protein
A_84_P280020	2,12	2,22	AT4G31640	AT4G31640	B3 domain-containing protein REM5
A_84_P536145	2,12	2,22	AT4G31660	AT4G31660	B3 domain-containing protein REM7
A_84_P10208	2,11	2,09	RD22	AT5G25610	dehydration-responsive protein RD22
A_84_P13620	2,11	2,25	AT3G21600	AT3G21600	Senescence/dehydration-associated protein-like protein
A_84_P751246	2,11	2,17		AT1G54750	
A_84_P597157	2,11	2,02	AT2G38010	AT2G38010	neutral ceramidase
A_84_P765333	2,10	2,17	AT4G24974	AT4G24974	self-incompatibility S1 family protein
A_84_P13326	2,10	2,04	PIN3	AT1G70940	auxin efflux carrier component 3
A_84_P22073	2,10	2,30	HAT9	AT2G22800	homeobox-leucine zipper protein HAT9
A_84_P20610	2,10	2,17	NADP-ME3	AT5G25880	malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating)(NADP+)
A_84_P10272	2,09	2,03	NF-YC5	AT5G50490	nuclear transcription factor Y subunit C-5
A_84_P521842	2,09	2,14	AT3G58380	AT3G58380	TRAF-like family protein
A_84_P19943	2,08	2,96	AT1G49450	AT1G49450	WD40 domain-containing protein
A_84_P94429	2,08	2,19	RABC2A	AT5G03530	RAB GTPase-C2A
A_84_P169053	2,07	2,52	AT3G45730	AT3G45730	hypothetical protein
A_84_P210388	2,07	3,16	AT2G21820	AT2G21820	hypothetical protein
A_84_P821812	2,07	2,28	AT5G24580	AT5G24580	heavy metal transport/detoxification domain-containing protein
A_84_P52990	2,06	2,04	GLN1;4	AT5G16570	glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-4
A_84_P21197	2,06	2,28	AT3G25280	AT3G25280	major facilitator protein
A_84_P14907	2,06	2,08	PAO1	AT5G13700	Polyamine oxidase 1
A_84_P787726	2,06	2,04	AT1G77700	AT1G77700	pathogenesis-related thaumatin-like protein
A_84_P504518	2,05	2,30	AT1G13920	AT1G13920	Remorin family protein
A_84_P253335	2,05	2,41	AT2G07000	AT2G07000	hypothetical protein
A_84_P549629	2,04	2,08	PHOT2	AT5G58140	phototropin 2
A_84_P196024	2,04	2,12	SQS2	AT4G34650	squalene synthase 2
A_84_P238533	2,04	2,47	AT5G49320	AT5G49320	hypothetical protein
A_84_P247205	2,03	2,09	AT5G57670	AT5G57670	protein kinase-like protein
A_84_P22798	2,03	2,13	GSTU23	AT1G78320	glutathione S-transferase TAU 23
A_84_P235683	2,03	2,06	AT1G62000	AT1G62000	hypothetical protein
A_84_P23137	2,03	2,12		AT3G43690	
A_84_P542495	2,02	2,67	AT5G45320	AT5G45320	hypothetical protein
A_84_P16690	2,02	2,61	CRF4	AT4G27950	ethylene-responsive transcription factor CRF4
A_84_P789056	2,02	2,44	FRU	AT2G28160	FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED

					transcription factor
A_84_P22556	2,02	2,10	AT5G48060	AT5G48060	C2 calcium/lipid-binding and phosphoribosyltransferase C-terminal domain-containing protein
A_84_P536949	2,01	2,13	AT4G06744	AT4G06744	Leucine-rich repeat-containing protein
A_84_P765062	2,01	2,20		AT4G24415	
A_84_P834709	2,01	2,23	GLIP5	AT1G53920	GDSL esterase/lipase 5
A_84_P23037	2,00	2,03	RGL2	AT3G03450	DELLA protein RGL2
A_84_P12420	2,00	2,26	AT1G14730	AT1G14730	Cytochrome b561/ferric reductase transmembrane-like protein
A_84_P533108	2,00	2,65	AT2G15830	AT2G15830	hypothetical protein

Danksagung

Nach vielen Jahren intensiver Arbeit liegt sie nun vor mir: meine Dissertation. Damit ist es an der Zeit, mich bei denjenigen zu bedanken, die mich in dieser spannenden Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben.

Zu besonderem Dank bin ich meinen Doktorvater Prof. Dr. Uwe Sonnewald verpflichtet, v.a. für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung. Mit seinem unerschöpflichen Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen hat er mich stets in neue Sphären gelenkt.

Ich danke Ruth Stadler für die Übernahme des Zweitgutachtens, die schöne gemeinsame Zeit auf der Plasmodesmata-Konferenz 2010 und die zahlreichen Tipps und aufmunternden Gespräche.

Mein herzlicher Dank gilt auch Prof. Dr. Manfred Marschall, der seine Aufgabe als Mentor stets ernst genommen hat, immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke Prof. Dr. Benedikt Kost und Prof. Dr. Manfred Marschall für die Teilnahme am Prüfungskollegium.

Bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Biochemie, der für lange Zeit mein „zweites Zuhause“ war, möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft bedanken. Ich werde auch an viele schöne Momente außerhalb des Laboralltags und die tollen Feiern gerne zurückdenken.

Herzlicher Dank auch an alle Mitglieder der MPP, die immer sich immer viel Zeit genommen haben und wertvolle Tipps auf Lager hatten: Coco, Wolfi, Conny, Ruth, Franz, Chrissi, Sabine, Susi, Nadja, Nina und Petra. Unvergessen bleiben natürlich auch diverse Sushi-Runden.

Ich danke allen Mitgliedern des Labors 01.169 für die immense Unterstützung. Dank euch und der guten Stimmung bin ich immer gerne ins Labor gegangen. Besonders danken möchte ich der „Stammbesetzung“: Kathrin für deinen Rückhalt, die wertvollen Ratschläge aus dem Methodenordner oder aus den Karteikärtchen, die leckeren Kuchen, den ein oder anderen „Fahrdienst“ und die vielen witzigen Abendveranstaltungen mit dir. Meinen Jungs für ihre Hilfsbereitschaft und neue Einblicke in alte Dinge ☺. Max (aka Kraninger), dem langersehnten zweiten Mitglied in der PD-Gruppe, für die vielen tollen Gespräche,

die Zusammenarbeit und deinen Humor. Christian (aka Lämmli) für deine ruhige gelassene Art, die mich oftmals wieder runtergebracht hat. Auch nicht zu vergessen Moe für seine schlechten Witze und Anzüglichkeiten und die Boxen, die du mir vermacht hast (die haben mich oft an den Kampf um die Lautstärke erinnert *g*). Ebenso zu erwähnen sind die Studenten, die einen wesentlichen Teil an meiner Arbeit beigetragen haben: Ina - die beste Masterstudentin, die man sich vorstellen kann und die mir auch privat sehr ans Herz gewachsen ist -, meine Bachelorstudenten Mirjam Steingruber und Walter Schröder, und natürlich Ola und Maria.

Mein herzlicher Dank gilt natürlich auch den Mitgliedern meines „zweiten“ Labors: Christian, Jessi, Marlene, Kirsten und Haina. Danke, dass ihr mir im Schreibraum Asyl gegeben habt und mich immer in alles miteinbezogen habt. Ich habe mich bei euch sehr wohl gefühlt. Im Speziellen danke ich meinen Schreibkumpanen Jessi und Christian für die vielen regen Diskussionen, Hilfe beim Mikroarray und fürs Motivieren.

Susanne Morbach, Andreas Burkovski und Lisa Bäumer danke ich für die super Organisation und für die vielen Vorteile als Mitglied in der Graduiertenschule des SFB796. Danke Lisa, Elena, Julia, Eva, Camilla, Adriana und Vinay für die vielen lustigen Abende.

Ich danke Dr. Jörg Hofmann für seine Lipidomics-Bemühungen und Dr. Ralf Palmisano für die Einführung in die Welt der Mikroskopie. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Frederik Börnke, mit dem ich immer gerne über mein Thema diskutiert habe und der durch seine fröhliche Art eine Bereicherung des Arbeitsalltages war.

Danke Stephen für deine Hilfsbereitschaft, v.a. beim Mikroarray, die gemeinsamen Kochtage, deine super leckeren Kuchen und die vielen sonstigen Leckereien.

Herzlicher Dank auch an Anja Schillinger, die mich das ganze Studium begleitet hat und mit der das Lernen auch immer einen gewissen Spaßfaktor hatte.

Meinem Fitnessstudio XXL Erlangen danke ich für das tolle Kursangebot, ohne das meine Psyche wahrscheinlich nicht so stabil gewesen wäre.

Jessi und Kathrin Auburger danke ich für die vielen lustigen Momente und die gemeinsamen Mädelsabende.

For Adriana: Thank you very much for our Happy Potato Tuesdays. You cannot imagine how much this and your positive energy helped me especially during the writing phase.

Danke Coco für die schönen Pausen, dafür, dass wir das gemeinsam durchgezogen haben, auch wenn es einige Tiefpunkte gab und dafür, dass du immer für mich da warst: Java Chip Chocolate Cream rules!

Danke Suayib, der den Großteil des Weges seit der Kollegstufe gemeinsam mit mir gegangen ist. Auch wenn es Höhen und Tiefen gab: du wirst immer einen besonderen Platz in meinem Herzen haben.

Danke Leo fürs Zuhören, deine Ehrlichkeit, das ein oder andere Aufbauen und die vielen schönen Momente außerhalb des Labors. Unvergessen bleiben vor allem unsere Sport-Sofa-Samstage.

Danke Annabel dafür, dass du immer für mich da warst/bist. Trotz der 6.081 Kilometer Entfernung war deine mentale Unterstützung über Skype und Voice mail unersetzbar.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Patin und meinem Paten für die durchgehende Unterstützung bedanken.

Eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht nehmen meine Familie und mein Freund ein, ohne die ich nicht so weit gekommen wäre.
Ich danke meinen Eltern und meiner Schwester für die immense Unterstützung - mental und finanziell - und ihre liebevolle Fürsorge! Denn auch wenn es mal nicht so gut in der Arbeit lief, bin ich immer weich gefallen. Meiner Sisti danke ich außerdem fürs Korrekturlesen und für die lustigen Spieleabende und sonstige kulinarische Verwöhnabende. Danke an dieser Stelle auch an Roli, v.a. für deine Grillkünste, die vielen Fahrten nach Erlangen und die Hilfe bei diversen Umzügen.
Danke Christoph für deine bedingungslose Liebe, deinen Rückhalt, deine Selbstlosigkeit und dafür, dass du mir immer geduldig zuhörst, mich auffängst, mich zum Lachen bringst und mich nie aufgibst. Du bist das Beste, was mir passieren konnte!

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Katrin Link
Geburtsdatum	17.09.1983
Geburtsort	Nürnberg

Schulische und akademische Ausbildung

seit 03/2009	Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg Lehrstuhl für Biochemie, Graduate School SFB 796 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Promotion) Thema: „Molekulare Analyse der plasmodesmalen Assoziation des viralen Movementproteins MP17“
10/2003 bis 01/2009	Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg Diplomstudium Biologie, Schwerpunkt Biochemie Diplomarbeit: „Funktionelle Charakterisierung von cytosolischen Hsp70-Isoformen in *Arabidopsis thaliana*“ Abschlussnote 1,0
09/1994 bis 06/2003	Helene-Lange-Gymnasium, Fürth Allgemeine Hochschulreife 1,4 Leistungskurse: Englisch, Biologie

Weitere Qualifikationen

Sprachen	Deutsch (Muttersprache) Englisch (fließend in Wort und Schrift) Französisch (Grundkenntnisse)
EDV	Geübter Umgang mit den MS-Office Programmen Mikroskopsoftware Leica Application Suite Advanced Fluorescence
Lehrerfahrung	Betreuung von Abschlussarbeiten (Master, Bachelor) Betreuung von Facharbeiten

Publikationsliste

Jungkunz I, Link K, Vogel F, Voll LM, Sonnewald S, Sonnewald U (2011) AtHsp70-15-deficient Arabidopsis plants are characterized by reduced growth, a constitutive cytosolic protein response and enhanced resistance to TuMV. Plant Journal **66:** 983-995

Link K, Vogel F, Sonnewald U (2011) PD trafficking of potato leaf roll virus movement protein in Arabidopsis depends on site-specific protein phosphorylation. Front Plant Sci **2**

Thran M, Link K, Sonnewald U (2012) The Arabidopsis DCP2 gene is required for proper mRNA turnover and prevents transgene silencing in Arabidopsis. Plant Journal **72:** 368-377

Konferenzbeiträge

Vorträge

Juli 2013	"Molecular Analysis of MP17 and its Putative Interaction Partners"; Best Talk Award 5th Annual Retreat, Erlangen School of Molecular Communication, Kloster Banz, Bad Staffelstein, Germany
Juli 2012	"How can a putative choline transporter influence the plasmodesmal localization of MP17?" 4th Annual Retreat, Erlangen School of Molecular Communication, Kloster Banz, Bad Staffelstein, Germany
Dezember 2011	„NGS-Anwendungen bei Arabidopsis" Einführung in die Next-Generation-Sequencing-Plattform, Nikolaus-Fiebiger-Zentrum, Erlangen, Deutschland
Juli 2011	"Insights into plasmodesmal transport – the PLRV MP17" 3rd Annual Retreat, Erlangen School of Molecular Communication, Kloster Banz, Bad Staffelstein, Germany
September 2010	"Insights into plasmodesmal transport – the PLRV MP17" 2nd Annual Retreat, Erlangen School of Molecular Communication, Kloster Banz, Bad Staffelstein, Germany
März 2010	"Insights into plasmodesmal transport – the PLRV MP17" Plasmodesmata 2010 Conference, Sydney, Australia
September 2009	"Analysis of the macromolecule transport in plants and molecular analysis of a viral movement protein" First Annual Retreat, Erlangen School of Molecular Communication, Schloss Atzelsberg, Atzelsberg, Germany

Poster

September 2013	Link K., Thran M. und Sonnewald U. “Molecular Analysis of MP17 and its Putative Interaction Partners” OICE Eröffnung, Erlangen, Deutschland
Oktober 2011	Link K., Thran M., Vogel F., Hofius D., und Sonnewald U. “Insights into plasmodesmal transport - the PLRV MP17” First International SFB 796 Conference: Mechanisms of viral host cell manipulations: from plants to humans, Bamberg, Germany
September 2011	Link K., Thran M., Vogel F., Hofius D., und Sonnewald U. Insights into plasmodesmal transport -- the PLRV MP17. Botanikertagung, Berlin, Germany; 18. – 23. September, 2011.
Juli 2011	Link K., Thran M., Vogel F., Hofius D., und Sonnewald U. “Insights into plasmodesmal transport – the PLRV MP17” 3rd Annual Retreat, Erlangen School of Molecular Communication, Kloster Banz, Bad Staffelstein, Germany
Februar 2011	Link K., Vogel F. und Sonnewald U. “PD trafficking of the PLRV movement protein in Arabidopsis depends on site–specific protein phosphorylation” 24. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, Germany; 22. – 25. February 2011.