

*Fatty Acid Export (FAX)-Proteine  
in Arabidopsis thaliana und  
Chlamydomonas reinhardtii*

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

von  
Janick Peter

Saarbrücken  
2021

Tag des Kolloquiums: 24.02.2022

Dekan: Prof. Dr. Jörn Walter

Berichterstatter: Prof. Dr. Katrin Philippar  
Prof. Dr. Michael Schroda

Vorsitz: Prof. Dr. Uli Müller

Akad. Mitarbeiter: Dr. Mark Lommel

*"Now, here, you see, it takes all the running you can do, to keep in the same place.*

*If you want to get somewhere else, you must run at least twice as fast as that!"*

*- Lewis Carroll -*

## Zusammenfassung

In Landpflanzen und grünen Mikroalgen findet die *de novo* Synthese von Fettsäuren, welche als Bausteine für die Bildung von Membranlipiden oder Triacylglycerol (TAG)-Öl dienen, in Plastiden statt. Dazu müssen Fettsäuren teilweise aus dem Plastiden heraus und ins ER transportiert werden. Der Transport von Fettsäuren über die Chloroplasten-Hüllmembranen wird in *Arabidopsis thaliana* durch FAX1 (*fatty acid export 1*) vermittelt. FAX-Proteine sind allerdings bisher noch weitestgehend in ihrem Transport- und Wirkmechanismus unverstanden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Membrantopologie sowie die Orientierung von FAX-Proteinen in der Lipidmembran unterscheiden. Des Weiteren konnten mögliche Interaktionspartner von AtFAX1 identifiziert werden. In *Chlamydomonas reinhardtii* sind FAX-Proteine bis *dato* nur unzureichend untersucht. In dieser Studie konnte die FAX-Proteinfamilie in *Chlamydomonas* vorgestellt sowie zwei FAX-Proteine näher charakterisiert werden, die jeweils orthologe Proteine zu AtFAX1 und AtFAX5/6 darstellen. Das Protein cFAX konnte in der Chloroplasten-Hüllmembran lokalisiert und als einen *missing link* des Fettsäureexports aus dem Chloroplasten charakterisiert werden. Das erFAX-Protein konnte im ER lokalisiert werden und scheint dort am Fettsäureimport beteiligt zu sein. Durch die Überexpression von FAX-Proteinen in *Chlamydomonas* konnte die TAG-Produktion gesteigert und somit auch ein Weg zu einer industriellen Anwendung der Erkenntnisse geebnet werden.

## Abstract

In land plants and green micro algae, fatty acid *de novo* synthesis occurs in plastids. These fatty acids are building blocks for acyl lipids in biomembranes or triacylglycerol (TAG) oils. Therefore, fatty acids need to be transported from the chloroplast to the ER. The export of fatty acids across the envelope membranes of chloroplasts is mediated by FAX1 (*fatty acid export 1*) in *Arabidopsis thaliana*. The mechanism of fatty acid transport by proteins of the FAX family, however, is still unknown. In this study, it was shown that FAX proteins differ in their membrane topology and orientation in the lipid bilayer membrane. Further, putative interaction partners of AtFAX1 could be identified. FAX proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*, however, are still poorly investigated. Here, the FAX protein family in *Chlamydomonas* is presented and two FAX proteins are further characterized, which represent orthologs of AtFAX1 and AtFAX5/6. The protein cFAX could be localized at the chloroplast envelope membranes and characterized as a missing link in fatty acid export from the chloroplast. An ER-localization could be determined for the erFAX protein and an involvement in fatty acid import seems highly probable. By overexpressing FAX proteins in *Chlamydomonas*, higher TAG production could be achieved, which paves the way for a possible industrial application.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungen.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1. Einleitung.....	1
1.1 Fettsäuresynthese und Lipidstoffwechsel in Pflanzen.....	2
1.2 FAX-Proteine in Pflanzen.....	4
1.3 Transport von Fettsäuren und Lipiden zwischen Plastiden und ER.....	8
1.4 Unterschiede im Lipidmetabolismus von <i>Arabidopsis</i> und <i>Chlamydomonas</i> .....	10
1.5 Zielsetzung.....	12
2. Material & Methoden.....	13
2.1 Verbrauchsmaterialien.....	13
Chemikalien und Enzyme.....	13
Kits.....	15
Antibiotika und Selektionsmarker.....	15
Molekulargewichts- und Größenstandards.....	16
2.2 Oligonukleotide.....	16
2.3 Geräte.....	17
2.4 Saatgut, Anzucht und Phänotypisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
Samen und Anzuchtbedingungen.....	18
Phänotypisierung auf Erde.....	19
Phänotypisierung auf Agar-Platte.....	20
2.5 Stämme, Anzucht und Wachstumskurven von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	21
Algenstämme.....	21
Anzuchtbedingungen.....	21
Messung der Zelldichte und Wachstumskurven.....	21
Wachstumsassay von <i>Chlamydomonas</i> auf Agar-Platten.....	22
2.6 Standard molekularbiologische Methoden.....	22
DNA-Isolation aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
RNA-Isolation, reverse Transkription und quantitative <i>real-time</i> PCR.....	23
Agarose-Gelelektrophorese.....	24
DNA-Sequenzierung.....	24
2.7 Klonierungsmethoden.....	24

<i>Modular Cloning</i> .....	24
Klonierung von artifiziellen microRNA-Konstrukten.....	27
2.8    Anzucht und Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	28
Anzuchtbedingungen.....	28
Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	29
2.9    Transformation von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	29
2.10   Proteinisolation aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> und Fraktionierung von Membranen/Organeln .....	30
Extraktion von Proteinen aus der gesamten Zelle.....	30
Anreicherung von Membranproteinen.....	30
Ultraschall-Aufschluss und Fraktionierung durch differentielle Zentrifugation .....	31
2.11   Chloroplastenisolation aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	31
2.12   Ko-Immunopräzipitation (GFP- <i>pull down</i> -Assay) .....	33
2.13   Proteolyse von Vesikeln der inneren Hüllmembran von Erbsenchloroplasten.....	34
2.14   SDS-PAGE, Western Blot und Antiseren.....	34
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	34
Western Blot und Antiseren .....	35
2.15   Coomassie-Färbung von Proteinen und Vorbereitung zur Massenspektrometrie ...	37
2.16   Indirekte Immunofluoreszenz .....	38
2.17   Mikroskopie .....	39
Fluoreszenz-Mikroskopie.....	39
Laser-Scanning-Mikroskopie .....	39
2.18   Nilrot-Färbung .....	39
Etablierung der Nilrot-Färbung .....	39
Nilrot-Experiment.....	40
2.19   Sequenzanalysen.....	40
2.20   Datenbanken und Server.....	41
2.21   Statistische Auswertung .....	41
3.    Ergebnisse .....	42
3.1    Bestimmung der Topologie von FAX-Proteinen in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten.....	42
3.2    GFP- <i>pull down</i> -Assay zur Identifizierung von AtFAX1-Interaktionspartnern .....	46
3.3    Charakterisierung der ABCA9/FAX1-Überexpressionslinien in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	54
Phänotypisierung von Arabidopsis in der vegetativen Wachstumsphase auf Erde .....	57
Phänotypisierung des Keimlingswachstums sowie Samenkeimung von Arabidopsis auf Agar-Platten .....	60
3.4    Charakterisierung der FAX-Proteine in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	62
<i>In silico</i> Untersuchungen der CrFAX-Proteine .....	62

Subzelluläre Lokalisation von cFAX und erFAX.....	65
Überexpression und <i>knockdown</i> von FAX-Proteinen in Chlamydomonas.....	70
FAX-Proteine in Chlamydomonas unter Stickstoffmangel.....	75
Einfluss von Licht auf den Phänotyp der Chlamydomonas-Linien.....	79
4. Diskussion.....	80
4.1 Topologie und Interaktionspartner von FAX-Proteinen .....	80
FAX-Proteine unterscheiden sich in ihrer Membrantopologie sowie Orientierung in der Lipidmembran .....	80
Mögliche Interaktionspartner von AtFAX1 weisen unterschiedliche Charakteristika auf.....	86
4.2 Überexpression von <i>FAX1</i> und <i>ABCA9</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	95
Phänotypische Auswirkungen der Überexpression von <i>FAX1</i> und <i>ABCA9</i> .....	95
Führt die Überexpression von <i>ABCA9</i> und <i>FAX1</i> in <i>Arabidopsis</i> zu mehr TAG? .....	99
4.3 FAX-Proteine in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	100
Die FAX-Proteinfamilie in Chlamydomonas – Wir sind zu viert! .....	100
Die Proteine cFAX und erFAX können jeweils im Chloroplasten und ER lokalisiert werden .....	101
In Chlamydomonas sind FAX-Proteine am Lipidmetabolismus beteiligt.....	105
FAX- <i>knockdown</i> -Linien zeigen einen <i>green-in-the-dark</i> -Phänotyp .....	107
FAX-Proteine in Chlamydomonas – Ein Modell für den Transport von Fettsäuren.....	108
5. Fazit und Ausblick .....	110
6. Literatur .....	113
7. Anhang.....	X
Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang .....	xxx
Danksagung .....	xxxix
Eidesstattliche Versicherung .....	xxxiii

## Abkürzungen

ABC	ATP-binde Kasette
ACP	Acyl-Carrier-Protein
amiRNA	artifizielle microRNA
ATP	Adenosintriphosphat
BN-PAGE	<i>Blue Native</i> Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CoA	Coenzym A
Col-0	Columbia-0
DAG	Diacylglycerol
DDM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
DGAT	Diacylglycerol-Acyltransferase
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dox	<i>double overexpression</i>
ds	doppelsträngig
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAS	<i>fatty acid synthase</i>
FAT	<i>fatty acyl-acyl carrier protein thioesterase</i>
FAX	<i>fatty acid export</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
IE	<i>inner envelope</i>
IgG	Immunglobulin G
IMS	<i>intermembrane space</i>
kDa	Kilodalton
LACS	<i>long-chain acyl-CoA synthetase</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
MS	Murashige Skoog
OD	optische Dichte

OE	<i>outer envelope</i>
ox	<i>overexpression</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDAT	Phosphatidylcholine:Diacylglycerol-Acyltransferase
PG	Phosphatidylglycerol
PUFA	<i>poly unsaturated fatty acids</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAD	$\Delta 9$ -Stearoyl-ACP-Desaturase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sn	<i>stereospecific numbering</i>
TAG	Triacylglycerol
TAP	Tris-Acetat-Phosphat
T-DNA	Transfer-DNA
TGD	Trigalactosyldiacylglycerol
UVM4	<i>ultraviolet-mutant 4</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fettsäuretransport zwischen Chloroplast und ER. ....	10
Abbildung 2: Fotoaufnahmen sowie transformierte Bilddarstellung von <i>Arabidopsis thaliana</i> im zeitlichen Verlauf. ....	20
Abbildung 3: Modulare Darstellung der DNA-Konstrukte zur FAX-Überexpression und Lokalisation. ....	25
Abbildung 4: Proteolytischer Verdau von PsFAX-Proteinen. ....	43
Abbildung 5: Membrantopologie der FAX-Proteine. ....	45
Abbildung 6: Relativer Transkriptgehalt von <i>FAX1</i> in FAX1-GFP Linien. ....	46
Abbildung 7: GFP-Fluoreszenz von FAX1-GFP Pflanzen. ....	47
Abbildung 8: Immunoblots und Coomassie-Gel der Fraktionen eines GFP-pull downs mit FAX1-GFP. ....	48
Abbildung 9: Transkriptlevel von <i>AtFAX1</i> und <i>AtABCA9</i> . ....	56
Abbildung 10: Blattfläche und Rosettendurchmesser im zeitlichen Verlauf. ....	57
Abbildung 11: Anzahl an Tagen bis zur Infloreszenz von 1 cm und bis zu den ersten geöffneten Blüten. ....	58
Abbildung 12: Stieldurchmesser der verschiedenen Pflanzenlinien. ....	59
Abbildung 13: Gesamtzahl der Samen pro Pflanze sowie Samengewicht. ....	60
Abbildung 14: Keimlingsentwicklung der Arabidopsis-Linien auf Agar-Platten. ....	61
Abbildung 15: FAX1- und FAX5/6-Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	64
Abbildung 16: Nachweis und subzelluläre Lokalisation von cFAX und erFAX durch Western Blot-Analysen. ....	66
Abbildung 17: Immunofluoreszenz-Aufnahmen von cFAX. ....	68
Abbildung 18: Immunofluoreszenz-Aufnahmen von erFAX. ....	69
Abbildung 19: Überexpression von cFAX und erFAX in <i>Chlamydomonas</i> . ....	71
Abbildung 20: Proteinlevel von cFAX und erFAX in <i>Chlamydomonas</i> FAX-Überexpressionslinien. ....	72
Abbildung 21: cFAX- <i>knockdown</i> in <i>Chlamydomonas</i> . ....	73
Abbildung 22: erFAX- <i>knockdown</i> in <i>Chlamydomonas</i> . ....	74
Abbildung 23: Stickstoffmangelexperiment mit wildtypischen <i>Chlamydomonas</i> -Zellen. ....	76
Abbildung 24: Nilrot- und Chlorophyll-Fluoreszenz der FAX-Überexpressionslinien unter Stickstoffmangel. ....	77
Abbildung 25: Nilrot- und Chlorophyll-Fluoreszenz der FAX- <i>knockdown</i> -Linien. ....	78
Abbildung 26: „green-in-the-dark“-Phänotyp von erFAX- <i>knockdown</i> -Linien. ....	79
Abbildung 27: Schematische Darstellung der FAX-Proteine in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten. ....	83
Abbildung 28: Mögliche Interaktionspartner von FAX1. ....	95
Abbildung 29: Mitglieder der FAX-Proteinfamilie in <i>Arabidopsis</i> und <i>Chlamydomonas</i> . ....	100
Abbildung 30: Modell für den intrazellulären Transport von Fettsäuren in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> sowie deren Inkorporation in TAG. ....	109

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien. ....	13
Tabelle 2: Verwendete Enzyme. ....	15
Tabelle 3: Kits, die in dieser Arbeit verwendet wurden. ....	15
Tabelle 4: Selektionsmarker. ....	15
Tabelle 5: Oligonukleotide. ....	16
Tabelle 6: Verwendete Geräte. ....	17
Tabelle 7: Pflanzenlinien, die in dieser Studie verwendet wurden. ....	18
Tabelle 8: Primäre Antikörper, die in dieser Studie verwendet wurden. ....	36
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper, die in dieser Studie verwendet wurden. ....	36
Tabelle 10: Bereinigter Datensatz des FAX1-GFP- <i>pull downs</i> aus den Eluat. ....	51
Tabelle 11: Manuell bereinigter Datensatz mit Proteinen aus ausgeschnittenen Gel-Banden zweier unabhängiger FAX1-GFP- <i>pull down</i> -Assays. ....	52
Tabelle 12: Mögliche Interaktionspartner von FAX1. ....	54
Tabelle 13: FAX-Proteine in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	63

# 1. Einleitung

Pflanzenwissenschaften stellen im Zuge der ansteigenden Zahl der Weltbevölkerung sowie des Klimawandels ein wichtiges und aktuelles Forschungsfeld dar, um die Nahrungsmittelproduktion der Zukunft sicherstellen zu können (Lenaerts et al., 2019). Zusätzlich sind Pflanzen der Ursprung fossiler Brennstoffe und können in Zukunft als erneuerbare Energiequelle nutzbar gemacht werden (Mitra et al., 2021). Als wichtige Grundlage für das Erreichen der Ziele des von der Europäischen Union im Jahr 2019 beschlossenen europäischen Grünen Deals (<https://ec.europa.eu>) sind Pflanzenwissenschaftler gefragter denn je und können zur Gestaltung einer klimaneutralen und nachhaltigen Zukunft beitragen.

Im Rahmen dieser Studie wurden der Fettsäure- und Lipidmetabolismus von Pflanzen näher betrachtet. Pflanzenöle haben als bekannte Lipidklasse einen wichtigen Stellenwert in der menschlichen Ernährung und können zur Biotreibstoffgewinnung genutzt werden (Gaurav et al., 2017). Molekular betrachtet sind Öle Triacylglycerole (TAGs), das heißt sie bestehen aus einem Glycerol-Rückgrat, welches mit drei Fettsäuren (Acylgruppen) verbunden ist. Diese Öle können aus den Samen sogenannter Ölsamenpflanzen gewonnen werden, zu denen beispielsweise der Raps (*Brassica napus*) als Nutzpflanze gehört. Die Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*; im Folgenden auch *Arabidopsis* genannt) gehört, ebenso wie Raps, zur Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae) und wird in der molekularen Pflanzenbiologie als Modellorganismus genutzt, da *Arabidopsis* die Physiologie höherer Pflanzen gut widerspiegelt. Seit der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis* im Jahre 2000 (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) konnten viele genetische beziehungsweise molekulare Zusammenhänge aufgeschlüsselt und durch reverse Genetik gezielt die Funktion einzelner Gene untersucht werden. Durch die nahe Verwandtschaft zu Raps ist *Arabidopsis* gut geeignet, um den Lipidstoffwechsel in Pflanzen zu untersuchen und hervorgehende Erkenntnisse auf Nutzpflanzen, insbesondere Ölsamenpflanzen, zu übertragen. In dieser Studie wurden Fettsäureexport-Proteine der sogenannten FAX-Familie näher charakterisiert, die einen wichtigen Beitrag zur Ölbildung in Pflanzen leisten könnten. Um die Entstehung von Ölen in einem weniger komplexen Organismus zu untersuchen, werden auch die FAX-Proteine in der Modellgrünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (im Folgenden auch *Chlamydomonas* genannt) charakterisiert, sodass die Erkenntnisse aus der Landpflanze *Arabidopsis* ergänzt und aus dem Blickwinkel der Evolution betrachtet werden können. *Chlamydomonas* ist eine einzellige Süßwasseralge, deren Genom im Jahr 2007 sequenziert wurde (Merchant et al., 2007). Die gut verstandene Physiologie und die Möglichkeit zur genetischen Veränderung machen *Chlamydomonas* zu einem interessanten Modellorganismus. Ursprünglich wurde *Chlamydomonas* als Modell für Flagellen und

Photosynthese verwendet, da sowohl phototrophes als auch heterotrophes Wachstum mit Acetat als Kohlenstoffquelle möglich ist (Harris, 2009). Arabidopsis und Chlamydomonas decken als Vertreter der Streptophyta und Chlorophyta den Großteil des Pflanzenreichs ab, sodass deren paarweise Untersuchung ein wirksames Werkzeug darstellt, um grundlegende, wichtige Eigenschaften von Pflanzen zu erkennen und Spezialisierungen herauszustellen.

## 1.1 Fettsäuresynthese und Lipidstoffwechsel in Pflanzen

In Pflanzen findet die *de novo* Synthese von Fettsäuren im Stroma von Plastiden statt. Als Baustein der Fettsäuresynthese dient Acetyl-CoA, welches aus Pyruvat oder Acetat generiert werden kann (Johnston et al., 1997; Lin & Oliver, 2008). In einem ersten Schritt muss Acetyl-CoA mit Hydrogencarbonat unter ATP-Verbrauch zu Malonyl-CoA umgesetzt werden. Der Malonyl-Rest wird anschließend auf ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) übertragen. Die Fettsäuresynthese wird von der Fettsäuresynthase (FAS), einem Proteinkomplex mit mehreren Untereinheiten, durchgeführt, wobei Acetyl-CoA als Starteinheit fungiert (Brown et al., 2006). Malonyl-ACP liefert anschließend Zwei-Kohlenstoff (C2)-Einheiten, sodass eine C2-Kettenverlängerung unter einer Kondensationsreaktion stattfindet. Die Verlängerung der Acylgruppe findet bis zu einer Kettenlänge von 16 oder 18 Kohlenstoffeinheiten (C16 bzw. C18) statt. Zusätzlich kann C18-ACP von der  $\Delta 9$ -Stearoyl-ACP-Desaturase (SAD) zu C18:1 umgesetzt werden, wobei die Zahl hinter dem Doppelpunkt die Anzahl an Doppelbindungen angibt. Diese langkettigen Acylgruppen können nun von Acyl-ACP-Thioesterasen (FATs) hydrolysiert werden, um die entsprechenden Fettsäuren freizusetzen (zur Übersicht siehe Li-Beisson et al., 2013). In Arabidopsis werden ca. 38% dieser Fettsäuren im Plastiden zu Glycerolipiden assembliert (prokaryotischer Weg), wohingegen die restlichen 62% zum endoplasmatischen Retikulum (ER) exportiert werden (Browse et al., 1986). Im ER kann eine weitere Kettenverlängerung sowie Acyl-Editierung stattfinden und die Fettsäuren werden über den eukaryotischen Weg in Glycerolipide assembliert (zur Übersicht siehe Bates et al., 2007 und Li-Beisson et al., 2013).

Glycerolipide bestehen aus einem Glycerol-Rückgrat, welches durch seine drei Hydroxygruppen mit verschiedenen Resten kovalent verbunden ist. Die Position der jeweiligen Bindung am Glycerol wird mit *sn-1*, *sn-2* und *sn-3* (*sn*: *stereospecific numbering*) definiert. Membranlipide besitzen an *sn-3* eine hydrophile Kopfgruppe und an *sn-1* sowie *sn-2* eine Acylgruppe. Das Diacylglycerol (DAG)-Rückgrat der Lipide unterscheidet sich je nach Entstehung im prokaryotischen oder eukaryotischen Weg, da plastidäre *sn-2* Acyltransferasen eine hohe Präferenz für C16-Fettsäuren aufweisen, wohingegen ER-lokalisierte *sn-2* Acyltransferasen C18-Fettsäuren bevorzugen (Li-Beisson et al., 2013). Aufgrund dieser Unterscheidbarkeit konnte herausgefunden werden, dass in der Regel mehr als die Hälfte der exportierten Fettsäuren nach dem Einbau in eukaryotische Lipide im ER zurück in den

Plastiden transportiert werden, um dort in die Glycerolipidsynthese einzufließen (Browse et al., 1986). Verschiedene zelluläre Membransysteme bestehen aus unterschiedlichen Klassen von Glycerolipiden. In Chloroplasten bestehen das Thylakoidmembransystem sowie die innere Hüllmembran (*inner envelope*, IE) hauptsächlich aus vier Klassen von Glycerolipiden: den beiden Galactolipiden Mono- (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) sowie den beiden anionischen Lipiden Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) und Phosphatidylglycerol (PG). Die äußere Hüllmembran (*outer envelope*, OE) besitzt dagegen einen höheren Anteil an Phosphatidylcholin (PC) aus dem eukaryotischen Weg (Andersson & Dörmann, 2008). Extraplastidäre Membranen bestehen hauptsächlich aus den im ER synthetisierten Phospholipiden PC und Phosphatidylethanolamin (PE) (Übersicht in Li-Beisson et al., 2013).

In Samen von Samenpflanzen werden Fettsäuren in Form von TAG gespeichert. TAGs dienen als wichtige Kohlenstoff- und Energiequelle und werden in spezifischen Organellen, sogenannten Lipidtröpfchen oder Ölkörpern, gelagert. Die TAG-Synthese findet im ER statt (Huang, 1992). Dabei wird DAG, hauptsächlich aus dem eukaryotischen Weg, durch eine Diacylglycerol-Acyltransferase (DGAT) oder eine Phosphatidylcholin:Diacylglycerol-Acyltransferase (PDAT) zu TAG umgewandelt (siehe Xu & Shanklin, 2016). TAGs besitzen während der Pflanzenentwicklung verschiedene Funktionen. So werden TAGs ab Beginn der Quellung von Samen von Lipasen hydrolysiert (Eastmond, 2006) und stellen Kohlenstoffbausteine sowie Energie für die frühe Keimlingsentwicklung zur Verfügung (Pritchard et al., 2002). Der Abbau von Fettsäuren findet dabei in Peroxisomen durch  $\beta$ -Oxidation statt. Hierzu werden Fettsäuren aus TAG oder Membranlipiden mithilfe von ABCD1 (ABC-Transporter D1) und LACS6/7 (*long-chain acyl-CoA synthetase 6/7*) in die Peroxisomen transportiert und darin abgebaut (Penfield et al., 2006). Abseits von Samen spielen TAGs auch eine wichtige Rolle in der Blütenentwicklung. In Antheren können in Zellen des Tapetumgewebes vermehrt Lipidtröpfchen im Zytosol gefunden werden, die in diesem Gewebe auch als Tapetosomen bezeichnet werden (Wu et al., 1997; Übersicht in Ischebeck, 2016). Zur Bildung der Pollenzellwand werden die Tapetumzellen lysiert und komplexe lipophile Biopolymere wie Sporopollenin und Tryphin auf die Pollenoberfläche transferiert (zur Übersicht siehe Shi et al., 2015). Es wird vermutet, dass TAG hierbei eine akzessorische Rolle übernimmt (Hsieh & Huang, 2004). Eine wichtige Rolle nimmt TAG im Zytosol der Pollenkörner während der Pollenentwicklung ein (Übersicht in Ischebeck, 2016). Hier werden Energie und Kohlenstoffeinheiten für die Pollenkeimung sowie das Pollenschlauchwachstum zur Verfügung gestellt. So kann zum Beispiel die Arabidopsis-Doppelmutante *dgat1 pdat1* keine TAGs in Pollen bilden und ist steril (Zhang et al., 2009). Des Weiteren dient TAG im vegetativen Wachstumsstadium bei einem Überschuss an Lipiden zur Sequestrierung freier, toxischer Fettsäuren und verhindert somit Zellschädigungen (Fan et al., 2013).

Weitere Lipidverbindungen, deren Vorstufen aus Fettsäuren im ER gebildet werden, stellen Cutin und cuticuläre Wachse, die eine schützende Schicht auf dem Großteil pflanzlicher Oberflächen bilden, sowie Suberin dar. Cutin ist eines der Hauptbestandteile der Cuticula, in die Wachse ein- oder aufgelagert (epicuticuläre Wachse) sein können (zur Übersicht siehe Zeisler-Diehl et al., 2018 und Bhanot et al., 2021). Suberin wird im Gegensatz zu cuticulären Wachsen in der Zellwand bestimmter Gewebe, wie zum Beispiel dem Periderm oder der Wurzelendodermis, eingelagert und dient dort als Barriere für unkontrollierten Wasserverlust, Ionenaustausch oder das Eindringen von Mikroben (Ranathunge et al., 2011). Weitere wichtige Verbindungen, für deren Synthese Fettsäuren im ER von Tapetumzellen in den Antheren verwendet werden, sind Sporopollenin und Tryphin als Teil der Pollenzellwand, welche essenziell für die pflanzliche Reproduktion ist (Übersicht in Shi et al., 2015). Sporopollenin ist ein Biopolymer, welches hauptsächlich aus polyhydroxilierten aliphatischen Verbindungen und Phenolen besteht (Brooks & Shaw, 1968, Übersicht in Quilichin et al. 2015), wohingegen Tryphin hauptsächlich aus Alkanen, Ketonen und Alkenen aufgebaut ist (Jessen et al., 2011).

## 1.2 FAX-Proteine in Pflanzen

FAX1 (*fatty acid export 1*) wurde im Jahr 2015 als Fettsäureexport-Protein der inneren Chloroplasten-Hüllmembran von *Arabidopsis* charakterisiert (Li et al., 2015). Bis *dato* war kein Protein bekannt, das den Export von Fettsäuren aus dem Chloroplasten vermitteln konnte, sodass die Entdeckung von FAX1 einen wichtigen *missing link* in der pflanzlichen Lipidhomöostase darstellte. FAX1 ist wichtig für die Bildung von Biomasse, die männliche Fertilität und die Synthese von Verbindungen, die aus Fettsäuren aufgebaut werden, wie Lipide, Ketonwachse und Zellwandmaterial von Pollen. In *Arabidopsis fax1 knockout* Mutanten konnte eine verringerte Biomasse in der kompletten Pflanze festgestellt werden, wohingegen FAX1-Überexpressionslinien einen gegenteiligen Effekt aufwiesen. Der Anstieg des Frischgewichts in diesen Linien wurde hauptsächlich auf eine erhöhte Produktion von Zellen bzw. Zellschichten zurückgeführt. Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass die Stärke der Überexpression (2fach oder 200fach auf Transkriptebene) keinen linearen quantitativen Effekt auf den Phänotyp auszuüben scheint. Segregationsanalysen des *fax1* Allels haben gezeigt, dass *fax1 knockout* Mutanten männlich steril sind (Li et al., 2015). Dies ist auf eine Beeinträchtigung in der Übertragung des männlichen Gametophyten (Pollen) auf das Stigma sowie Defekte in den Antheren zurückzuführen. Aus Aufnahmen von Transmissionselektronenmikroskopie geht hervor, dass Pollen von *fax1* Mutanten keine äußere Pollenzellwand (Exine) aufweisen (Li et al., 2015; Zhu et al., 2020). Aufgrund der fehlenden Exine scheinen die Pollen in den Antheren zu verkleben, sodass eine Freisetzung mit anschließender Befruchtung nicht möglich ist. Die Exine besteht zum Großteil aus

Sporopollenin und Tryphin, beides Biopolymere, die teilweise aus Fettsäurederivaten aufgebaut sind und vom Tapetumgewebe der Antheren gebildet werden (Shi et al., 2015). In *fax1 knockout* Mutanten konnte ein atypischer Abbau des Tapetums durch programmierten Zelltod nachgewiesen werden, was mit einer verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einhergeht und durch diese begründet wird (Zhu et al., 2020). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass FAX1 als Regulator der ROS-Homöostase im programmierten Zelltod des Tapetums fungiert. Des Weiteren wurde erst kürzlich beschrieben, dass in heterozygoten *fax1* Mutanten die Pollenschlauchkeimung (*in vitro*) beeinträchtigt ist (Bugaeva et al., 2021). Auch die Wachszusammensetzung von Epidermiszellen des Pflanzenstängels ist in der *fax1 knockout* Mutante verändert. So lassen sich weniger als 50% C29-Keton-Wachse im Vergleich zum Wildtyp detektieren (Li et al., 2015). Um einen direkten Effekt von FAX1 in der Lipidhomöostase nachzuweisen, wurden freie Fettsäuren sowie Lipide in *FAX1*-Mutanten gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass in *fax1 knockout* Mutanten die Mehrheit der Fettsäuren und Lipiden aus dem prokaryotischen Weg erhöht und die aus dem eukaryotischen Weg reduziert sind. In zwei unabhängigen Überexpressionslinien konnte jeweils ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden. Insbesondere konnte eine Erhöhung des TAG-Gehalts in Blättern und Blüten der beiden *FAX1*-Überexpressionslinien, unabhängig von der Stärke der Überexpression (2fach bzw. 200fach auf Transkriptebene), nachgewiesen werden sowie eine Verminderung des TAG-Levels in *fax1 knockout* Linien (Li et al., 2015). Von Tian et al. (2018) wurde *FAX1* spezifisch in Arabidopsis-Samen überexprimiert, was den TAG-Gehalt um 21 bis 33% pro Samen erhöhen konnte. Alle beschriebenen Phänotypen der *FAX1*-Mutanten weisen darauf hin, dass FAX1 maßgeblich am Fettsäureexport aus den Plastiden beteiligt ist. Durch heterologe Expression von FAX1 in Hefen konnte außerdem direkt gezeigt werden, dass FAX1 in der Lage ist, den Transport von Fettsäuren zu vermitteln (Li et al., 2015). Da *fax1 knockout* Mutanten lebensfähig sind, müssen weitere Proteine existieren, welche die Funktion von FAX1 im Fettsäureexport aus Plastiden teilweise komplementieren können.

FAX1 gehört zur Familie der Tmemb\_14-Membranproteine (Pfam: PF03647). In Arabidopsis gibt es insgesamt sieben Mitglieder dieser Proteinfamilie, die als FAX1 bis FAX7 benannt wurden (Li et al., 2015). Die Lokalisation von FAX1 bis FAX4 konnte bereits in Chloroplasten bestimmt werden (Bugaeva et al., 2021; Li et al., 2015, 2020). FAX5 bis FAX7 werden in Membranen des ER/sekretorischen Wegs vorhergesagt und wurden dort von Könnel (2021) mit GFP-Konstrukten nachgewiesen. Des Weiteren konnte bereits für alle FAX-Proteine, bis auf FAX5 und FAX7, eine Beteiligung am Fettsäuretransport durch heterologe Expression in Hefe gezeigt werden (Bugaeva et al., 2021; Könnel, 2021; Li et al., 2015; Tian et al., 2019). Von Tian et al. (2019) wurde FAX2 in Arabidopsis charakterisiert. FAX2 ist ebenso wie FAX1 im Chloroplasten lokalisiert. Da hier punktuelle Signale um den Chloroplasten bei der

Expression von FAX2-GFP in Arabidopsis- und Tabak-Protoplasten detektiert werden konnten, wird vermutet, dass sich FAX2 in spezifischen Domänen anordnet, welche Membranproteinkomplexe und/oder Membrankontaktstellen zwischen IE und OE oder zu anderen Organellen darstellen könnten (Bugaeva et al., 2021; Tian et al., 2019). In einer anderen Studie konnte dagegen ein weitestgehend uniformes FAX2-GFP Signal um die Chloroplasten detektiert werden, bei der isolierte Protoplasten stabil transformierter Arabidopsis-Pflanzen zur Lokalisation genutzt wurden (Li et al., 2020). FAX2 aus Erbse (*Pisum sativum*) konnte zusätzlich in der IE von Erbsenchloroplasten mittels Immunoblot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Bugaeva et al., 2021). FAX2 zeigt eine hohe Expression in sich entwickelnden Samen und scheint in der TAG-Produktion durch Fettsäureexport aus den Plastiden in der Samenentwicklung beteiligt zu sein (Li et al., 2020; Tian et al., 2019). Bei der Untersuchung von *fax2* Mutanten gibt es Diskrepanzen zwischen den Studien von Tian et al. (2019) und Li et al. (2020). Bei der Untersuchung der T-DNA-Linie SALK\_135883 (Insertion der T-DNA im 5'UTR des *FAX2*-Gens) konnten Tian et al. über qRT-PCR einen unveränderten *FAX2*-Transkriptgehalt feststellen, weshalb in dieser Studie *fax2 knockout* Linien mithilfe von CRISPR/Cas9 generiert wurden. Li et al. nutzten dagegen die T-DNA Linie SALK\_135883 als *fax2 knockout* Mutante, da durch eine semi-quantitative RT-PCR kein *FAX2*-Transkript detektiert wurde. Aufgrund dieser Diskrepanzen sollten die Ergebnisse bezüglich der *fax2* Mutante von Li et al. (2020) mit Vorsicht betrachtet werden. Homozygote *fax2 knockout* Linien von Tian et al. wiesen in Samen einen 18% geringeren Lipidgehalt im Vergleich zum Wildtyp auf, wohingegen der Lipidgehalt pro Samen in *FAX2*-Überexpressionslinien um ca. 30% anstieg. Im Gegensatz zu *FAX1*-Mutanten konnten in den *FAX2*-Mutanten keine Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung festgestellt werden (Tian et al., 2019). In der Studie von Li et al. (2020) konnte ebenfalls eine Steigerung des Lipidgehalts um ca. 27% in einer *FAX2*-Überexpressionslinie detektiert werden. Zusätzlich zu *FAX2* wurde in der Studie von Li et al. (2020) auch *FAX4* untersucht sowie *fax2 fax4* Doppelmutanten. Da das *fax2* Allel der dort genutzten T-DNA Linie SALK\_135883 bezüglich des Transkriptlevels von *FAX2* uneindeutige Ergebnisse lieferte (siehe oben), wird hier nicht näher auf diese Doppelmutante eingegangen. *FAX4* ist ebenso wie *FAX2* erhöht in sich entwickelnden Samen exprimiert, sodass eine Funktion in der TAG-Synthese im Samen vermutet wurde. Zur Lokalisation von *FAX4* wurden Arabidopsis-Protoplasten mit *FAX4*-GFP transformiert und es konnten Signale um die Chloroplasten detektiert werden. In Samen von *fax4 knockout* Pflanzen konnte kein Unterschied im Lipidgehalt im Vergleich zum Wildtyp Col-0 festgestellt werden, allerdings befindet sich die T-DNA-Insertion der von Li et al. (2020) genutzten Linie ebenfalls im 5'UTR von *FAX4* und führt damit wahrscheinlich nicht zu einem *knockout* des Gens. Dennoch konnte durch <sup>14</sup>C-Fütterungsexperimente gezeigt werden, dass Samen von *fax4* Mutanten weniger beziehungsweise langsamer TAG synthetisieren konnten

als die Wildtypkontrolle. In einer *FAX4*-Überexpressionslinie konnte ein um 30% erhöhter Lipidgehalt pro Milligramm Samen gemessen werden (Li et al., 2020). *FAX3* wurde erst kürzlich in *Arabidopsis* charakterisiert und konnte im IE von Erbsenchloroplasten lokalisiert werden. Die *knockout* Mutante *fax3-1* zeigte keinen sichtbaren Phänotyp unter Standardbedingungen (Bugaeva et al., 2021). Da der Transkriptgehalt von *FAX3* in der *fax1* Mutante erhöht ist, wurde vermutet, dass *FAX3* eine komplementierende Rolle in der *fax1* Mutante einnimmt. In einer Segregationsanalyse von *fax1 fax3* Doppelmutanten konnte gezeigt werden, dass der *knockout* beider *FAX*-Gene zu einem keimlingslethalen Phänotyp führt (Bugaeva et al., 2021). Damit nimmt *FAX3* eine *Backup*-Funktion für *FAX1* im Keimlingswachstum ein.

Basierend auf den Studien zu den plastidären *FAX*-Proteinen lässt sich folgern, dass *FAX1* bis *FAX4* in der Lage sind, den Fettsäuretransport aus den Plastiden zu vermitteln und der TAG-Gehalt in Pflanzen durch Überexpression von *FAX1*, *FAX2* oder *FAX4* erhöht werden kann. Dennoch scheint unter den plastidären *FAX*-Proteinen nur der Verlust von *FAX1* zu einem endogen nicht komplementierbaren männlich sterilen Phänotyp zu führen, was auf eine besondere Rolle von *FAX1* hindeutet. *FAX5* bis *FAX7* wurden in *Arabidopsis* noch nicht hinreichend charakterisiert. Es gibt aber Hinweise darauf, dass eine *fax5 fax6* Doppelmutante einen männlich sterilen Phänotyp aufweist, vergleichbar mit dem der *fax1 knockout* Mutanten. Die Einzelmutanten *fax5* und *fax6* zeigen keinen Phänotyp (Könnel, 2021). *FAX5* und *FAX6* besitzen eine hohe Sequenzähnlichkeit, sodass sie sich in ihrer Funktion in den Einzelmutanten mit großer Wahrscheinlichkeit ersetzen können.

*FAX*-Proteine wurden auch kürzlich in Raps (*Brassica napus*) untersucht. So wurden bereits ein zu *Arabidopsis thaliana* *FAX1* (*AtFAX1*) orthologes (*BnaFAX1-1*; Xiao et al., 2021) und ein zu *AtFAX6* orthologes Protein (*BnFAX6*; Huang et al., 2021) charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *BnaFAX1-1* sowohl in *B. napus* als auch in *Arabidopsis* zu einer gesteigerten Menge an Lipiden führt (Xiao et al., 2021). Die Überexpression von *BnFAX6* führt zu einer gesteigerten Menge an TAG in Blättern und Samen. Zusätzlich dazu vermittelt die Überexpression von *BnFAX6* eine Aufhebung der Achselknospen-Dormanz, was zu einer verstärkten Verzweigung der Pflanze führt (Huang et al., 2021). In der Studie von Huang und Kollegen wurde *BnFAX6* in Plastiden von Schließzellen lokalisiert. Diese Lokalisationsbestimmung ist fragwürdig, da hierfür ein N-terminales GFP verwendet wurde, was ein Chloroplasten-Transitpeptid maskieren würde. Außerdem wurden keine Kontrollen gezeigt und die GFP-Signale zeigen ein für eine Chlorophyll-Hintergrund-Fluoreszenz typisches Muster. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu *AtFAX6* ist eher von einer Lokalisation im ER/sekretorischen Weg auszugehen.

Es wurde bereits versucht, FAX-Proteine in der Modellgrünalge *Chlamydomonas reinhardtii* zu charakterisieren. So konnten von Li et al. (2019) zwei FAX-Proteine identifiziert werden, die aufgrund konservierter Sequenzmotive zu AtFAX1 zugeordnet und als CrFAX1 (Cre10.g421750) und CrFAX2 (Cre08.g366000) bezeichnet wurden. Als Lokalisationsort wurde die Chloroplasten-Hüllmembran vermutet. Es wurden Linien untersucht, die eine vermeintliche Überexpression der entsprechenden FAX-Gene aufwiesen. Da diese „Überexpression“ auf Transkriptebene für *CrFAX1* nur ca. 1,5fach und für *CrFAX2* ca. 1,3fach im Vergleich zum Wildtyp betrug und auf Proteinebene nicht gemessen wurde, kann hier nicht von einer echten Überexpression gesprochen werden. Die aus den Experimenten hervorgegangenen Daten können somit nur als Tendenzen betrachtet werden. So konnten für beide Überexpressionslinien ein 11 bis 17% erhöhter Gehalt neutraler Lipide und ein beeinträchtigtes Wachstum unter Normalbedingungen sowie unter Stickstoffmangel im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Li et al., 2019). In der Rotalge *Cyanidioschizon merolae* wurde ebenfalls ein FAX-Protein untersucht. Das AtFAX1-verwandte Protein CmFAX1 (CMA070C) konnte in der Chloroplasten-Hüllmembran durch Immunofluoreszenzmikroskopie lokalisiert werden. Durch heterologe CmFAX1-Expression in Hefe konnte eine Funktion im Fettsäuretransport nachgewiesen werden. Eine Überexpression von CmFAX1 führte zu einer verringerten Menge an freien Fettsäuren und einer 2,4fachen Steigerung des TAG-Gehalts unter Normalbedingungen. In einer *cmfax1 knockout* Mutante wurde ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Das exponentielle Wachstum war zwischen den Linien vergleichbar. Unter Stickstoffmangelbedingungen wurde in der Überexpressionslinie ein 1,9facher TAG-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Ebenfalls konnten vermehrt Lipidtropfen in der CmFAX1-Überexpressionslinie nachgewiesen werden (Takemura et al., 2019).

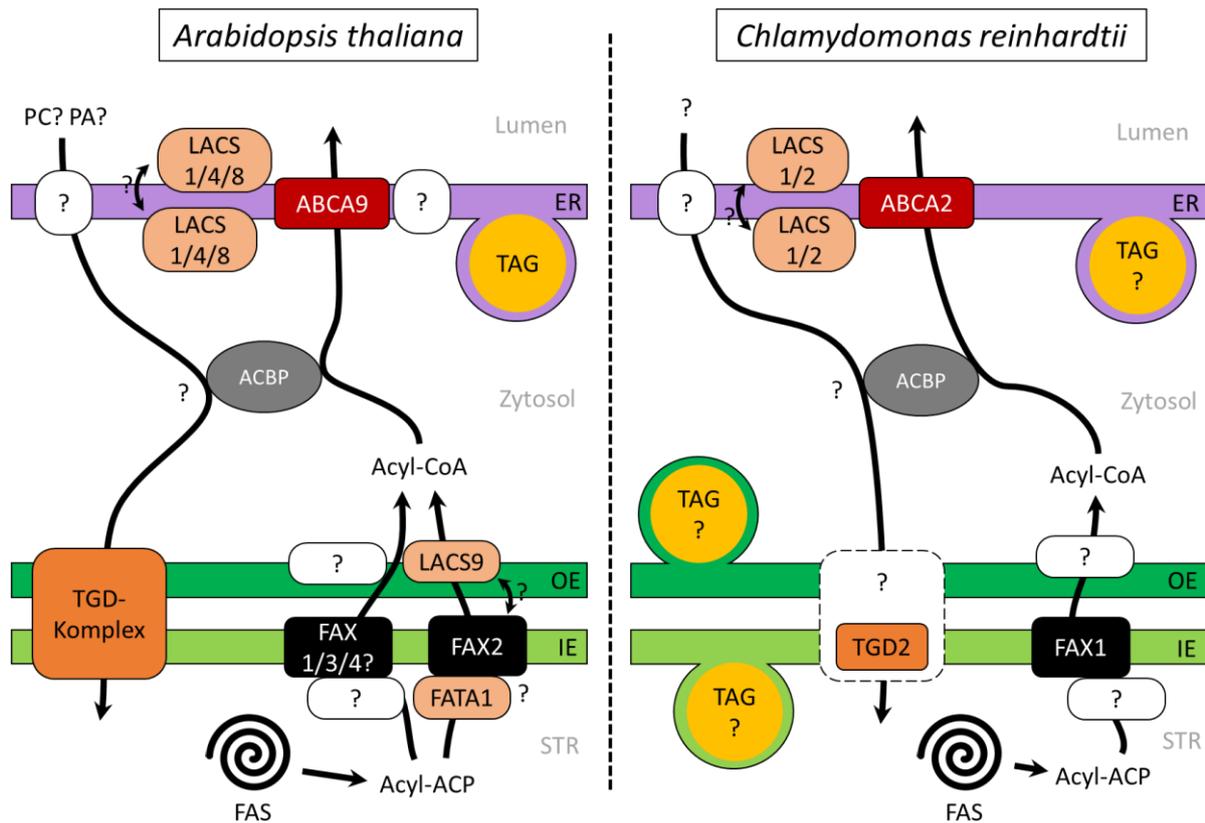
### 1.3 Transport von Fettsäuren und Lipiden zwischen Plastiden und ER

Am Transport von Fettsäuren und Lipiden zwischen Plastiden und ER (siehe Abbildung 1) sind mehrere Proteine beteiligt, von denen viele noch unbekannt sind oder deren Funktion/Lokalisation noch nicht abschließend geklärt ist. Der Export von Fettsäuren aus dem Plastiden kann durch FAX-Proteine vermittelt werden (siehe oben und zur Übersicht Li et al., 2016a und Li-Beisson et al., 2017). Dabei muss das im Stroma gebildete Acyl-ACP von Thioesterasen gespalten werden, um freie Fettsäuren für den Transport zur Verfügung zu stellen (Li-Beisson et al., 2013). Es wird vermutet, dass diese Fettsäuren durch einen Mechanismus namens vektorielle Acylierung mit Hilfe von LACS-Proteinen (*long-chain acyl-CoA synthetase*) die Hüllmembranen passieren und im Zytosol zu Coenzym A (CoA)-Ethern aktiviert werden. Als treibende Kraft wird hier die ATP-abhängige Aktivierung zu CoA sowie der Fettsäuregradient genannt, der durch die Bildung von Fettsäuren im Plastiden und der

Umwandlung von Fettsäuren in CoA-Estern aufrechterhalten wird (Li et al., 2016a; Li-Beisson et al., 2017). Von Tian et al. (2019) konnten über ein Split-Ubiquitin-Assay Hinweise gefunden werden, dass AtFAX2 mit der Thioesterase AtFATA1 sowie mit AtLACS9 interagiert und es wurde ein Modell erstellt, bei dem FAT-Proteine, FAX2 und LACS9 einen Komplex bilden (siehe Abbildung 1). Allerdings wurde in diesem Assay nicht Proteom-weit nach Interaktionspartnern gescreent und keine Proteine getestet, die nicht mit FAX2 interagieren, sodass die Ergebnisse nur als Hinweise interpretiert werden können. Für AtFAX1 konnten bisher keine Interaktionspartner identifiziert werden.

Der genaue Mechanismus, mit dem FAX-Proteine einen Fettsäuretransport vermitteln, ist bis heute ungeklärt. Es wird diskutiert, dass FAX-Proteine aufgrund einer asymmetrischen Insertion in die Lipiddoppelschicht durch amphiphile Helices an der Biegung von Membranen beteiligt sind und so Membrankontaktstellen herstellen können, über die der Fettsäuretransport vermittelt werden kann (Könnel, 2021). Des Weiteren besitzt FAX1 eine N-terminale, nicht-membranassoziierte  $\alpha$ -Helix, die aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit zu einem „*helical up-and-down bundle*“ des humanen Apolipoproteins apoE3 ebenfalls am Fettsäuretransport beteiligt sein könnte (Li et al., 2015, 2016a). Das Protein FAX2 besitzt basierend auf struktureller Modellierung drei weitere N-terminale  $\alpha$ -Helices, die ebenfalls ähnlich zum humanen Apolipoprotein ein „*helical up-and-down bundle*“ bilden und mit dieser Domäne im Fettsäure-/Lipidtransport fungieren und/oder einen Kontakt zwischen den Hüllmembranen des Chloroplasten oder sogar zu anderen Organellen herstellen könnten (Bugaeva et al., 2021).

Der Transport von Acyl-CoA zum ER ist bis *dato* unklar. Acyl-CoA-Bindeproteine (ACBPs) können im Zytosol als Shuttle für Acyl-CoA dienen (Du et al., 2016; Lai & Chye, 2021). Im ER wurden von Kim et al. (2013) der ABC-Transporter AtABCA9 charakterisiert, der die Aufnahme von Fettsäuren im Samen vermittelt. Auch LACS-Proteine scheinen am Import und Export von Fettsäuren/Lipiden im ER beteiligt zu sein (Li et al., 2016a). Im ER werden die Fettsäuren mit Glycerol verestert und ein Teil dieser Lipide wird zurück in den Plastiden transportiert. Dieser Transport wird in den Hüllmembranen der Plastiden durch den TGD (Trigalactosyldiacylglycerol)-Komplex vermittelt. Der TGD-Komplex besteht aus fünf Untereinheiten, von denen TGD1, TGD2 und TGD3 einen ABC-Transporter des prokaryotischen Typs im IE ausbilden (Roston et al., 2012). Das  $\beta$ -*Barrel*-Protein TGD4 ist im OE lokalisiert (Wang et al., 2012) und wird über TGD5 im Intermembranraum mit dem TGD1/2/3-Komplex im IE verbunden (Fan et al., 2015), um einen TGD-Superkomplex zu bilden (Übersicht in Michaud & Jouhet, 2019). Eine vereinfachte Übersichtsgrafik der aktuell bekannten Proteine, die in Arabidopsis und Chlamydomonas am Fettsäure- und Lipidtransfer zwischen Plastiden und ER beteiligt sind, ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Fettsäuretransport zwischen Chloroplast und ER.** Dargestellt sind bekannte Proteine, die am Fettsäuretransport beteiligt sind, sowie noch unbekannte Transporter oder Transportwege (Fragezeichen) in *Arabidopsis thaliana* und *Chlamydomonas reinhardtii*. Auffällig ist die unklare Lokalisation der TAG-Biosynthese in Chlamydomonas. Die Lokalisation von AtFAX4 im IE oder OE ist nicht geklärt sowie die Position von LACS1/4/8 am ER. In Chlamydomonas wurden LACS1 und LACS2 nur funktionell charakterisiert (Bai et al., 2021; Li et al., 2016b) und werden am ER vermutet. ABCA9 wird in Arabidopsis nur in Schoten stark exprimiert (Kim et al., 2013) und kann in Keimlingen und Rosettenblättern nicht nachgewiesen werden (diese Studie), sodass ein weiterer Fettsäuretransporter in der ER-Membran postuliert wird. Die Interaktion von FATA1, FAX2 und LACS9 wurde noch nicht unabhängig verifiziert (siehe Text). ABCA: ATP-binde Kasette Unterfamilie A, ACBP: Acyl-CoA-Bindeprotein, ACP: Acyl-Carrier-Protein, CoA: Coenzym A, ER: Endoplasmatisches Retikulum, FAS: *fatty acid synthase*, FAT: *fatty acid thioesterase*, FAX: *fatty acid export*, IE: *inner envelope of chloroplast*, LACS: *long-chain acyl-CoA synthetase*, OE: *outer envelope of chloroplast*, PA: *phosphatidic acid*, PC: Phosphatidylcholin, STR: Stroma, TGD: Trigalactosyldiacylglycerol, TAG: Triacylglycerol.

## 1.4 Unterschiede im Lipidmetabolismus von Arabidopsis und Chlamydomonas

In Chlamydomonas ist der Fettsäure- und Lipidmetabolismus nur wenig untersucht und basiert zum größten Teil auf der Annahme gleicher Funktionen orthologer Gene aus Samenpflanzen, insbesondere Arabidopsis (Li-Beisson et al., 2015; Li-Beisson et al., 2019). Dennoch konnten in den letzten Jahren einige wichtige Schlüsselproteine orthologer Gene von *AtFAX1* ( $\cong$  *CrFAX1*; Li et al., 2019), *AtABCA9* ( $\cong$  *CrABCA2*; Jang et al., 2020), *AtLACS1/4/5*

( $\cong$  *CrLACS1/2*; Bai et al., 2021; Li et al., 2016b) sowie ein Teil des TGD-Komplexes *AtTGD2* ( $\cong$  *CrTGD2*, Warakanont et al., 2015) annähernd charakterisiert werden (siehe Abbildung 1). Arabidopsis und Chlamydomonas unterscheiden sich in einigen Aspekten des Lipidmetabolismus, sodass dessen Untersuchung in Algen im Hinblick auf Nahrungsmittel- und Biodieselproduktion in Zukunft ein wichtiges Thema sein wird (Li-Beisson et al., 2019).

In der Fettsäurezusammensetzung unterscheidet sich Chlamydomonas von Arabidopsis durch das Vorhandensein von  $\Delta^4$ - und  $\Delta^5$ -ungesättigten mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs; *poly unsaturated fatty acids*). Diese werden durch *front-end* Desaturasen synthetisiert, die zum Beispiel im Chloroplasten zur PUFA C16:4 $\Delta^{4,7,10,13}$  als dominante Fettsäure in MGDG führt (Li-Beisson et al., 2015; Zäuner et al., 2012). Auch die Lipidzusammensetzung weist nennenswerte Unterschiede auf. In Chlamydomonas ist im Gegensatz zu Arabidopsis kein PC vorhanden. PC spielt neben seiner Rolle als Strukturlipid in Biomembranen in Arabidopsis eine zentrale Rolle bei der Bildung ungesättigter Fettsäuren, dem Acyl-Editing und dem Lipidaustausch (Li-Beisson et al., 2013). Dieses Phospholipid wird in Chlamydomonas durch das Betainlipid Diacylglyceryl-O-(N,N,N-trimethyl)-homoserine (DGTS) ersetzt (Eichenberger et al., 1977; Giroud et al., 1988), welches aufgrund struktureller und biophysikalischer Ähnlichkeit die gleichen Aufgaben wie PC erfüllen könnte (Liu & Benning, 2013). Eine weitere wichtige Abweichung von Chlamydomonas zu Arabidopsis ist die Unterscheidbarkeit von Lipiden aus dem prokaryotischen und dem eukaryotischen Weg. Eine entscheidende Entdeckung hierzu konnten Kim et al. (2018) machen, welche eine ER-lokalisierte Lysophosphatidat-Acyltransferase (LPAAT) mit Präferenz für C16-Fettsäuren charakterisierten, die zur Bildung von Phosphatidsäure mit C16 an *sn-2* Position führt. Aufgrund dieser Tatsache lassen sich Lipide aus dem prokaryotischen oder eukaryotischen Weg in Chlamydomonas nur schwer unterscheiden.

Zum Ort der Entstehung von TAG in Chlamydomonas gibt es Kontroversen in der Literatur. In Arabidopsis wird TAG hauptsächlich im ER gebildet (Li-Beisson et al., 2017), wohingegen in Chlamydomonas drei verschiedene Möglichkeiten zur Entstehung von TAG diskutiert werden. In Untersuchungen mit einer stärkefreien Mutante wurde ein plastidärer Ursprung von Lipidtröpfchen vermutet, hauptsächlich basierend auf der Tatsache, dass fast ausschließlich C16-Fettsäuren an *sn-2* Position in TAGs gefunden wurden (Fan et al., 2011). Aufgrund der Studie von Kim et al. (2018) zur ER-Lokalisation von LPAAT ist diese Begründung nicht mehr aussagekräftig. Dennoch konnten Lipidtröpfchen sowohl im Chloroplasten als auch im Zytosol per Elektronenmikroskopie lokalisiert werden (Fan et al., 2011). Im Plastiden könnten somit Lipidtröpfchen in der Hüllmembran entstehen und entweder im Zytosol oder Stroma lokalisiert sein. Die dritte Möglichkeit ist eine TAG-Synthese im ER, so wie es auch in Arabidopsis belegt ist (siehe Abbildung 1). Bis *dato* können keine eindeutigen Aussagen über den Ursprung der

TAG-Synthese in *Chlamydomonas* getroffen werden (Li-Beisson et al., 2021). Bei der Betrachtung von TAG muss erwähnt werden, dass in *Arabidopsis* die Ölakкумуляtion bestimmten Entwicklungsstadien oder Geweben zugeschrieben wird, wie zum Beispiel der Bildung von Samen oder der Pollenentwicklung (siehe Li-Beisson et al., 2013). In *Chlamydomonas* stellt die Akkumulation von Lipidtröpfchen eine Stressreaktion auf Umwelteinflüsse dar, bei der Stickstoffmangel als Hauptinitiator für die TAG-Synthese genutzt wird (Hu et al., 2008).

## 1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Membrantopologie und Orientierung von FAX1-, FAX2, und FAX3-Proteinen in der Lipidmembran aufgeklärt sowie Interaktionspartner von AtFAX1 identifiziert werden, um neue Erkenntnisse über den Fettsäure-Transportmechanismus der FAX-Proteine und mögliche Anhaltspunkte für weiterführende Studien zu erlangen. Als mögliche Interaktionspartner von FAX1 werden Thioesterasen, zur Freisetzung von Fettsäuren aus Acyl-ACP, sowie LACS-Proteine vermutet, die am Transport von Fettsäuren über vektorielle Acylierung beteiligt sein könnten. Erste Hinweise auf solch eine Interaktion konnten von Tian et al. (2019) für AtFAX2 bereits gezeigt werden. Des Weiteren sollten *Arabidopsis*-Linien untersucht werden, die sowohl *FAX1* als auch den ER-ständigen ABC-Transporter *ABCA9* überexprimieren, um deren Einfluss auf die Synthese von TAG zu untersuchen (siehe Abbildung 1). Da *Arabidopsis* ebenso wie Raps zur Pflanzenfamilie Brassicaceae gehört, könnten die Erkenntnisse zur Steigerung der Biodieselproduktion in Nutzpflanzen wie Raps beitragen.

In der Grünalge *Chlamydomonas* sind die FAX-Proteine bis *dato* nur unzureichend untersucht und der Exportweg von Fettsäuren aus dem Chloroplasten ist weitestgehend unbekannt. In dieser Studie sollten daher Mitglieder der CrFAX-Proteinfamilie vorgestellt sowie zwei FAX-Proteine näher charakterisiert werden, die jeweils den *Arabidopsis*-Proteinen FAX1 und FAX5 bzw. FAX6 entsprechen. Ein Ziel dieser Studie war es, einen *missing link* im Fettsäureexport aus Chloroplasten in *Chlamydomonas* aufzuklären sowie die Funktion des vermeintlich im ER und/oder sekretorischen Weg lokalisierten FAX-Proteins zu beleuchten. Durch Überexpression sowie einen *knockdown* der FAX-Proteine in *Chlamydomonas* sollte ebenfalls ein möglicher Einfluss auf die TAG-Bildung untersucht werden, was den Weg zu einer wichtigen industriellen Anwendung bezüglich der Ölproduktion in Algen ebnen könnte.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterialien

#### Chemikalien und Enzyme

Die in Tabelle 1 aufgeführten Chemikalien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.** Aufgelistet ist die entsprechende Chemikalie mit Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haën AG
10x RT Puffer	Promega
10x Standard Taq Reaction Puffer (Mg-free)	New England Biolabs GmbH
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Promega
5XHF Puffer (7,5 mM $\text{MgCl}_2$ )	Biozym Scientific GmbH
Aceton	Universität des Saarlandes
Acrylamid Xtra 30%	neoFroxx GmbH
Adenin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Agar-Agar (Kobe I)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agarose (LE)	Biozyme Scientific GmbH
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG
Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ampicillin Trihydrate	Tokyo Chemical Industry, Japan
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ATP	Lucigen
Bis-Tris buffer grade	AppliChem GmbH
Buffer 2.1	New England Biolabs
$\text{CaCl}_2$	VWR Prolabo Chemicals
Carbenicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG
cOmplete protease inhibitor cocktail (PIC)	Roche
Coomassie brilliant blue G-250	Carl Roth GmbH
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Universität des Saarlandes
CutSmart Puffer	New England Biolabs GmbH
D(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
DDM (n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside)	ChemCruz
Dimethylformamide	Universität des Saarlandes
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka
dNTP-Mix	Fisher Chemicals
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Carbolution finest chemicals
EDTA	Grüssing GmbH
EDTA- $\text{Na}_2$	Grüssing GmbH
Essigsäure	Universität des Saarlandes
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Acros organics
Glutardialdehyd	VWR Prolabo Chemicals
Glycerol	Grüssing GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
IPTG	Carbolution finest chemicals
Isopropanol	Fisher Chemicals

Isopropanol	Fisher Chemicals
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
KNO <sub>3</sub>	Sischrank (701106)
KOH	Carl Roth GmbH & Co. KG
L-Arginin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Luria-Bertani (LB)-Medium	Roth
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG
MES (2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	Fisher Chemicals
MgCl <sub>2</sub>	Grüssing GmbH
MgCl <sub>2</sub> -Lösung (25 mM)	New England Biolabs GmbH
MgSO <sub>4</sub>	Grüssing GmbH
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH & Co. KG
Musharige-Skoog Plant Salts	Serva
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Sigma
Na-Carbonate	Universität des Saarlandes
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
NaClO 12% (Natriumhypochlorid)	Carl Roth GmbH & Co. KG
NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid)	Promega
NH <sub>4</sub> Cl	AG Schroda
Nilrot	Carl Roth GmbH & Co. KG
plant agar	Duchefa
Rifampicin	Carl Roth GmbH & Co. KG
RNase freies H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Roti-Gel Stain Red	Carl Roth GmbH & Co. KG
SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG
Sorbitol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Spectinomycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Succinic anhydride	Tokyo Chemical Industry, Japan
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Thermolysin	Promega
Triton X-100	Serva
Trizma Base (TRIS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tryptone	Fluka Analytical
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactoside)	Carbolution finest chemicals
Yeast Extract	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	Roth/Sigma-Aldrich Chemie GmbH

In Tabelle 2 sind die verwendeten Enzyme aufgelistet.

**Tabelle 2: Verwendete Enzyme.** Aufgelistet ist das entsprechende Enzym mit Hersteller.

Enzym	Hersteller
BbsI-HF	New England Biolabs GmbH
BsaI-HFv2	New England Biolabs GmbH
Quick CIP	New England Biolabs GmbH
Reverse Transkriptase (RT)	Promega
SfiI	New England Biolabs GmbH
SpeI-HF	New England Biolabs GmbH
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH
T4 PNK	New England Biolabs GmbH
Taq-Polymerase	Universität des Saarlandes

### Kits

Die in Tabelle 3 aufgeführten Kits wurden in dieser Arbeit verwendet.

**Tabelle 3: Kits, die in dieser Arbeit verwendet wurden.** Aufgelistet ist das entsprechende Kit mit Hersteller.

Kit	Hersteller
mi-Gel Extraction	metabion international AG
mi-Plasmid Miniprep	metabion international AG
Mix2Seq	eurofins Genomics
NucleoSpin® DNA Gel und PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co KG
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel GmbH & Co KG
NucleoSpin® RNA Iso Plant	Macherey-Nagel GmbH & Co KG
NucleoSpin® RNA Iso Plant and Fungi	Macherey-Nagel GmbH & Co KG
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Quick Ligation	New England Biolabs GmbH

### Antibiotika und Selektionsmarker

In Tabelle 4 sind die verwendeten Antibiotika bzw. Selektionsmarker mit Endkonzentration im Medium aufgelistet. Die dafür verwendeten Organismen sind ebenfalls ergänzt.

**Tabelle 4: Selektionsmarker.** Aufgelistet sind der Selektionsmarker, die Endkonzentration im Medium und der verwendete Organismus.

Selektionsmarker	Konzentration im Medium [µg/mL]	Organismus
Ampicillin	100	<i>E. coli</i>
Carbenicillin	50	<i>E. coli</i>
Kanamycin	50	<i>E. coli</i>
Spectinomycin	100	<i>E. coli</i> , Chlamydomonas
L-Arginin	100	Chlamydomonas

## Molekulargewichts- und Größenstandards

Als Molekulargewichtsstandard wurde der Marker „ROTI®Mark TRICOLOR“ (Carl Roth GmbH & Co. KG) verwendet. Als Marker für DNA-Banden wurde „Easy Ladder I“ (Bioline) oder „1 kb DNA Ladder“ (New England Biolabs GmbH) verwendet.

## 2.2 Oligonukleotide

In Tabelle 5 sind die verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Oligonukleotide wurden von der metabion international AG (Planegg, Deutschland) hergestellt und in entsalzter Form geliefert, wenn nicht anders vermerkt.

**Tabelle 5: Oligonukleotide.** Aufgelistet sind der Name, die Nukleotid-Sequenz in 5' → 3'-Orientierung und der Verwendungszweck. In Türkis markiert ist die Zielsequenz der artifiziellen microRNA-Konstrukte.

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
At-ACT2/8_fw	GGTGATGGTGTGTCT	qRT-PCR
At-ACT2/8_rev	ACTGAGCACAATGTTAC	qRT-PCR
At-FAX1 LCfw	CCTATGATTCGTCCCCAG	qRT-PCR, Genotypisierung
At-FAX1 LCrev	CACTCACAACGAGACCA	qRT-PCR, Genotypisierung
ABCA9 LC.fw	GATCGAATAGGGATCATGGC	qRT-PCR
ABCA9 LC.rev	TGCGCTTTCTAGTTCAGCAC	qRT-PCR
LBa1 (SALK)	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	Genotypisierung
<i>ckx3-1_LP</i>	ACTTATGCAGGAAATGGAGGAG	Genotypisierung
<i>ckx3-1_RP</i>	TCAAAAGCCTCCCAATTGTC	Genotypisierung
35S fw	GATGTGATATCTCCACTGACGTAAGG	Genotypisierung
ABCA9_p0_rev	TCGCTCGCTTTGGAAGATTC	Genotypisierung
FAX1gen-#1	TTGAAGACAAAATGGCTGCTTCCCTGC	L0 Modul cFAX
FAX1gen-#2	TTGAAGACGGTCGCAATGATAGCAGACGCGGGCA	L0 Modul cFAX
FAX1gen-#3	TTGAAGACTTGCAGCCGACACTGATAATCAATGC	L0 Modul cFAX
FAX1gen-#4	TTGAAGACTCCGAACCCTCAGCCTTGCCGGCAGC CTTCTTCTTGG	L0 Modul cFAX
FAX2gen-#1	TTGAAGACAAAATGTATGACTTTTTGCTTTTCGCCC ATTTACTCGGTGTTCTCTGGCCC	L0 Modul erFAX
FAX2gen-#2	TTGAAGACGTTTTCTCGAACCGCCTGTACATC	L0 Modul erFAX
FAX2gen-#3	TTGAAGACGAGAAAACGCACTCGGTACCCGCGGC	L0 Modul erFAX
FAX2gen-#4	TTGAAGACGAAGTCCGCAACACGTCCACGCCAACC	L0 Modul erFAX
FAX2gen-#5	TTGAAGACGAGACTTCGTATGTTGCGCCAGTCATACA	L0 Modul erFAX
FAX2gen-#6	TTGAAGACTCCGAACCGTGAGCCTTACCGTGCGCG GCGGGCTTGGGG	L0 Modul erFAX
L0seq.fw	GCGCGTTGGCCGATTCATTAATC	Sequenzierung (L0 Modul)
L0 seq.rev	ACGAGGCCCTTTTCGTCCACTG	Sequenzierung (L0 Modul)
Level1seqForw	TAATGTACTGGGGTGGATGC	Sequenzierung (L1 Modul)
Level1seqRev	ATCCTGTCAAACACTGATAG	Sequenzierung (L1 Modul)
L2 seq fw	CTTAATAACACATTGCGGACG	Sequenzierung (L2 Modul)
L2 seq rev	AAACGGATCACTTCGTGTCC	Sequenzierung (L2 Modul)
cFAX-amiFor_mm	CTAGTGTGTTGCACGATTTCTCCATATCTCGCTGATC GGCACCATGGGGTGGTGGTGATCAGCGCTA <b>TATG CAGAAATCGTGCAACACG</b>	amiRNA
cFAX-amiRev_mm	CTAGCGTGTGTTGCACGATTTCTGCATATAGCGCTGAT CACCACCACCCCATGGTGCCGATCAGCGAGATAT GGAGAAATCGTGCAACACA	amiRNA

erFAX-amiFor_mm	CTAGTAAGTACAGGCGGTTTCGTGAAATCTCGCTGAT CGGCACCATGGGGTGGTGGTGATCAGCGCTA <b>TTTC</b> <b>TCGAACCGCCTGACTTG</b>	amiRNA
cFAX-amiRev_mm	CTAGCAAGTACAGGCGGTTTCGAGAAATAGCGCTGAT CACCACCACCCCATGGTGCCGATCAGCGAGATTTC ACGAACCGCCTGACTTA	amiRNA
amiRNAprec.for	GGTGTGGGTCGGTGTTTTGG	Kolonie-PCR, Sequenzierung
Spacer.rev	TAGCGCTGATCACCACCACC	Kolonie-PCR

## 2.3 Geräte

In Tabelle 6 sind Geräte aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 6: Verwendete Geräte.** Aufgelistet ist das Gerät mit Herstellerangabe.

Gerät	Hersteller
Autoklav DE-23	Systemec
Biofuge Pico	Heraeus
Brutschrank (INNOVENS)	Thermo Electron Corporation
Feinwaage Ioniser	VWR
FluorChemQ	Biozym Scientific GmbH
Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-9000E	Keyence
Forma Orbital Shaker	Thermo Electron Corporation
Heizblock	VWR
Heizblock Thriller	PEQLAB VWR Company
Imager FluorChemQ	Proteinsimple
Inforce Multitron	Inforce
Kühlzentrifuge (5417R)	Eppendorf
LightCycler	Roche
Multifuge 1 L-R	Heraeus
NanoDrop (infinite F200 Pro)	Tecan
Orbital Shaker-Incubator (ES-20)	BioSan
Orbitalschüttler	LAUDA-GFL
Orbitalschüttler KH 10/300	noctua
PCR Cycler PEQStar	PEQLAB VWR Company
PCR Cycler TGradient	Biometra
Percival CU 36L4	CLF Plant Climatics
Percival E41L2	CLF Plant Climatics
pH-Meter	HANNA instruments
pH-Meter	SI Analytics
Photometer (Novaspec)	LKB Biochrom
Photometer Specord 50 plus	AnalytikJena
Photometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences
Rollenschüttler RS-TR05	Phoenix Instrument
Schüttelinkubator TH15	Edmund Bühler Labortechnik
Schüttler (TH15)	Edmund Bühler
SDS-Gel Kammersystem	Amersham Biosciences
Semi-Dry-Blot-Apparatur	PEQLAB VWR Company
Spannungsgerät E452	Consort
Spannungsgerät EV2310	Consort
Spannungsgerät PS500X	Hoefer Scientific Instruments

Sterilbank	Heraeus instruments
Sterilbank LaminAir HB2448	Heraeus
Thermoblock Thermal Shake lite	VWR
Tischzentrifuge	Sigma
TissueLyser II	QIAGEN
Überkoprotator SB3	stuart
Ultraschall-Desintegrator (UP50H)	Hielscher
ULTRA-TURRAX T25 digital	IKA
Ultrazentrifuge Optima XPN-80	Beckmann Coulter
UV-Tisch	Vilber Lourmat
Vortex2	IKA
Vortexter (Vortex Genie 2)	Bender & Hobein AG
Waage BP 210 S	Sartorius
Waage BP 310 S	Sartorius
Waage TS 425i (42 g - 0.01 mg)	VWR
Zentrifuge Microfuge 20	Beckman Coulter
Zentrifuge Sorvall RC6 Plus	Thermo Electron Cooperation

## 2.4 Saatgut, Anzucht und Phänotypisierung von *Arabidopsis thaliana*

### Samen und Anzuchtbedingungen

Die Samen der in Tabelle 7 aufgeführten Pflanzenlinien wurden in dieser Studie verwendet.

**Tabelle 7: Pflanzenlinien, die in dieser Studie verwendet wurden.** Aufgelistet sind der Name der Pflanzenlinie, die Generation sowie die Verwendung. Ko-IP: Ko-Immunopräzipitation, ho: homozygot, dox: *double overexpression* (Doppelüberexpression), ox: *overexpression* (Überexpression).

Pflanzenlinie	Generation	Verwendung
FAX1-GFP in <i>fax1-2</i> ho #5	T4	qRT-PCR
FAX1-GFP in <i>fax1-2</i> ho #9	T4	qRT-PCR, Ko-IP
FAX1-GFP in <i>fax1-2</i> ho #12	T4	qRT-PCR, Ko-IP
FAX1-GFP in <i>fax1-2</i> ho #14	T4	qRT-PCR
Col-0 Lehle	-	qRT-PCR, Phänotypisierung
FAX1 ox #4.9	T6	qRT-PCR, Phänotypisierung
FAX1 ox #1.2	T2	qRT-PCR, Phänotypisierung
ABCA9 ox #10.3	T3	qRT-PCR, Phänotypisierung
ABCA9/FAX1 dox #3.1	T3	qRT-PCR, Phänotypisierung
ABCA9/FAX1 dox #3.2	T3	qRT-PCR, Phänotypisierung
<i>ckx3</i> ABCA9/FAX1 dox #2	F5	qRT-PCR, Phänotypisierung
<i>ckx3</i> ABCA9/FAX1 dox #3	F4	qRT-PCR, Phänotypisierung

*Arabidopsis*-Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 21 °C / 8 h Dunkelheit, 16 °C) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% in Klimaschränken (Percival Scientific) angezogen. Die Lichtintensität wurde auf 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photonen eingestellt. Zur Anzucht auf Erde wurden Plastiktöpfe mit einem 1:3 Gemisch aus Vermiculit und Erde (Potground H, Klasmann-Deilmann GmbH) befüllt und gegossen. Einzelne Samen wurden auf der Erde

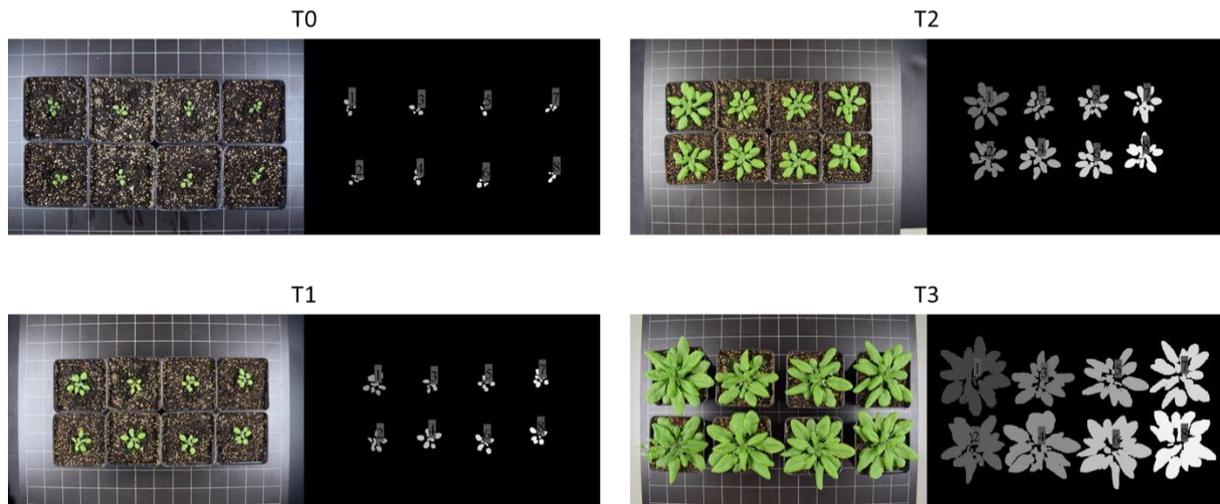
platziert und mit Frischhaltefolie bedeckt. Um einen Pflanzenrasen wachsen zu lassen, wurde ein Mikro-Löffel mit Samen befüllt, mit einer gleichen Menge an Sand vermischt und durch Ausstreuen auf Erde ausgebracht. Es folgte eine Stratifizierung der Samen bei 4 °C für ein bis drei Tage. Anschließend wurden die Töpfe mit den Samen in einen Klimaschrank gestellt und dort bis zur Schotenbildung der einzelnen Pflanzen angezogen. Ausgewachsene Pflanzen wurden bis zur Samenreife in einen Klimaraum mit Langtagbedingungen gestellt, der eine relative Luftfeuchte von 40% besaß.

Zur Anzucht auf Platte wurden 0,5 MS (Murashige-Skoog)-Agar-Platten angefertigt. Dazu wurde 0,5 MS-Nährmedium (2,15 % (w/v) MS *basalt salt mixture*, 0,5% (w/v) MES, 1% (w/v) Saccharose, pH 5,8 mit KOH eingestellt) angesetzt und mit 0,8% (w/v) Agar (Kobe I) versetzt. Das Medium wurde autoklaviert und danach die Platten gegossen. Vor der Anzucht der Pflanzen auf Agar-Platten wurden die Samen sterilisiert. Dazu wurde die entsprechende Menge an Samen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 1 mL 6% NaClO mit 0,1% Triton X-100 hinzugefügt und die Samen in einem Überkoprotator für 8 min inkubiert. Die Samen wurden kurz abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten drei Waschschrte mit je 1 mL sterilem Wasser, bei denen die Samen jeweils kurz aufgeschwemmt und wieder abzentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Samen in 50 µL 0,1% *plant agar* aufgenommen. Die aufgeschwemmten Samen wurden mit einer 1000 µL-Pipette aufgenommen und die Pipettenspitze anschließend vorsichtig abgenommen. Per Hand wurden die Samen durch die Pipettenspitze auf der Agar-Platte platziert.

### Phänotypisierung auf Erde

Zur Phänotypisierung von Arabidopsis auf Erde wurde eine Voraussaat der Samen in Pikierschalen vorgenommen. Nach zwei Wochen Wachstum wurden pro Linie je 17 Pflanzen in einzelne Töpfe pikiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden von 8 Pflanzen jeder Linie jede Woche Bilder im Zeitraum von vier Wochen mit einer Kamera aufgenommen und anschließend ausgewertet. Die restlichen 9 Pflanzen wurden für eine RNA-Isolation verwendet.

Die Blattfläche sowie der Durchmesser der Blattrosette wurden mit dem Programm *Rosette Tracker* von de Vylder et al. (2012) bestimmt. *Rosette Tracker* ist ein *open source* Bildanalyse-Tool, welches als ImageJ *plug-in* genutzt werden kann. Das Programm erkennt automatisch Blattrosetten, nachdem die Fotoaufnahmen in den HSV (*hue saturation value*)-Farbraum transformiert wurden (Abbildung 2). Anhand dieser Zuordnung können sowohl die Blattfläche als auch der Rosettendurchmesser einzelner Pflanzen bestimmt werden. Da eine falsche Zuordnung von Bildpixeln nicht ausgeschlossen werden kann, wurden alle Aufnahmen nachträglich überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert.



**Abbildung 2: Fotoaufnahmen sowie transformierte Bilddarstellung von *Arabidopsis thaliana* im zeitlichen Verlauf.** Zu sehen sind Aufnahmen von oben nach 2 (T0), 3 (T1), 4 (T2) und 5 Wochen (T3) Wachstum auf Erde. Zusätzlich zur fotografischen Aufnahme sind die durch das Programm *Rosette Tracker* (de Vylder et al., 2012) transformierten Bilder (*segmentation image*) mit Rosettenerkennung daneben dargestellt. Die Blattrosetten wurden automatisch erkannt und Nummern zugeordnet.

Zusätzlich zu den Bildern wurden täglich weitere Eigenschaften dokumentiert, wie der Zeitpunkt der entstehenden Infloreszenz (bei 1 cm), der Stieldurchmesser der Primär-Infloreszenz auf Höhe von 8 cm (bei einer Infloreszenz von 15 cm) sowie der Zeitpunkt der ersten offenen Blüten. Nach Beendigung der Phänotypisierung wurden Samen geerntet und deren Gesamtgewicht bestimmt. Ebenfalls wurden pro Pflanze dreimal je 50 Samen abgezählt, diese gewogen und der Mittelwert bestimmt. Das Gewicht pro Samen sowie die Gesamtzahl an Samen pro Pflanze konnten mit den gemessenen Werten somit rechnerisch bestimmt werden.

### Phänotypisierung auf Agar-Platte

Es wurden je 25 Samen pro Linie auf eine Agar-Platte ausgebracht und die Keimlingsentwicklung für zwei Wochen dokumentiert. Dabei wurden verschiedene Stadien der Keimlingsentwicklung festgelegt, um quantitative Aussagen treffen zu können. Es wurden fünf Kategorien definiert, um die verschiedenen *Arabidopsis*-Linien miteinander vergleichen zu können: keine Keimung, entstehende Wurzel, entstehender Spross mit geschlossenen Kotyledonen, offene Kotyledonen und erste Laubblätter.

## 2.5 Stämme, Anzucht und Wachstumskurven von *Chlamydomonas reinhardtii*

### Algenstämme

Für den Großteil der Experimente wurde der Algenstamm UVM4 (Neupert et al., 2009) verwendet. Für die Expression induzierbarer DNA-Konstrukte mit dem *NIT1*-Promotor (Fernandez et al., 1989; Loppes et al., 1999) wurde der Stamm cw15-325 (*cw<sub>d</sub> mt<sup>+</sup> arg7 nit1<sup>+</sup> nit2<sup>+</sup>*) verwendet. Dieser Stamm ist Arginin-auxotroph, weshalb dem Medium zusätzlich 100 µg/mL L-Arginin hinzugegeben wurde. Alle Stämme wurden von der AG Schroda, TU Kaiserslautern, zur Verfügung gestellt.

### Anzuchtbedingungen

Falls nicht anders erwähnt, wurden *Chlamydomonas*-Kulturen photoheterotroph in Tris-Acetat-Phosphat (TAP)-Medium (7,5 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0,34 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,13 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM Tris(tris(hydroxymethyl)aminomethane, 17 mM sodium acetate; Harris, 2009) inklusive „special K“ Spurenelementen (57,75 µM EDTA, 0,2 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0,1 µM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 2,5 µM ZnSO<sub>4</sub>, 6 µM MnCl<sub>2</sub>, 20 µM FeCl<sub>3</sub>, 22 µM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2 µM CuCl<sub>2</sub>; Kropat et al., 2011) angezogen. Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,0 eingestellt. *Chlamydomonas*-Zellen wurden auf TAP-Platten mit 1,5% Agar (w/v) bei Dauerlicht (30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) angezogen und aufbewahrt. Die Temperatur wurde auf 20 °C eingestellt. Eine Überimpfung der Zellen auf neue TAP-Platten erfolgte alle 1,5 bis 2 Monate. Zur Anzucht in Flüssigkultur wurden 100 mL Erlenmeyerkolben verwendet. Es wurden *Chlamydomonas*-Zellen mit einer Pipettenspitze von einer Agar-Platte entnommen und in 40 oder 50 mL TAP-Medium resuspendiert. Die Anzucht erfolgte auf einem Schüttelapparat (LAUDA-GFL) mit horizontaler Kreisbewegung (30 mm Amplitude) bei Dauerlicht (30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Die Temperatur wurde auf 20 °C eingestellt.

Zur Induktion des *NIT1*-Promotors (Fernandez et al., 1989; Loppes et al., 1999) wurde die Stickstoffquelle von Ammonium zu Nitrat im Medium gewechselt. Dazu wurde ein TAP-Medium angesetzt, bei dem 7,5 mM NH<sub>4</sub>Cl durch 7,5 mM KNO<sub>3</sub> ersetzt wurden. Die entsprechenden *Chlamydomonas*-Kulturen wurden abzentrifugiert, 2X in TAP-Medium mit KNO<sub>3</sub> gewaschen und anschließend darin resuspendiert.

### Messung der Zelldichte und Wachstumskurven

Die Zelldichte von *Chlamydomonas* wurde am Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm (OD750) bestimmt. Zur Erstellung von Wachstumskurven der verschiedenen *Chlamydomonas*-Linien wurden über mehrere Tage hinweg täglich Proben zur gleichen Uhrzeit entnommen und die OD750 am Photometer gemessen. Zu Beginn der Messung der Wachstumskurven wurden die Proben auf eine OD750 von 0,05 eingestellt.

Um vitale Chlamydomonas-Kulturen miteinander vergleichen zu können, wurden die Zellen zur Vorbereitung im Vorfeld des Experiments je zweimal auf eine OD750 von 0,3 verdünnt, um sie möglichst lange in der exponentiellen Wachstumsphase zu kultivieren. Die mittlere exponentielle Wachstumsphase für alle Kulturen lag zwischen einer OD750 von 0,3 und 0,5.

### **Wachstumsassay von Chlamydomonas auf Agar-Platten**

Chlamydomonas-Kulturen wurden bis zur späten exponentiellen Phase (OD750 von 0,55 bis 0,65) angezogen und auf eine OD750 von 0,5 in TAP-Medium verdünnt. Des Weiteren wurde eine 1:10- und eine 1:100-Verdünnung in TAP-Medium angefertigt. Anschließend wurden 50 µL Algensuspension der jeweiligen Verdünnung auf TAP-Platten (1,5% (w/v) Agar) mit einer Pipette aufgetropft und für ca. 45 min bei offenem Deckel trocknen gelassen. Die Platten wurden für zwei Wochen bei Dauerlicht ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) oder in Dunkelheit (umwickelt in Aluminiumfolie) bei 20 °C inkubiert. Das Wachstum wurde fotografisch dokumentiert.

## 2.6 Standard molekularbiologische Methoden

### **DNA-Isolation aus *Arabidopsis thaliana***

Zur Isolation von DNA aus *Arabidopsis* wurden von adulten Pflanzen ein Stück Blatt (fingernagelgroß) oder ein Keimling verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde mit 400 µL Extraktionspuffer (200 mM Tris pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 0,5% (w/v) SDS) in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß versetzt und mit Hilfe von Metallkügelchen (Tungsten Carbide Beads, 3 mm, Qiagen) in einem TissueLyser (Qiagen) bei einer Schüttelfrequenz von 30/s für 3 min homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat bei 13.000 rpm / RT / 10 min zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 300 µL Isopropanol (-20 °C) wurde die Probe für mindestens 5 min auf Eis inkubiert oder bei -20 °C gelagert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 13.000 rpm / RT / 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 300 µL 70% Ethanol (-20 °C) gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 13.000 rpm / RT / 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 37 °C getrocknet. Die isolierte DNA wurde in 50 µL Wasser aufgenommen und eingefroren.

### **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Pro PCR-Reaktion (25 µL Ansatz) wurden 2,5 µL 10X Standard Taq Reaktionspuffer (Mg-frei), 2,5 µL MgCl<sub>2</sub>-Lösung (25 mM), 0,5 µL dNTPs (10 mM), jeweils 0,5 µL der spezifischen Primer, 0,2 µL Taq-Polymerase und DNA-Template (1 bis 5 µL) eingesetzt. Das restliche Volumen wurde mit Wasser aufgefüllt. Als Matrize dienten sowohl genomische DNA, cDNA als auch Bakterienzellen (Kolonie-PCR). Wenn nicht anders angegeben, wurde das folgende Standard-PCR Programm genutzt:

Denaturierung	96 °C	3 min	35 Zyklen
Denaturierung	96 °C	45 s	
Anlagerung	50-60 °C	45 s	
Elongation	72 °C	60 s	
Elongation	72 °C	3 min	
Lagerung	4 °C	∞	

Je nach Primerkombination wurde die Temperatur der Primer-Anlagerung angepasst.

### RNA-Isolation, reverse Transkription und quantitative *real-time* PCR

Die Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte nach den Angaben des NucleoSpin® RNA Plant-Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co KG). Anschließend erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration (ng/µL) durch die Messung der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm am NanoDrop (Tecan). Zur cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA mit 0,4 µL oligo dT-Primer (100 µM), 0,5 µL dNTPs (10 mM) und 2 µL RT-Puffer in einem PCR-Reaktionsgefäß vermischt. Es wurde bis 10 µL mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde in einem PCR-Cycler bei 70 °C für 2 Minuten inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Es wurden 0,4 µL Reverse Transkriptase hinzugefügt und die Probe bei 42 °C für 90 Minuten inkubiert.

Die quantitative *real-time* PCR erfolgte im LightCycler (Roche). Zur semi-quantitativen Bestimmung von cDNA-Kopien in einer Probe wurden 2 µL einer 1:20 Verdünnung der cDNA mit 14 µL Primermix (reines Wasser mit je einer 1:140 Verdünnung der genspezifischen *forward* und *reverse* Primer (100 µM)) und 4 µL Enzymmix („FastStart DNA Master SYBR-Green Plus“ Kit von Roche) gemischt. 19 µL des Ansatzes wurden anschließend auf eine der zum LightCycler passenden Kapillare pipettiert und bei 2.000 rpm für 1 min in die Kapillare zentrifugiert. Die mit dem Reaktionsansatz beladenen Kapillaren wurden anschließend in ein Karussell geladen, in den LightCycler gestellt und das PCR-Programm mit 56 °C *Annealing*-Temperatur gestartet. Im Anschluss wurde das Produkt aus der Kapillare in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß zentrifugiert (2.000 rpm für 1 min) und 2 µL davon auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Zur relativen Quantifizierung wurden die genspezifischen Signale auf die Ausgangsmenge von *Aktin2/8* in der Probe normalisiert. Hierzu wurde zu jeder cDNA-Probe eine weitere Reaktion mit Aktin-spezifischen Primern durchgeführt. Der relative Gehalt einer bestimmten cDNA in einer Probe wurde anhand folgender Gleichung bestimmt:

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

Hier beschreibt „n“ die Anzahl an Zyklen, die benötigt wurden, um mit der Menge des jeweiligen Amplifikats den festgelegten Schwellenwert von 0,3 zu überschreiten.

## **Agarose-Gelelektrophorese**

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden Gele mit 1%, 1,5% und 2% (w/v) Agarose in 1XTAE-Puffer (2 M Tris-Acetat, 0,05 M EDTA, pH 8 – 8,5) verwendet und mit je 0,2 µL Roti® GelStain Red gefärbt. Die Elektrophorese wurde in 1XTAE-Puffer zwischen 80 V und 100 V für 30 min laufen gelassen. Anschließend erfolgte die Dokumentation am Bildgebungssystem FluorChemQ (Biozym).

## **DNA-Sequenzierung**

Zur DNA-Sequenzierung wurde das Mix2Seq Kit von Eurofins Genomics genutzt. Die Sequenzierung wurde extern durch die Eurofins NDSC Food Testing Germany GmbH in Hamburg durchgeführt.

## 2.7 Klonierungsmethoden

### ***Modular Cloning***

Die Konstrukte zur Generierung der Chlamydomonas-Linien wurden unter anderem mithilfe des *Modular Cloning* generiert (Crozet et al., 2018). Diese Methode basiert auf der sogenannten *Golden Gate*-Klonierung durch Typ IIS Restriktionsenzyme, die DNA außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden, und ist modular sowie hierarchisch aufgebaut. Es lassen sich mit wenig Aufwand diskrete funktionelle genetische Elemente assemblieren und untereinander austauschen. Die genetischen Elemente werden in Level 0-Module kloniert. Diese werden in Level 1-Modulen assembliert und in einen Level 2-Zielvektor umklont (Level 2-Modul). Die in Abbildung 3 dargestellten Konstrukte konnten im Rahmen dieser Arbeit kloniert werden. Alle Module, bis auf die Level 0-Module für cFAX und erFAX, sowie die Zielvektoren wurden von der AG Schroda, TU Kaiserslautern, zur Verfügung gestellt.

Zu Beginn mussten Restriktionsenzymchnittstellen (Bsal und BbsI) in der genomischen DNA-Sequenz der FAX-Gene entfernt werden, um sie erfolgreich mit *Modular Cloning* klonieren zu können. Dies wurde durch PCRs mit Oligonukleotiden (siehe Tabelle 5 FAX1gen-#1-4 für cFAX und FAX2gen-#1-6 für erFAX), die entsprechende Überhänge zur Klonierung über *Modular Cloning* aufweisen, erreicht. Aufgrund des hohen GC-Gehalts der Chlamydomonas-DNA-Sequenzen, wurde dem PCR-Ansatz 1 M Betain hinzugefügt. Genomische DNA wurde von der AG Schroda zur Verfügung gestellt. Es wurden die entsprechenden PCR-Banden aus einem Agarose-Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (NucleoSpin Plasmid Quick Pure Kit, Macherey-Nagel).



### mit Tags

cFAX-mVenus	1	AR					6	cFAX	8	mVenus + STOP	9	RPL23ter	11
mCerulean-erFAX	1	AR			5	mCerulean	6	erFAX	8	multiSTOP	9	RPL23ter	11
cFAX-3XHA ox	1	AR				6	cFAX	8	3XHA + STOP	9	RPL23ter	11	
erFAX-3XHA ox	1	AR				6	erFAX	8	3XHA + STOP	9	RPL23ter	11	

### ohne Tags

cFAX ox	1	AR				6	cFAX	8	multiSTOP	9	RPL23ter	11
cFAX ox	1	PSAD				6	cFAX	8	multiSTOP	9	RPL23ter	11
cFAX ox (ind.)	1	NIT1				6	cFAX	8	multiSTOP	9	RPL23ter	11
erFAX ox	1	AR				6	erFAX	8	multiSTOP	9	RPL23ter	11
erFAX ox	1	PSAD				6	erFAX	8	multiSTOP	9	RPL23ter	11

### Kontrollen

mVenus (ER)	1	AR			5	SP BIP2	6	mVenus	8	3XHA-KDEL	9	RPL23ter	11
mVenus (Chloro)	1	AR			5	cTP USPA	6	mVenus + STOP		9	RPL23ter	11	
mCerulean (Chloro)	1	AR			5	cTP USPA	6	mCerulean + STOP		9	RPL23ter	11	

**Abbildung 3: Modulare Darstellung der DNA-Konstrukte zur FAX-Überexpression und Lokalisation.** Gezeigt sind die verwendeten L0-Module nach Patron et al. (2015) und Crozet et al. (2018) sowie die daraus assemblierten L2-Module. Die Nummern definieren DNA-Überhänge nach der MoClo-Syntax (siehe Patron et al., 2015). Als mVenus wurde mVenus(i2) und als mCerulean wurde mCerulean3(i2) verwendet, welche das zweite Intron von RBCS in ihrer Sequenz integriert haben. AR: HSP70A-RBCS2-Hybridpromotor, CDS: coding sequence, cTP USPA: chloroplast transit peptide of universal stress protein A, HA: Hämagglutinin, HSP70A: heat shock protein 70A, ind.: induzierbar, NIT1: nitrate reductase 1, ox: overexpression, PSAD: Photosystem I reaction center subunit II, RBCS: Rubisco small subunit 2, RPL23ter: Terminator 50S ribosomal protein L23, SP BIP2: signal peptide binding immunoglobulin protein 2.

Mithilfe der DNA-Fragmente konnte das Level 0-Modul für cFAX und erFAX nach folgendem Ansatz generiert werden: 40 fmol Level 0-Zielvektor (pAGM1287), 40 fmol PCR-Produkt 1, 40 fmol PCR-Produkt 2, 40 fmol PCR-Produkt X, 2 µL 10XPuffer 2.1, 2 µL ATP (10 mM), 0,5 µL BbsI-HF, 0,5 µL T4 DNA-Ligase, auf 20 µL mit Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 h bei 37 °C, anschließend 5 min bei 50 °C und zum Schluss 10 min bei 80 °C inkubiert. Es folgte eine Transformation von *E. coli* TOP10. Die Selektion erfolgte durch 100 µg/mL Spectinomycin und 40 µg/mL X-Gal mit 0,5 mM IPTG. Nach einem Tag wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt und weiße Kolonien in Flüssigkultur mit 100 µg/mL Spectinomycin angezogen. Nach Plasmidisolierung und einem erfolgreichen Testverdau wurden entsprechende Plasmide durch Sequenzierung verifiziert.

Anschließend wurden die jeweiligen Level 1-Module nach folgendem Ansatz generiert: 40 fmol Level 1-Zielvektor (pICH47742), 40 fmol Level 0 #1, 40 fmol Level 0 #2, 40 fmol Level 0 #X, 2 µL 10XCutSmart-Puffer, 2 µL ATP (10 mM), 0,5 µL BsaI-HFv2, 0,5 µL T4 DNA-Ligase, auf 20 µL mit Wasser aufgefüllt. Hierbei stehen die Zahlen #1, #2, #X für die einzelnen genetischen Elemente zur Assemblierung des L1-Moduls. Mit zum Beispiel #1: *AR*-Promoter, #2: *cFAX* genomische Sequenz, #3: multiSTOP, #4 *RPL23*-Terminator für die Assemblierung des Konstruktes für die *cFAX*-Überexpression (*cFAX ox*; vgl. Abbildung 3). Der Ansatz wurde 5 h bei 37 °C, anschließend 5 min bei 50 °C und zum Schluss 10 min bei 80 °C inkubiert. Es folgte eine Transformation von *E. coli* TOP10. Die Selektion erfolgte durch 100 µg/mL Ampicillin und 40 µg/mL X-Gal mit 0,5 mM IPTG. Nach einem Tag wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt und weiße Kolonien in Flüssigkultur mit 100 µg/mL Ampicillin angezogen. Nach Plasmidisolierung und einem erfolgreichen Testverdau wurden entsprechende Plasmide durch Sequenzierung verifiziert.

Als Letztes erfolgte eine Umklonierung in den Level 2-Zielvektor. Dies wurde mit folgendem Reaktionsansatz erreicht: 40 fmol Level 2-Zielvektor (pAGM4673), 40 fmol Level 2 *end linker* (AG Schroda), 40 fmol Level 1-Modul, 40 fmol Spacer (AG Schroda), 2 µL 10XCutSmart-Puffer, 2 µL ATP (10 mM), 0,5 µL BbsI-HF, 0,5 µL T4 DNA-Ligase, auf 20 µL mit Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 h bei 37 °C, anschließend 5 min bei 50 °C und zum Schluss 10 min bei 80 °C inkubiert. Es folgte eine Transformation von *E. coli* TOP10. Die Selektion erfolgte durch 50 µg/mL Kanamycin. Nach einem Tag wurde eine Rot-Weiß-Selektion durchgeführt, da das Level 2-Modul ein Canthaxanthin-Operon (CRed) trägt, welches nach erfolgreicher Klonierung deletiert wird. Weiße Kolonien wurden in Flüssigkultur mit 50 µg/mL Kanamycin angezogen. Nach Plasmidisolierung und einem erfolgreichen Testverdau wurden entsprechende Plasmide durch Sequenzierung verifiziert. *Chlamydomonas*-Zellen wurden mit dem jeweiligen Level 2-Modul transformiert.

## Klonierung von artifiziellen microRNA-Konstrukten

Um *knockdown*-Linien für *cFAX* und *erFAX* zu generieren, wurde das Klonierungs-Protokoll nach Molnar et al. (2009) durchgeführt. Mit diesem Protokoll können artifizielle microRNA (amiRNA)-Konstrukte hergestellt werden, die einen *knockdown* spezifischer Gene bewirken können. Da diese Konstrukte stabile sekundäre Strukturen ausbilden können, ist ein spezifisches Protokoll zur Klonierung notwendig.

Zu Beginn wurden von Prof. Dr. Michael Schroda (TU Kaiserslautern, Lehrstuhl für Molekulare Biotechnologie und Systembiologie) über das Web-Tool WMD (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>) spezifische Oligonukleotide, basierend auf den entsprechenden Zielsequenzen für *cFAX* und *erFAX*, designt. Dabei liegen die Zielsequenzen der Oligonukleotide jeweils im 2. Exon von *cFAX* und *erFAX*. Die Oligonukleotide (je 90 Nukleotide; siehe Tabelle 5) wurden bei der metabion international AG (Planegg, Deutschland) mit HPLC-Aufreinigung bestellt. Zur Klonierung wurden die Plasmide pChlamiRNA2 (Molnar et al., 2009) und pMS539 (Schmollinger et al., 2010) verwendet. pChlamiRNA2 besitzt den konstitutiv starken Hybridpromotor *AR* (HSP70A-RBCS2; Schroda et al., 2000), wohingegen pMS539 den induzierbaren Promotor *NIT1* der Nitratreduktase 1 beinhaltet (Fernandez et al., 1989; Loppes et al., 1999).

In einem ersten Schritt wurden die Oligonukleotide (Oligos) angelagert. Dazu wurden der *forward* und der *reverse* Oligo in reinem Wasser zu einer Konzentration von 100 µM gelöst. 20 µL 2XAnnealingpuffer (20 mM Tris, pH 8,0, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl) wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß mit 10 µL des *forward* und 10 µL des *reverse* Oligos vermischt und in einen PCR-Cycler gestellt. Es wurde folgendes Programm gestartet, um eine Anlagerung der beiden Oligos zu ermöglichen:

95 °C	30 min
Änderungsrate:	0,1 °C/s
Temperaturabfall:	-2 °C
Lagerung:	8 °C

Es wurde ein langsamer Temperaturabfall eingestellt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Die angelagerten Oligonukleotide wurden anschließend mit einem PCR clean up-Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt und mit 40 µL Wasser eluiert. Die Elution wurde mit dem Durchfluss wiederholt. In einem zweiten Schritt folgte die Phosphorylierung des doppelsträngigen (ds) DNA-Oligos. Dazu wurde folgende Reaktion angesetzt: 2 µL dsDNA Oligo (entspricht ~0,7 µg/µL), 1 µL 10XT4 DNA-Ligase Puffer, 1 µL T4 Polynukleotid Kinase

(PNK; 10 u/μL), 6 μL reines Wasser. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde die PNK für 20 min bei 65 °C inaktiviert.

Als dritter Schritt folgte die Klonierung des amiRNA-Konstrukts. Dabei wurde der entsprechende amiRNA-Vektor mit folgendem Reaktionsansatz verdaut: 10 μL amiRNA-Vektor (~2 μg), 3 μL 10XCutSmart-Puffer, 1 μL SpeI-HF (10 u/μL), 16 μL Wasser. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Der Vektor wurde dephosphoryliert, indem 2 μL Quick CIP (Alkalische Phosphatase; 5 u/μL) hinzugegeben und der Ansatz für 20 min bei 37 °C inkubiert wurde. Eine Hitzeinaktivierung folgte für 20 min bei 80 °C. Die Ligation des dsDNA-Oligos erfolgte mit Hilfe des Quick Ligation Kits (New England Biolabs GmbH). Es wurden zwei Reaktionen angesetzt: 1 μL verdauter und dephosphorylierter amiRNA-Vektor, 1 μL 10X **oder** 100X verdünnter phosphorylierter dsDNA-Oligo, 2,5 μL Nuklease-freies Wasser, 5 μL 2XQuick Ligase Reaktionspuffer, 0,5 μL Quick Ligase.

Der Ansatz wurde durch Pipettieren gemischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Es wurden 50 μL kompetente *E. coli*-Zellen (TOP10) mit 2,5 μL des Ligationsansatzes transformiert und auf LB-Platten mit 100 μg/mL Ampicillin ausplattiert. Nach einem Tag Wachstum bei 37 °C wurden sichtbare Kolonien gepickt und eine Kolonie-PCR mit zusätzlich 3% DMSO durchgeführt. Positive Klone, bei denen das amiRNA-Konstrukt in der richtigen Orientierung inseriert wurde, sollten zur Amplifikation eines DNA-Fragment von 182 bp führen. Folgendes PCR-Programm wurde gewählt:

95 °C	2 min	35 Zyklen
95 °C	30 s	
65 °C	30 s	
72 °C	30 s	

Klone, die auf einem Agarosegel eine Bande bei 182 bp zeigten, wurden auf eine neue Platte transferiert. Pro Vektor-Konstrukt wurden zwei Klone ausgewählt, in Flüssigkultur angezogen und eine Plasmid-Isolation durchgeführt. Eine darauffolgende PCR (mit 0% und 5% DMSO) bestätigte die erfolgreiche Insertion der Zielsequenz. Die PCR wurde sequenziert und das Insert verifiziert.

## 2.8 Anzucht und Transformation von *Escherichia coli*

### Anzuchtbedingungen

*E. coli*-Zellen wurden bei 37 °C und 180 rpm in LB-Medium (1% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl) kultiviert. Bei der Kultur auf LB-Agar-Platten wurden 1,5% (w/v)

Agar zugesetzt. Je nach Resistenzgenen der zur Transformation verwendeten Vektoren enthielt das Medium zusätzlich Antibiotika (siehe Tabelle 4).

### **Transformation von *Escherichia coli***

Es wurden 50  $\mu\text{L}$  kompetente TOP10 *E. coli*-Zellen (gelagert bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) auf Eis antauen gelassen und anschließend 10 bis 100 ng DNA (in 10  $\mu\text{L}$ ) hinzugegeben. Die Zellen wurden auf Eis für 30 min inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 90 s mit anschließender Inkubation auf Eis für 5 min. LB-Medium wurde auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt und 400  $\mu\text{L}$  dem Transformationsansatz hinzugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 700 rpm (Schüttelblock) inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Platten (1,5% (w/v) Agar) mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

## **2.9 Transformation von *Chlamydomonas reinhardtii***

Zur Transformation mit DNA-Konstrukten, die einen *NIT1*-Promotor tragen, wurde der Algenstamm cw15-325 verwendet. Der Stamm UVM4 wurde für alle weiteren DNA-Konstrukte verwendet.

Für jede Transformation und nicht-transformierte Kontrolle wurde ein steriles 2 mL Reaktionsgefäß mit Glaskügelchen (425-600  $\mu\text{m}$ ; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) bis 3-4 mm Höhe aufgefüllt. *Chlamydomonas*-Zellen wurden nach Bestimmung der spezifischen Wachstumskurve der jeweiligen Stämme bis zu einer OD<sub>750</sub> von 0,5 bis 0,65 (späte exponentielle Wachstumsphase) angezogen. Die Zellen wurden in 1 mL Medium 10 bis 20fach konzentriert, indem das dafür berechnete Volumen der Algensuspension für 1.500 g / RT / 2 min zentrifugiert wurde. Pro Transformation wurden  $\sim 330\text{ }\mu\text{L}$  konzentrierte Algensuspension in das 2 mL Reaktionsgefäß mit Glaskügelchen überführt. Anschließend wurden mit einer Pipette 10  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) an die innere obere Wand des Reaktionsgefäßes in kleinen Tropfen pipettiert, um ein frühzeitiges Durchmischen mit der Algensuspension zu verhindern. Die Zellen wurden anschließend auf einem Vortexer (max. Geschwindigkeit) für exakt 15 s mit der DNA gemischt. Die Zellen wurden mit einer Pipette aufgenommen, indem die Pipettenspitze auf dem Boden des Reaktionsgefäßes platziert wurde, um die Aufnahme von Glaskügelchen zu vermeiden. Anhaftende Glaskügelchen wurden beim Herausziehen der Pipettenspitze am Rand des Reaktionsgefäßes abgestreift. Die transformierten Zellen wurden auf TAP-Platten (1,5% (w/v) Agar) mit entsprechendem Selektionsreagenz ausplattiert und trocknen gelassen. Anschließend wurden die Platten bei Dauerlicht (30  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ) inkubiert. Erste Kolonien waren nach ca. 2 Wochen sichtbar.

## 2.10 Proteinisolation aus *Chlamydomonas reinhardtii* und Fraktionierung von Membranen/Organelen

### Extraktion von Proteinen aus der gesamten Zelle

Es wurden 5-10 mL *Chlamydomonas*-Zellen mit einer OD750 von 0,3 bis 0,5 in 50 mL Falcon-Gefäßen bei 1.500 g / 4 °C / 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Gefäße auf Eis gestellt. Die Zellen wurden im restlichen Medium resuspendiert und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 1.500 g / 4 °C / 3 min wurde der Überstand gründlich mit einer Pipette entfernt. Je nach vorhandenem Pellet wurden x-mal 60 µL DTT-Carbonat (0,1 M DTT, 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) hinzugegeben und die Zellen durch vortexen vollständig resuspendiert. Das hinzugegebene Volumen sollte dabei ungefähr dem zweifachen Volumen des Pellets entsprechen. Die Probe wurde bei -20 °C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert. Nach dem Auftauen der Probe wurde x-mal 55 µL SDS-Sucrose-Puffer (5% (w/v) SDS, 30% (w/v) Saccharose) hinzugegeben und gut gevortext. Danach wurde die Probe für 2 min bei 99 °C inkubiert, für 2 min auf Eis gelagert und bei 13.000 rpm / RT / 2 min (Biofuge Pico, Heraeus) zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die extrahierten Proteine.

Anschließend wurde die Chlorophyll-Konzentration bestimmt. Dazu wurden 10 µL Überstand in 1 mL 80% Aceton überführt. Die Probe wurde gevortext und 5 min auf Eis gelagert. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 rpm / RT / 5 min (Biofuge Pico, Heraeus) wurde die Absorption der Proben bei 645 nm und 663 nm gemessen. Die Chlorophyll-Konzentration in µg/µL wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Chlorophyll } [\mu\text{g}/\mu\text{L}] = [(A_{645} \times 17.76) + (A_{663} \times 7.34)] / 10$$

Für einen Immunoblot wurden, wenn nicht anders angegeben, Proteine entsprechend 2 µg Chlorophyll verwendet.

### Anreicherung von Membranproteinen

Dieses Protokoll wurde an der TU Kaiserslautern am Lehrstuhl von Prof. Dr. Michael Schroda durchgeführt und diente zur Anreicherung von Membranproteinen für eine anschließende Immunoblotanalyse. Es wurden 25 mL Zellen mit einer Dichte von  $\sim 5 \cdot 10^6$  Zellen/mL bei 4.000 rpm / 4 °C / 5 min (Eppendorf 5810 R) in 50 mL Gefäßen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL Lysis-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,25XcOmplete Protease Inhibitor Cocktail) resuspendiert. 200 µL wurden entnommen, mit 50 µL 5XSDS-Puffer (225 mM Tris-HCl pH 6,8, 50% Glycerol, 5% (w/v) SDS, 0,25 M DTT, 0,05% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 1 min bei 95 °C inkubiert (Komplettzellproteine,

*whole cell proteins*, wc). Weitere 10 µL wurden für die Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration verwendet (siehe oben). Die restlichen Zellen wurden mit vier Gefrier / Auftau-Zyklen (Flüssigstickstoff / RT) aufgeschlossen und bei 13.200 rpm / 4 °C / 30 min zentrifugiert. 800 µL Überstand (Ü) wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µL 5XSDS-Puffer versetzt und 1 min bei 95 °C inkubiert. Das Pellet (Membranproteine, mp) wurde in 800 µL Lysis-Puffer resuspendiert, mit 200 µL 5XSDS-Puffer versetzt und ebenfalls 1 min bei 95 °C inkubiert. Die Proteinmenge der jeweiligen Fraktionen wurde in einem Bradford-Assay bestimmt. Zur Immunoblotanalyse wurden je 10 µg Protein auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel geladen.

### **Ultraschall-Aufschluss und Fraktionierung durch differentielle Zentrifugation**

Zur Fraktionierung einzelner Zellbestandteile von *Chlamydomonas*, wurde sich an das Protokoll von Jang et al. (2020) angelehnt. *Chlamydomonas*-Zellen (UVM4) wurden bis zu einer OD750 von 0,55 angezogen. 100 mL wurden in einem 50 mL Falcon-Gefäß bei 1.500 g / 4 °C / 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 40 mL Fraktionierungspuffer (250 mM Sorbitol, 50 mM Tris-acetate pH 7,5, 1 mM EGTA-Tris pH 7,5, 2 mM DTT, 1XcOmplete Protease Inhibitor Cocktail) resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Glasbehälter mit einem magnetischen Rührstäbchen überführt, welches in einem größeren Behälter mit Eis gelagert wurde. Der komplette Aufbau wurde auf einen Magnetrührer gestellt und ein Ultraschall-Desintegrator (UP50H, Hielscher) nach Herstellerangaben in Position gebracht. Um die Zellen aufzuschließen, wurde ein Zyklus von 0,4 mit einer Intensität von 20% am Ultraschallgerät eingestellt und die Zellen unter Rühren auf Eis mit Ultraschall behandelt. Nach 7 min wurde eine Probe der behandelten Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. Nur wenige intakte Zellen waren sichtbar, weshalb 20 mL des Probenansatzes für die differentielle Zentrifugation verwendet wurden.

Es wurde seriell mit 500 g / 10 min (Zellkerne, N), 3.000 g / 10 min (Chloroplasten, C), 20.000 g / 30 min (Mitochondrien, M) und 100.000 g / 4 h (mikrosomale Fraktion, mf) bei je 4 °C zentrifugiert (Ultrazentrifuge Optima XPN-80, Beckman Coulter). Die einzelnen Fraktionen (Pellets) wurden in 500 µL Fraktionierungspuffer aufgenommen. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte über einen BCA-Assay. Zur weiteren Verwendung wurden die Proben mit 5XSolubilisierungspuffer-M (SB-M; 0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 10% (w/v) SDS, 50% Glycerin, 0,5 M DTT, etwas Bromphenolblau) versetzt, für 3 min bei 95 °C inkubiert und bei 13.000 rpm / RT / 5 min zentrifugiert.

## **2.11 Chloroplastenisolation aus *Arabidopsis thaliana***

Intakte Chloroplasten wurden nach Aronsson & Jarvis (2002) isoliert. Samen von Pflanzen, die FAX1-GFP exprimieren, wurden auf Erde ausgesät, sodass ein Pflanzenrasen wachsen

konnte. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für ca. drei Wochen bei Langtagbedingungen, bis die ersten und zweiten Laubblätter ausgebildet waren. Es wurden pro Chloroplastenisolation ca. 2 bis 3 Töpfe mit Pflanzen verwendet.

Zur Isolierung der Chloroplasten wurden die oberirdischen Pflanzenteile mit einer Schere abgetrennt und in ein 100 mL Becherglas bis zur 50 mL Marke gefüllt. 25 mL Isolationspuffer (300 mM Sorbit, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 20 mM Hepes, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 50 mM Ascorbat, pH 8,0 mit KOH eingestellt) wurden hinzugegeben und das Blattmaterial mit einem Polytron-Mixer (ULTRA-TURRAX T25 digital, IKA) auf niedrigster Stufe für 2 s aufgeschlossen. Die Suspension wurde durch eine Gaze (10 µm Porendurchmesser) in einen Erlenmeyerkolben filtriert. Das Pflanzenmaterial wurde zurück in das Glasgefäß überführt und erneut, wie oben beschrieben, mit Isolationspuffer versetzt und aufgeschlossen. Der Vorgang wurde insgesamt viermal durchgeführt. Das Filtrat wurde darauffolgend auf vier Zentrifugenbecher verteilt und in einem Ausschwingrotor bei 1.000 g / 4 °C / 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 1 mL HMS-Puffer (50 mM Hepes, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 300 mM Sorbit, 50 mM Ascorbat, pH 8,0 mit KOH eingestellt) durch Pipettieren mit abgeschnittener Spitze resuspendiert. Es wurde ein Percoll-Stufengradient mit Percoll-Lösung (3% (w/v) PEG6000, 1% (w/v) Ficoll, 1% (w/v) BSA, mit Percoll aufgefüllt) und mit einem Gradienten-Mix (5% (w/v) Sorbit, 10 mM EDTA, 25 mM Hepes, pH 8,0 mit KOH eingestellt) hergestellt. Die Suspensionen wurden vorsichtig auf zwei Percoll-Stufengradienten, mit 3 mL 82% Percoll (2,46 mL Percoll-Lösung mit 0,54 mL Gradienten-Mix) und 7 mL 40% Percoll (2,8 mL Percoll-Lösung mit 4,2 mL Gradienten-Mix), verteilt und bei 1.500 g / 4 °C / 8 min in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Dabei wurde die Bremse auf 2 (von 3) bzw. 7 (von 9) eingestellt. Hierbei bildet sich eine obere Bande, bestehend aus kaputten Chloroplasten, sowie eine untere Bande, zwischen 82% und 40% Percoll, aus intakten Chloroplasten. Die obere Bande wurde mit einer 5 mL Pipette abgenommen und verworfen und die untere Bande mit einer 1 mL Pipette mit abgeschnittener Spitze abgenommen. Die intakten Chloroplasten wurden in ein frisches 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und mit HMS-Puffer aufgefüllt. Nach Zentrifugation im Ausschwingrotor bei 1.000 g / 4 °C / 4 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet im verbleibenden HMS-Puffer mit abgeschnittener Spitze resuspendiert. Die so isolierten Chloroplasten wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und auf Eis im Dunkeln gelagert.

Zur Chlorophyllbestimmung wurde 1 µL Chloroplastensuspension in 1 mL 80% Aceton überführt und gevortext. Die Absorption wurde am Photometer bestimmt und folgende Gleichung nach Lichtenthaler & Buschmann (2001) angewendet:

$$\text{Chlorophyll}_{a+b} [\mu\text{g/mL}] = (12.25 A_{663} - 2.79 A_{647}) + (21.50 A_{647} - 5.10 A_{663})$$

## 2.12 Ko-Immunopräzipitation (GFP-*pull down*-Assay)

Frisch isolierte Chloroplasten (entsprechend 45 bis 100 µg Chlorophyll, auf Eis oder 4 °C) aus Arabidopsis-Blättern wurden bei 20.000 g / 4 °C / 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 600 µL BN-Solubilisierungspuffer (BN-SB; 50 mM Bis-Tris, pH 7,0, mit HCl eingestellt, 10% Glycerin, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1% (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM), 1XComplete Protease Inhibitor Cocktail; 4 °C) versetzt und im Überkopffrotator bei 10 rpm / 10 °C / 1,5 h inkubiert und solubilisiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 20.000 g / 4 °C / 10 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt (1. Fraktion: solubilisierte Chloroplasten). Das Pellet wurde in 100 µL 3XSolubilisierungspuffer-M (SB-M; 0,15 M Tris-HCl pH 6,8, 6% (w/v) SDS, 30% Glycerin, 0,3 M DTT, etwas Bromphenolblau) aufgenommen (2. Fraktion: Pellet).

Anschließend wurden 20 µL GFP-Trap Dynabeads (ChromoTek; im Folgenden: Dynabeads) in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µL BN-SB versetzt. Die Dynabeads wurden mit einem Magneten von der Flüssigkeit getrennt und der klare Überstand verworfen. Die Dynabeads wurden auf diese Weise insgesamt dreimal gewaschen. Danach wurden die Dynabeads mit 500 µL der solubilisierten Chloroplasten versetzt und im Überkopffrotator bei 10 rpm / 10 °C / 1,5 h inkubiert. Mit einem Magneten wurden die Dynabeads vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt (3. Fraktion: Überstand 1). Die Dynabeads wurden mit 500 µL BN-SB versetzt und vorsichtig invertiert. Erneut wurden die Dynabeads mithilfe eines Magneten vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt (4. Fraktion: Überstand 2). Die Waschschrte wurden noch zweimal wiederholt (5. und 6. Fraktion: Überstand 3 und Überstand 4). Beim letzten Waschschrte wurden die Dynabeads in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

Nach Abnahme des Überstandes 4 wurden die Dynabeads in 100 µL 3xSB-M resuspendiert und zur Ablösung der an den GFP-Antikörper gebundenen Proteine bei 98 °C für 3 min inkubiert. Die Dynabeads wurden mit einem Magneten abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt (7. Fraktion: Eluat). Alle Proben wurden kurzzeitig bei 4 °C oder langfristig bei -20 °C gelagert.

**Anmerkung:** In Vorversuchen wurde der 2XSB nach Morris (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% (w/v) SDS, 20% Glycerol, 10% β-mercaptoethanol, etwas Bromphenolblau) zur Elution verwendet. Hier konnten keine Protein-Banden im Eluat detektiert werden, weshalb zu 3XSB-M gewechselt wurde.

## 2.13 Proteolyse von Vesikeln der inneren Hüllmembran von Erbsenchloroplasten

Das folgende Protokoll bezieht sich auf einen einfachen Ansatz an proteolytisch verdauten Vesikeln der inneren Hüllmembran (IE) von Erbsenchloroplasten, der auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden kann. In dieser Arbeit wurde ein fünffacher Ansatz durchgeführt, sodass darauffolgende Versuche mit der gleichen Probe durchgeführt werden konnten. Die IE wurden von der AG Soll, LMU München, zur Verfügung gestellt.

Zu Beginn wurden sechs 1,5 mL Reaktionsgefäße vorbereitet. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. In Gefäß 1 wurde Proteolyse-Puffer (330 mM Sorbitol, 50 mM HEPES-KOH, pH 7,6, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) mit IE aus Chloroplasten von Erbse, entsprechend einer Menge von 15 µg Protein, und Solubilisierungspuffer (4XMorris: 250 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (w/v) SDS, 40% Glycerol, 20% β-mercaptoethanol, etwas Bromphenolblau) gemischt. Dieser Ansatz diente als Kontrolle ohne Proteolyse. In Gefäß 2 wurde ein entsprechendes Volumen an Proteolyse-Puffer mit EDTA (Endkonzentration im Ansatz: 5 mM) und 15 µg IE vorgelegt. Danach wurde 0,1 µg Thermolysin (Stocklösung: 1 µg/µL in Wasser) pro 1 µg Protein der IE-Vesikel hinzugegeben. Dieser Ansatz diente als Kontrolle der Thermolysin-Inhibierung und somit Stopp der Proteolyse durch EDTA. Gefäß 3 wurde mit Proteolyse-Puffer und der vierfachen Menge an IE (entsprechend 60 µg Protein) beladen. Die Gefäße 4 bis 6 wurden mit EDTA (Endkonzentration im Ansatz: 5 mM) versehen, um die Proteolyse direkt stoppen zu können. In Gefäß 3 wurde anschließend 0,1 µg Thermolysin pro 1 µg Protein der IE hinzugegeben und die Proteolyse gestartet. Nach 30 s, 1 min und 5 min wurde jeweils die entsprechende Menge (15 µg IE) aus Gefäß 3 entnommen und in die Gefäße 4 bis 6 überführt, um die Proteolyse zu stoppen. Die Reaktion in Gefäß 3 wurde nach 15 min durch Zugabe von EDTA ebenfalls gestoppt. Gefäße 2 bis 6 wurden mit Solubilisierungspuffer versehen. Es folgte eine Inkubation aller Ansätze bei 37 °C für 15 min, um die Proteine zu solubilisieren. Anschließend wurden je 15 µg Proteine der IE per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und einer Immunoblotanalyse unterzogen.

## 2.14 SDS-PAGE, Western Blot und Antiseren

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Isolierte Proteine wurden über ein SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 9%ige, 12%ige oder 15%ige Acrylamid-Trenngele (375 mM Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,8 eingestellt mit HCl, 9-15% Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung, 0,05% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS), 0,05% Tetramethylethylendiamin (TEMED)) und 5%ige Acrylamid-Sammelgele (125 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 6,8 eingestellt mit HCl, 5%

Acrylamid-Bisacrylamidlösung, 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS), 0,1% Tetramethylethylendiamin (TEMED)) in Mini-Gelkammern (8 cm x 8 cm x 0,75 mm) angefertigt. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 45 min wurde das Isopropanol mit Whatman-Papier entfernt und das auspolymerisierte Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Der Kamm für die Geltaschen wurde eingesetzt und das Sammelgel für 20 min auspolymerisiert. Das fertige Gel wurde in feuchte Tücher gewickelt und bei 4 °C gelagert.

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proben, wenn nicht anders vermerkt, mit Solubilisierungspuffer (4XMorris: 250 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (w/v) SDS, 40% Glycerol, 20%  $\beta$ -mercaptoethanol, etwas Bromphenolblau) versetzt und 3 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden bei 13.000 rpm / RT / 3 min (Biofuge Pico, Heraeus) zentrifugiert und auf das Acrylamid-Gel aufgetragen. Es wurden 2  $\mu$ L ROTI®Mark TRICOLOR als Marker verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1XSDS-Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS) für ~30 min bei 80 V und anschließend für ~1,5 h bei 120 V bei Raumtemperatur.

### **Western Blot und Antiseren**

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (VWR PEQLAB Company) auf eine PVDF-Membran (Transfermembrane, Immobilon-P, 0,45  $\mu$ m) übertragen. Zum Blotten wurden drei mit Anodenpuffer I (300 mM Tris, 20% Methanol, pH 10,4, eingestellt mit KOH) getränkte Whatman-Papiere, zwei in Anodenpuffer II (30 mM Tris, 20% Methanol, pH 10,4, eingestellt mit KOH) getränkte Whatman-Papiere und darauf die in Methanol aktivierte (2 bis 3 min) und in Anodenpuffer II inkubierte (~2 min) PVDF-Membran übereinander gelegt. Das SDS-Gel wurde in Anodenpuffer II geschwenkt, auf der PVDF-Membran platziert und von drei in Kathodenpuffer (25 mM Tris, 40 mM Aminocaprinsäure, 20% Methanol, pH 7,6, eingestellt mit KOH) getränkten Whatman-Papieren bedeckt. Der Transfer erfolgte für 1:10 h bei einer Stromstärke von 1 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche.

Nach Transfer der Proteine wurde die Membran für 45 min geblockt (siehe Tabelle 8). Anschließend wurde die Membran in ein 50 mL Falcon mit 5-10 mL primärem Antikörper (Tabelle 8) überführt und auf einem Rollenschüttler (Phoenix Instrument) platziert. Es folgte eine Inkubation bei halbmaximaler Drehgeschwindigkeit über Nacht bei 4 °C.

**Tabelle 8: Primäre Antikörper, die in dieser Studie verwendet wurden.** Aufgelistet sind Antikörper, Hersteller, Wirt, Tier und Blutung, Verdünnung sowie das Medium zum Blocken des Blots. T: Tier, d: days (Tage), TTBS: Tween-Tris-buffered saline-Puffer (0,15 M NaCl, 0,1 M Tris, pH 7,5, 0,2% Tween-20, 0,1% BSA), MaMiPu: Magermilchpulver, BSA: Bovines Serumalbumin. \*Die Antikörper wurden im Auftrag der AG Philippar von Pineda Antikörper-Service (Berlin) hergestellt. °Die Antikörper wurden von der AG Römisch, Universität des Saarlandes, zur Verfügung gestellt. #Die Antikörper wurden von Youngsook Lee, Universität Pohang, Korea, zur Verfügung gestellt. +Die Antikörper wurden von der AG Soll, LMU München, zur Verfügung gestellt.

Antikörper	Hersteller	Wirt	Tier und Blutung	Verdünnung (in TTBS)	Blocking
$\alpha$ -AtFAX1	Pineda*	Kaninchen	T1, 180 d	1:1.000	TTBS
$\alpha$ -BIP	Agrisera	Kaninchen	-	1:2.000	TTBS
$\alpha$ -Cr-cFAX	Pineda*	Kaninchen	T2, 180 d	1:1.000	TTBS
$\alpha$ -Cr-erFAX	Pineda*	Kaninchen	T2, 180 d	1:1.000	TTBS
$\alpha$ -CrABCA2	AG Lee#	Kaninchen	-	1:2.000	TTBS
$\alpha$ -GFP	Agrisera	Kaninchen	-	1:1.000	TTBS
$\alpha$ -HA	Agrisera	Kaninchen	-	1:5.000	TTBS
$\alpha$ -LHC	AG Soll+	Kaninchen	-	1:1.000	TTBS
$\alpha$ -PsFAX1	Pineda*	Kaninchen	T2, 180 d	1:1.000	3% MaMiPu, 0,1% BSA (in TTBS)
$\alpha$ -PsFAX2	Pineda*	Kaninchen	T1, 180 d	1:1.000	3% MaMiPu, 0,1% BSA (in TTBS)
$\alpha$ -PsFAX3	Pineda*	Kaninchen	T3, 180 d	1:1.000	3% MaMiPu, 0,1% BSA (in TTBS)
$\alpha$ -PsTic62	AG Soll+	Kaninchen	-	1:1.000	3% MaMiPu, 0,1% BSA (in TTBS)
$\alpha$ -ScBIP	AG Römisch°	Kaninchen	-	1:10.000	TTBS
$\alpha$ -ScPDI	AG Römisch°	Kaninchen	-	1:2.500	TTBS
$\alpha$ -ScSec61 $\alpha$	AG Römisch°	Kaninchen	-	1:2.500	TTBS
$\alpha$ -ScSec61 $\beta$	AG Römisch°	Kaninchen	-	1:2.500	TTBS

Am darauffolgenden Tag wurde die Membran in ein neues 50 mL Falcon-Gefäß überführt und 3X10 min mit TTBS auf dem Rollenschüttler gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit 5 mL des sekundären Antikörpers (Tabelle 9) für 45 min auf dem Rollenschüttler.

**Tabelle 9: Sekundäre Antikörper, die in dieser Studie verwendet wurden.** Dargestellt sind der Antikörper, Hersteller, Wirt und Verdünnung. \*Dieser Antikörper wurde für indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

sekundärer Antikörper	Hersteller	Wirt	Verdünnung (in TTBS)
Anti-Rabbit IgG – Alkaline Phosphatase (AP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Ziege	1:6.000
Anti-Rabbit IgG – Horseradish Peroxidase (HRP)	Santa Cruz Biotechnology	Maus	1:10.000
Anti-Rabbit IgG – Tetramethylrhodamine (TRITC)*	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Ziege	1:250

Die Membran wurde erneut 3X10 min mit TTBS auf dem Rollenschüttler gewaschen und anschließend mit Wasser bedeckt. Je nach verwendetem sekundärem Antikörper wurde der Blot über eine alkalische Phosphatase (AP)-vermittelten Reaktion angefärbt oder über verstärkte Chemilumineszenz durch die Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish Peroxidase*, HRP) detektiert.

Bei der AP-vermittelten Reaktion wurden die Immunoblots mit einer Lösung aus 66 µg/mL NBT (*nitroblue tetrazolium*) und 33 µg/mL BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) in AP-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) so lange gefärbt, bis sichtbare Banden mit dem Auge erkennbar waren. Die Farbreaktion wurde anschließend durch Abwaschen und Inkubation mit 50 mM EDTA-Lösung gestoppt (1 min) und die Membran nach Trocknung eingescannt.

Bei der HRP-vermittelten Reaktion wurde die Membran mit ECL-Reagenzien nach Angaben des Herstellers (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) für 2 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion und Dokumentation am Bildgebungssystem FluorChemQ (Biozym) oder iBright1500 (Invitrogen).

## 2.15 Coomassie-Färbung von Proteinen und Vorbereitung zur Massenspektrometrie

Zur Coomassie-Färbung von Proteinen wurde ein SDS-Polyacrylamid-Gel für 60 min in Coomassie-Lösung (0,1% Brilliant Blue G-250, 50% Methanol, 10% Essigsäure) geschwenkt. Danach wurde das Gel in Entfärbelösung (10% Methanol, 10% Essigsäure) überführt und für 90 min geschwenkt. Die Entfärbelösung wurde durch Wasser ausgetauscht und das Gel über Nacht darin inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Wasser durch frisches Wasser ausgetauscht und weitere 10 min inkubiert. Darauf folgte die Dokumentation am Bildgebungssystem FluorChemQ (Biozym) oder iBright1500 (Invitrogen).

Zur Vorbereitung für die Detektion von Proteinen mittels Massenspektrometrie wurde das jeweilige Gel mit 40% Ethanol und 10% Essigsäure 2X10 min fixiert. Danach wurde das Gel 2X5 min mit Wasser gewaschen. Nach Inkubation über Nacht mit Coomassie-Lösung wurde das Gel in ein neues Gefäß mit 1% Essigsäure überführt. Die 1%ige Essigsäure wurde mehrmals gewechselt, bis alle Coomassie-Partikel im Gel-Hintergrund entfernt waren. Sichtbare Banden auf dem Gel wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ca. 1,5 x 1,5 mm große Stücke zerkleinert. Die Gelstücke wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µL Entfärbelösung (40% Ethanol, 5% Essigsäure) versetzt und für 30 min auf einem Überkoprotator inkubiert. Die Entfärbelösung wurde anschließend verworfen, durch neue Entfärbelösung ausgetauscht und erneut inkubiert. Nach erneutem Verwerfen der

Lösung wurden die Gelstücke in 500 µL Entfärbelösung bei 4 °C gelagert. Die massenspektrometrische Analyse wurde anschließend von Dr. Frederik Sommer (TU Kaiserslautern, Lehrstuhl für Systembiologie und Biotechnologie) nach einem In-Gel-Verdau mit Trypsin als Protease durchgeführt.

## 2.16 Indirekte Immunofluoreszenz

Das folgende Protokoll wurde am Lehrstuhl von Dr. Yonghua Li-Beisson (CEA Cadarache, Frankreich) zur Immunodetektion von cFAX- und erFAX-Proteinen in Chlamydomonas-Zellen durchgeführt.

Es wurde 1 mL Chlamydomonas-Kultur mit einer Dichte von  $\sim 5 \cdot 10^6$  Zellen/mL (exponentielle Wachstumsphase) abzentrifugiert und 800 µL Überstand verworfen. Die Zellen wurden in den restlichen 200 µL Medium resuspendiert und auf einen Poly-L-Lysin beschichteten Glasobjektträger (Poly-Prep slide, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) aufgetropft. Nach 10 min heftete die Mehrheit der Zellen auf dem Objektträger an. Die überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig von der Seite mithilfe einer Pipette abgenommen und verworfen. Der Objektträger wurde vorsichtig für 2 min in kaltes Methanol (-20 °C) getaucht und anschließend 5X mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; 127 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) gewaschen, indem jeweils 200 µL PBS aufgetropft und vorsichtig wieder entfernt wurden. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µL PBS, welchem 1% Rinderserumalbumin (BSA) zugesetzt wurde, für 30 min inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einer Petrischale, die mit nassen Papiertüchern ausgelegt war, um die Luftfeuchte zu erhöhen und ein frühzeitiges Austrocknen zu verhindern. Das PBS wurde anschließend abgenommen und durch 40 µL PBS mit 1% BSA und dem primären Antikörper (gleiche Verdünnung wie bei Western Blot, siehe Tabelle 8) ersetzt. Es folgte eine erneute Inkubation in der Petrischale für 3 h. Die Probe wurde erneut 5X mit je 200 µL PBS gewaschen. Ab hier erfolgte die weitere Probenbearbeitung aufgrund lichtsensitiver Reagenzien in einer Dunkelkammer. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen mit 40 µL PBS mit 1% BSA und dem sekundären Antikörper (anti-rabbit IgG-TRITC (Tetramethylrhodamin), siehe Tabelle 9) versetzt und für 1,5 h in einer Kammer mit ausgelegten nassen Tüchern inkubiert. Die Probe wurde 5X mit je 200 µL PBS gewaschen und anschließend mit 4 µL Eindecklösung (Prolong Gold antifade reagent, Invitrogen) benetzt, um Photobleichung zu verhindern und eine längere Lagerfähigkeit zu ermöglichen. Ein Deckglas wurde aufgesetzt und die Eindecklösung aushärten gelassen. Die Zellen wurden unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LEICA LSM480) betrachtet.

## 2.17 Mikroskopie

### **Fluoreszenz-Mikroskopie**

Pflanzen, die FAX1-GFP exprimieren, sowie der Wildtyp Col-0 wurden unter Langtagbedingungen angezogen. Die Anzucht erfolgte sowohl auf Erde (vier Wochen) als auch auf Agar-Platten (2,5 Wochen). Zur Visualisierung der GFP-Fluoreszenz wurden Teile von Rosettenblättern oder die ganze Agar-Platte verwendet und im Bildgebungssystem FluorChemQ (Biozym) platziert. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einer Anregung bei 475/42 nm und einer Emission von 537/35 nm detektiert.

### **Laser-Scanning-Mikroskopie**

Chlamydomonas-Zellen im exponentiellen Wachstum wurden durch Zugabe von 2,5% Glutardialdehyd immobilisiert. Davon wurde 1 mL zu einer dunkelgrünen Algensuspension durch Abzentrifugieren bei 1.500 g aufkonzentriert und auf einen Objektträger pipettiert oder entsprechend dem Protokoll für die Immunofluoreszenz vorbereitet. Das Laser-Scanning-Mikroskop LEICA LSM480 wurde in der AG Li-Beisson verwendet. TRITC-Fluoreszenzsignale der sekundären Antikörper wurden nach einer Anregung unter der Laserlinie 561 nm mit einem Emissionsspektrum von 565-583 nm detektiert. Die Chlorophyll b-Fluoreszenz wurde unter der Laserlinie 458 nm mit einem Emissionsspektrum von 626-735 nm detektiert. Die Fluoreszenz von mVenus wurde unter der Laserlinie 512 nm mit einem Emissionsspektrum von 520-564 nm detektiert.

## 2.18 Nilrot-Färbung

### **Etablierung der Nilrot-Färbung**

Zur Etablierung der Nilrot-Färbung von TAG-Lipiden wurden Chlamydomonas-Zellen in TAP-Medium angezogen. In der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>750</sub> von 0,3 bis 0,5) wurden die Zellen aufgeteilt und in TAP-Medium mit oder ohne Stickstoff überführt. In TAP-Medium ohne Stickstoff wurden 7,5 mM NH<sub>4</sub>Cl durch 7,5 mM NaCl ersetzt. Es folgte ein weiteres Wachstum im entsprechenden Medium für drei Tage. In stickstofffreiem Medium bilden die Zellen vermehrt TAG, sodass diese für den Nachweis einer erhöhten Nilrot-Fluoreszenz herangezogen werden konnten. Die Zellen in TAP-Medium mit Stickstoff dienten als Kontrolle. Nilrot wurde als Stocklösung mit 0,1 mg/mL in Methanol angesetzt und bei 4 °C gelagert. Nachdem die Proben auf eine OD<sub>750</sub> von 0,1 eingestellt wurden, wurde Nilrot mit einer Endkonzentration von 0,1 µg/mL (1:1000 Verdünnung) hinzugegeben, die Proben invertiert und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Je 200 µL der Proben wurden anschließend in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Für die Einstellungen der Fluoreszenz-Messung wurde

sich an den Daten in der Literatur orientiert (Übersicht in Rumin et al., 2015). An einem Mikroplatten-Reader (Tecan Safire II) wurde zuerst ein Scan der Anregungswellenlänge beider Proben durchgeführt. Dabei wurde ein Scan von 490 bis 560 nm in 5 nm Schritten (Bandbreite: 10 nm) und einer Emissionswellenlänge von 580/5 nm durchgeführt. Dabei konnte ein geeigneter Intensitätsunterschied zwischen den beiden Proben bei 530 nm ermittelt werden. Darauf folgend wurde ein Scan der Emissionswellenlänge durchgeführt, bei einer Anregungswellenlänge von 530/10 nm. Der Scan wurde von 550 bis 620 nm in 5 nm Schritten (Spaltbreite: 5 nm) ausgeführt. Es konnte eine geeignete Emissionswellenlänge von 570 nm ermittelt werden. In weiteren Versuchen wurden das Wellenlängenpaar 530 und 570 mit verschiedenen Band- und Spaltbreiten untersucht, um einen größtmöglichen Unterschied im Fluoreszenzsignal zwischen den beiden Proben zu erzielen. Des Weiteren wurde untersucht, welche OD750 eingestellt werden muss, um aussagekräftige Ergebnisse zu generieren. Im Folgenden wird das etablierte Protokoll zur Nilrot-Messung beschrieben.

### **Nilrot-Experiment**

Chlamydomonas-Zellen wurde in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD750 von 0,3 bis 0,5) für eine Woche unter Normalbedingungen angezogen. Anschließend wurden die Zellen in Medium ohne Stickstoff zweimal gewaschen und auf eine OD750 von 0,3 eingestellt. Messungen der Proben wurden an Tag 0, Tag 3, Tag 4 und Tag 6 immer zur gleichen Uhrzeit vorgenommen. Alle Chlamydomonas-Kulturen wurden zur Messung auf eine OD750 von 0,3 in 1 mL in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß eingestellt. Zusätzlich wurde 1 mL Medium als Referenz vorbereitet. Es wurde 1 µL Nilrot (1 mg/mL in Methanol) pro Probe, einschließlich Referenz, hinzugegeben, das Gefäß mehrmals invertiert und die Proben für 15 min im Dunkeln inkubiert. Es wurden 2X200 µL pro Probe in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit geschlossenem Boden (Thermo Scientific) pipettiert, um Messduplikate zu erhalten. Am Mikroplatten-Reader wurde eine Z-Position von 6300 µm eingestellt. Als *FlashMode* wurde *High Speed* gewählt. Die Integrationszeit betrug 40 µs. Zwischen den Messungen wurde eine Schüttelzeit von 4 s (orbital, medium) eingestellt. Zur Messung der Nilrot-Fluoreszenz wurde eine Anregungswellenlänge von 530/14 nm und eine Emissionswellenlänge von 570/5 nm gewählt. Der *Gain* wurde auf 150 festgelegt. Zusätzlich wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 435/5 nm und einer Emissionswellenlänge von 685/5 nm detektiert. Der *Gain* wurde auf 110 festgelegt.

### **2.19 Sequenzanalysen**

Die Auswertung der Proteinsequenzen erfolgte mit SnapGene (GSL Biotech LLC) und GeneDoc 2.7 (NRBSC). Die Sequenz-Alignments wurden mit SnapGene nach dem Needleman-Wunsch-Algorithmus (Matrix: BLOSUM62) durchgeführt. Die Bearbeitung und

Darstellung der Sequenzen erfolgte mit GeneDoc. Die Darstellung von Thermolysin-Schnittstellen wurde mit der Software PeptideCutter ([https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/)) durchgeführt.

## 2.20 Datenbanken und Server

Zur Auswertung der Daten wurden jeweils die Datenbanken ARAMEMNON 8.1 (Schwacke et al., 2003; <http://aramemnon.uni-koeln.de/>) und Phytozome v13 (Goodstein et al. 2011; <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) für Arabidopsis und Chlamydomonas verwendet. Die Identifikationsnummern von Proteinen sind nach der UniProt-Datenbank (<https://www.uniprot.org/>) aufgeführt. Zur Kategorisierung von Proteindomänen sowie zur Klassifizierung von Proteinen und deren Genen wurden jeweils die Datenbanken Pfam 34.0 (Mistry et al., 2021; <http://pfam.xfam.org/>) und PANTHER16.0 (Mi et al., 2021; Thomas et al., 2003; <http://www.pantherdb.org/>) genutzt. Die Server TargetP 2.0 (Armenteros et al., 2019; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) und TMHMM Server v.2.0 (Krogh et al., 2001; Sonnhammer et al., 1998; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) wurden jeweils zur Vorhersage der Lokalisation und der Transmembrandomänen von Proteinen verwendet.

## 2.21 Statistische Auswertung

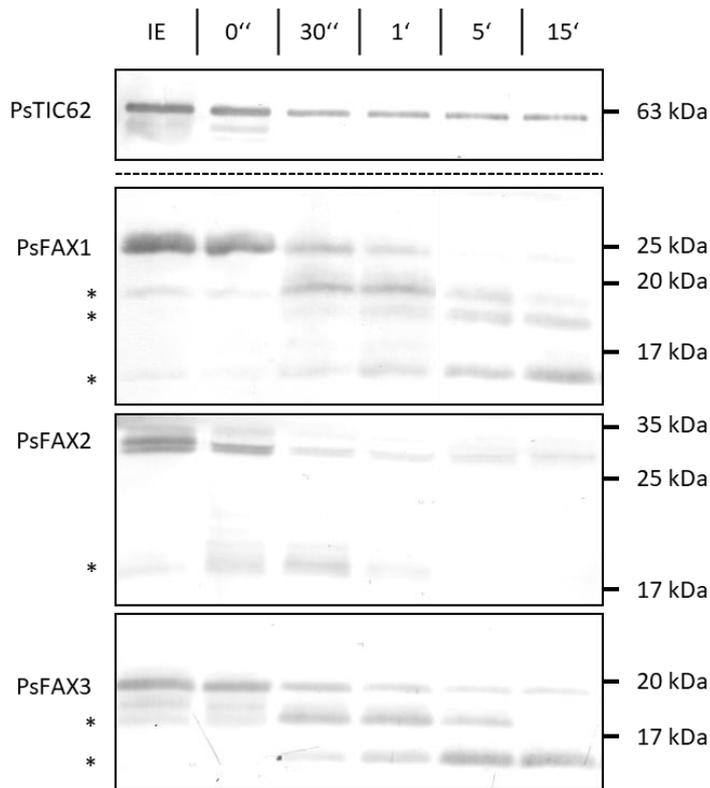
Zur statistischen Auswertung wurde die Software IBM SPSS statistics (v.27) verwendet. Zum Testen der Normalverteilung wurde ein Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0,05$ ) durchgeführt. Zur Überprüfung der Varianzhomogenität wurde der Levene-Test ( $p > 0,05$ ) angewandt. Um signifikante Unterschiede statistisch darzustellen, wurde eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Tukey post-hoc Test ( $p < 0,05$ ) durchgeführt. Wenn keine Normalverteilung oder keine Varianzhomogenität vorlag, wurde der Kruskal-Wallis-Test ( $p < 0,05$ ) angewandt. Abweichungen hiervon werden textlich erwähnt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Bestimmung der Topologie von FAX-Proteinen in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten

Um die Topologie sowie die Orientierung der FAX-Proteine in der Lipidmembran aufzuklären, wurde ein proteolytischer Verdau durchgeführt. Es wurden Vesikel aus der inneren Hüllmembran (*inner envelope*, IE) von Erbsenchloroplasten verwendet, die größtenteils die native Orientierung aufweisen (Keegstra & Yousif, 1986). Als Protease wurde Thermolysin verwendet. Thermolysin schneidet am N-Terminus hydrophober Aminosäuren und ist in den eingesetzten Konzentrationen und Inkubationszeiträumen nicht in der Lage, die innere Hüllmembran zu passieren. Aus diesem Grund werden nur Proteinbereiche, die nach außen (*in vivo*: zum Intermembranraum) exponiert sind, geschnitten. Die Antiseren gegen PsFAX1, PsFAX2 sowie PsFAX3 sind gegen Peptide am N-Terminus des jeweiligen Proteins gerichtet (Abbildung S1). Somit können nur Proteinfragmente detektiert werden, die einen intakten N-Terminus aufweisen. PsTIC62 wurde als Kontrolle verwendet, da es auf der Stroma-Seite an der inneren Hüllmembran angeheftet ist. Daher sollte nur ein geringer Abbau von TIC62 durch Vesikel falscher Orientierung stattfinden.

Das mature, nicht durch Thermolysin behandelte PsFAX1-Protein konnte nach einem Western Blot auf einer Höhe von 25 kDa detektiert werden (Abbildung 4). Somit lief PsFAX1 in SDS-Gelen 4,6 kDa weiter oben, als das Molekulargewicht von 20,4 kDa des vorhergesagten muren Proteins angibt (siehe Abbildung S1 für Proteinsequenzen und Molekulargewichte). PsFAX2 bildete eine Doppelbande und lief ebenso mit ~30 kDa etwas höher als das berechnete Molekulargewicht des muren Proteins von 26,8 kDa. Auch FAX3 lief mit ~20 kDa weiter oben als das Molekulargewicht des potenziellen muren Proteins von 16,6 kDa. Dieses unerwartete Laufverhalten der FAX-Proteine, etwa 3 bis 5 kDa größer als das berechnete Molekulargewicht, konnte auch bereits von Li et al. (2015) und Bugaeva et al. (2021) gezeigt werden. Für PsFAX1 und PsFAX3 konnten eindeutige Proteinfragmente nach einem Thermolysin-Verdau detektiert werden (Abbildung 4).

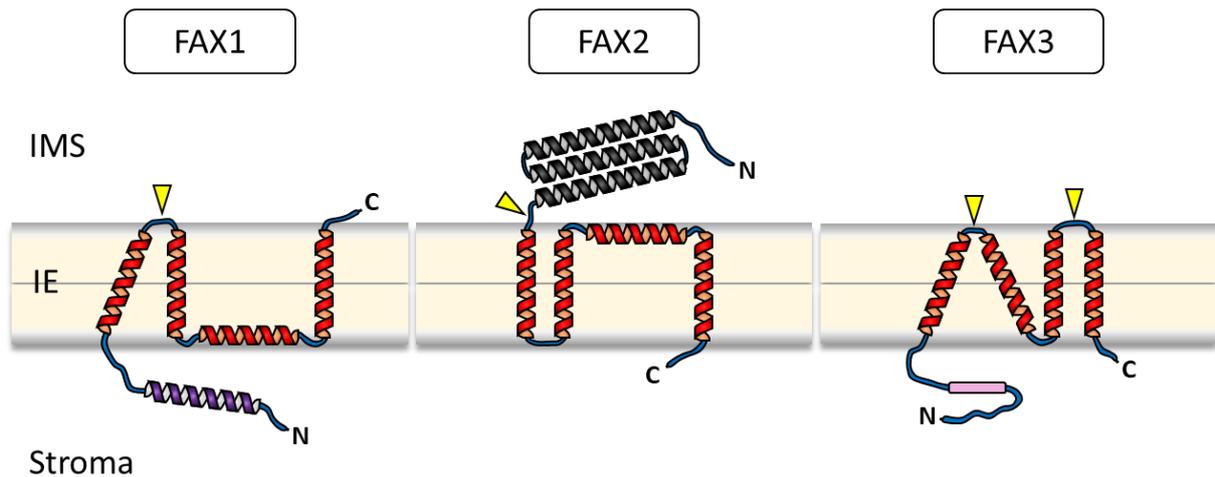


**Abbildung 4: Proteolytischer Verdau von PsFAX-Proteinen.** Dargestellt sind Immunoblots eines proteolytischen Verdaus mit Thermolysin für 0 bis 15 min von Vesikeln der inneren Hüllmembran (IE) aus Erbsenchloroplasten. Es wurden spezifische Antikörper gegen PsFAX1, PsFAX2 und PsFAX3 verwendet, die gegen den N-Terminus gerichtet sind. Das Antiserum gegen PsTIC62 diente als Kontrolle. Pro Spur wurden behandelte Vesikel jeweils entsprechend 15  $\mu$ g Protein aufgetragen. Die Positionen von vermeintlichen Degradationsprodukten des Thermolysin-Verdaus sind mit Asterisken markiert. IE ohne Thermolysin wurde als Kontrolle verwendet. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Hieraus ließ sich schlussfolgern, dass die N-Termini dieser Proteine zum Vesikelinneren orientiert sind, das heißt *in vivo* zur Stroma-Seite. Das PsFAX2-Fragment wurde nach 15 min komplett verdaut, was auf eine Orientierung des N-Terminus zum Vesikeläußeren (*in vivo*: Intermembranraum) hindeutete. Durch Auswertung der Größe der detektierbaren Proteinfragmente sowie der vorhergesagten Thermolysin-Schnittstellen und hydrophoben  $\alpha$ -Helices der FAX-Proteine lassen sich Rückschlüsse auf die Organisation der  $\alpha$ -helikalen Domänen in der Lipidmembran ziehen. Da die FAX-Proteine ein untypisches Laufverhalten aufwiesen, wurde die Differenz in kDa zwischen den Proteinfragmenten, die durch den Thermolysin-Verdau entstanden sind, mit der jeweiligen Abspaltung eines Proteinfragments ausgewertet (siehe unten).

Drei Proteinfragmente konnten für PsFAX1 nach einem Thermolysin-Verdau detektiert werden. Die Bande bei ~15 kDa konnte dem Proteinfragment nach Spaltung zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne (siehe Abbildung 5) zugeordnet werden, was zu einem Verlust von ~10,2 kDa führte. Die beiden verbliebenen Banden auf Höhe von ~18 und

~19 kDa konnten keinen bestimmten Proteinfragmenten zugeordnet werden, unabhängig möglicher Proteintopologien oder der Orientierung in der inneren Hüllmembran. Für PsFAX2 konnte eine transiente Bande bei ~18 kDa detektiert werden. Das stärkste Signal dieser Bande konnte nach 30 Sekunden Thermolysin-Verdau nachgewiesen werden. Bedenkt man die Antikörper-Bindestelle am N-Terminus, so konnte das Proteinfragment der N-terminalen Apolipoprotein-Domäne von FAX2 (Bugaeva et al., 2021) zugeordnet werden, was mit einem Verlust von 12,0 kDa, der die Tmemb\_14-Domäne umfasst, begründet werden konnte. Anzumerken ist eine verbleibende schwache Bande auf ~30 kDa des muren PsFAX2-Proteins nach 30 Sekunden Thermolysin-Verdau, was auf eine unvollständige Proteolyse von PsFAX2 hindeutete. Das Fragmentierungsmuster von PsFAX3 deutete darauf hin, dass das mature Protein vier Transmembrandomänen aufweist. Schon nach 30 Sekunden wurden zwei Banden sichtbar, die jeweils bei ~18 und ~15 kDa liefen. Im Laufe der Proteolyse nahm die Intensität der oberen Bande ab, während die untere Bande an Intensität zunahm. Das größere Proteinfragment ließ sich durch einen Verlust der vierten Transmembrandomäne erklären (- 3,6 kDa). Das kleinere Fragment entsprach dem N-Terminus zusammen mit der ersten Transmembrandomäne, das heißt es fand eine Spaltung zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne statt, was einem Verlust von 8,7 kDa vom muren FAX3-Protein entsprach. Mit fortschreitender Proteolyse schnitt Thermolysin den exponierten Peptidbereich zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne in allen PsFAX3-Proteinen, sodass am Ende des Experiments eine einzige Bande bei ~15 kDa zu sehen war. Aufgrund dieser Fragmentierungsmuster sowie der Verteilung hydrophober und amphiphiler  $\alpha$ -Helices (siehe Bugaeva et al., 2021) ließen sich Modelle der FAX-Proteine in der inneren Hüllmembran anfertigen, die in Abbildung 5 schematisch dargestellt sind.



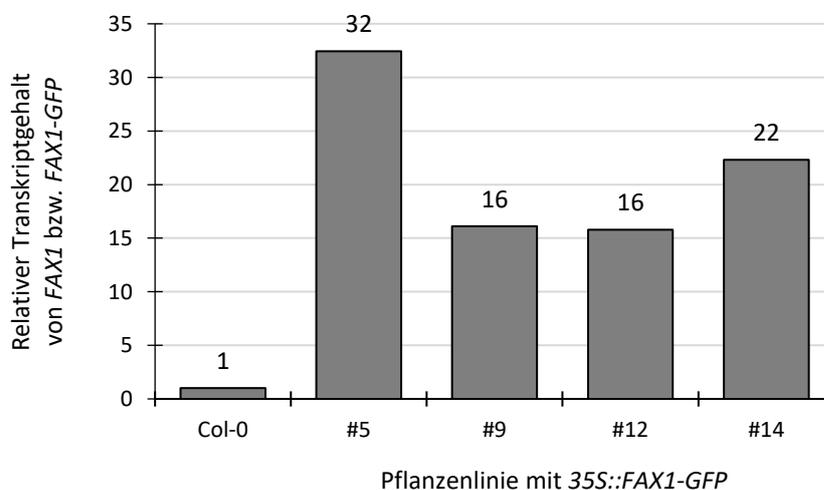
**Abbildung 5: Membrantopologie der FAX-Proteine.** Dargestellt sind Modelle von FAX1, FAX2 und FAX3 basierend auf dem proteolytischen Verdau mit Thermolysin und der Verteilung hydrophober und amphiphiler  $\alpha$ -Helices (siehe Bugaeva et al., 2021). Der N- und C-Terminus sind mit „N“ und „C“ markiert. Rote  $\alpha$ -helikale Domänen sind membranintrinsic. FAX1 besitzt zusätzlich eine hydrophile  $\alpha$ -Helix (lila). Als schwarze Helices ist die Apolipoprotein-Domäne von FAX2 dargestellt, die in wässrigem Medium höchstwahrscheinlich ein Helixbündel ausbildet. FAX3 besitzt am N-Terminus einen charakteristischen Poly-Glycin-Bereich, der als rosa Kasten dargestellt ist. Thermolysin-Schnittstellen (gelbe Dreiecke) sind nach der Interpretation der Fragmentierungsmuster dargestellt (siehe auch Abbildung S1). IE: *inner envelope* (innere Hüllmembran), IMS: *inter membrane space* (Intermembranraum).

Zusätzlich zum proteolytischen Verdau wurde versucht, die exakte Größe der maturen Proteine und damit die Länge der vorhergesagten Chloroplasten-Transitpeptide der PsFAX-Proteine näher zu bestimmen. Dazu wurde eine Bande auf Höhe des entsprechenden PsFAX-Proteins aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und per Massenspektrometrie an der TU Kaiserslautern (AG Schroda) sequenziert. Dazu wurde ein In-Gel-Verdau mit Trypsin als Protease von Dr. Frederik Sommer durchgeführt und über die gemessenen Massen die Sequenz der Peptidfragmente bestimmt. Die N-terminalsten Peptide, die per Massenspektrometrie identifiziert werden konnten, sind in Abbildung S1 markiert. Die detektierten Peptidsequenzen traten immer nach einem Lysin oder Arginin auf, also genau dort, wo Trypsin spezifisch schneidet. Aufgrund dieser Tatsache kann davon ausgegangen werden, dass die identifizierten Peptide nicht den exakten N-Terminus der PsFAX-Proteine darstellen. Dennoch finden sich N-terminal dieser Peptide keine weiteren Lysin- oder Arginin-Reste, die nicht in der Sequenz der jeweils vorhergesagten Transitpeptide liegen. Daher lassen sich die Messungen als Indiz für die Richtigkeit des vorhergesagten Chloroplasten-Transitpeptids interpretieren.

### 3.2 GFP-*pull down*-Assay zur Identifizierung von AtFAX1-Interaktionspartnern

Um die Funktionsweise von FAX1 näher charakterisieren zu können, wurde versucht, Interaktionspartner von AtFAX1 mit Hilfe einer Ko-Immunopräzipitation zu identifizieren. FAX1 besitzt bis *dato* keine annotierten funktionellen Domänen, sodass eine Funktion innerhalb eines größeren Komplexes nicht unwahrscheinlich ist. In Vorversuchen von Louis Percifull (2020) konnte durch *chemical crosslinking* gezeigt werden, dass die Signalintensität des monomeren FAX1 im Wildtyp Col-0, in einer FAX1-Überexpressionslinie sowie in FAX1-GFP exprimierenden Linien nach Zugabe eines *Crosslinkers* deutlich abnimmt, was für das Vorhandensein eines Multiproteinkomplexes spricht. Leider konnten hier keine Proteinkomplexe mit FAX1- oder GFP-Antikörpern per Western Blot detektiert werden.

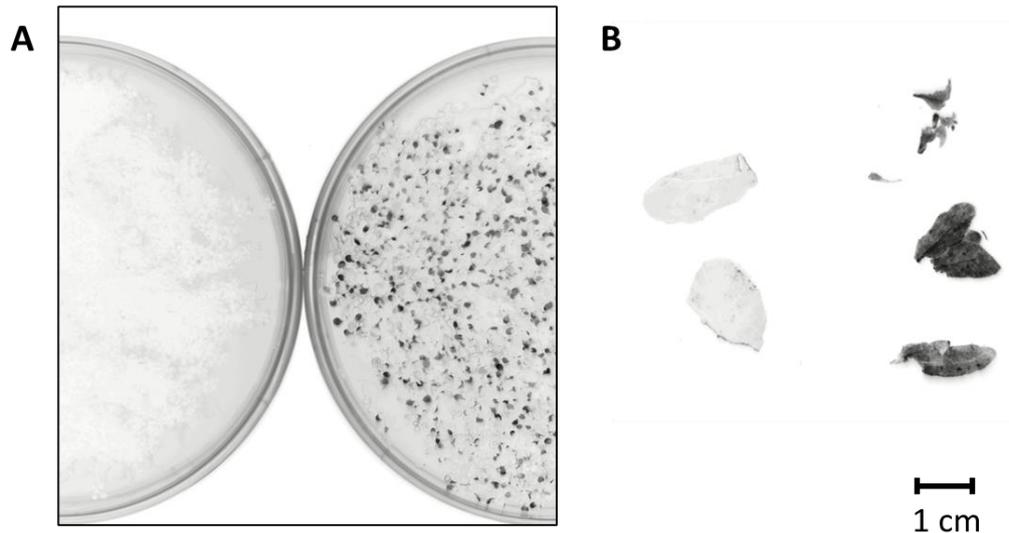
Um mögliche Interaktionspartner von FAX1 zu identifizieren, wurde in dieser Studie ein GFP-*pull down*-Assay mit AtFAX1, welches am C-terminus mit einem GFP verbunden ist, etabliert und durchgeführt. Der GFP-*pull down* ist eine spezielle Form der Ko-Immunopräzipitation, bei der GFP als Köder (*bait*) verwendet wird und an spezifische GFP-Antikörper bindet. Für den Assay wurden vier homozygote FAX1-GFP exprimierende Linien herangezogen, in denen vorab der FAX1-Transkriptgehalt vermessen wurde (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Relativer Transkriptgehalt von FAX1 in FAX1-GFP Linien.** Dargestellt ist der Transkriptgehalt normiert auf *Aktin2/8* und im Verhältnis zum Wildtyp Col-0 (relative Einheiten). Samen der T4 Generation wurden auf Erde ausgesät und unter Langtagbedingungen angezogen. Nach sechs Wochen wurden pro Linie je 1-2 Rosettenblätter von je 5-10 Pflanzen geerntet und zu einer Probe vereint. Alle FAX1-GFP Linien sind homozygot für das inserierte 35S::FAX1-Konstrukt sowie *fax1-2 knockout* Mutanten. N = 1.

Alle genutzten FAX1-GFP Linien wurden im homozygoten *fax1-2 knockout* Hintergrund (Li et al., 2015) generiert, das heißt es wird kein wildtypisches FAX1 exprimiert. Aufgrund der

Bildung von Samen in den FAX1-GFP Linien sowie der wildtypischen Wachstumseigenschaften kann davon ausgegangen werden, dass FAX1-GFP intakt und funktionell in den Linien vorhanden sein muss. Die Expression von FAX1-GFP in Keimlingen sowie adulten Rosettenblättern der FAX1-GFP Linie #9 konnte ebenso durch Fluoreszenzaufnahmen bestätigt werden (Abbildung 7).



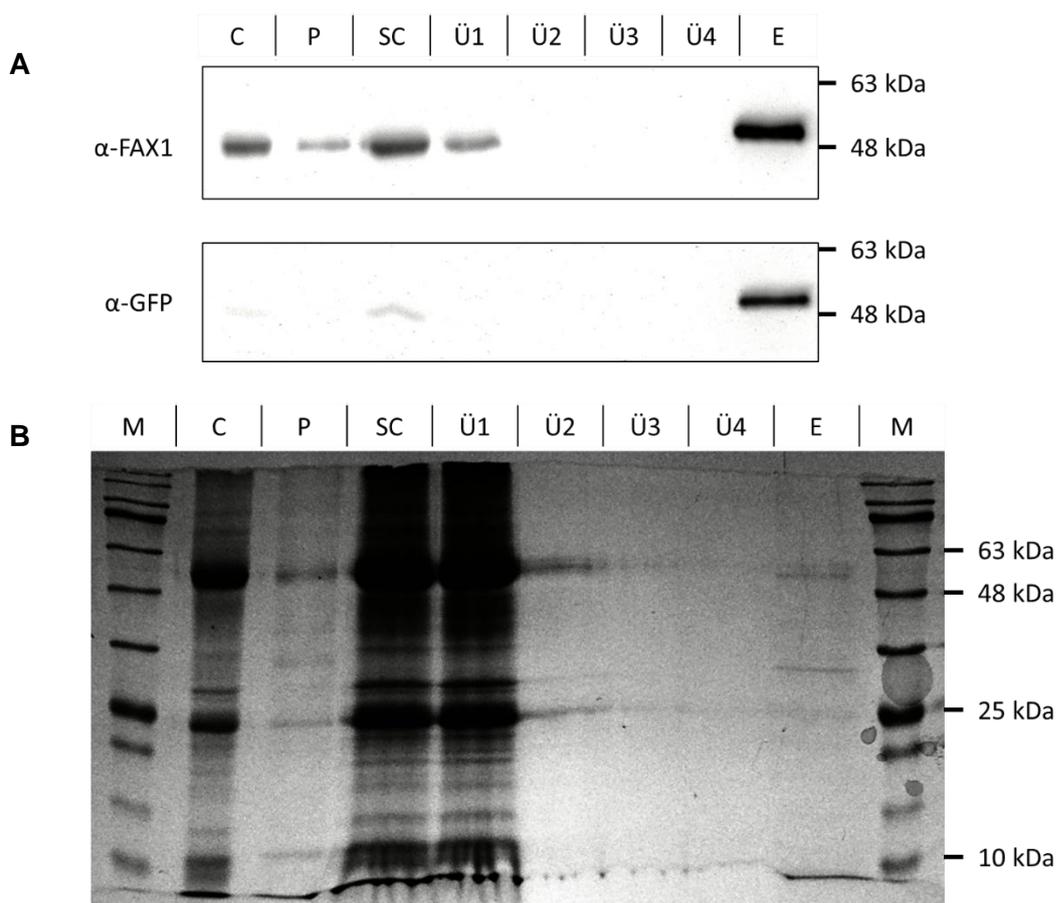
**Abbildung 7: GFP-Fluoreszenz von FAX1-GFP Pflanzen.** Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen von **(A)** 2,5 Wochen alten Keimlingen auf Agar-Platten vom Wildtyp Col-0 (links) und der Linie FAX1-GFP #9 (rechts) sowie von **(B)** Teilen adulter Rosettenblätter vom Wildtyp Col-0 (links) und der Linie FAX1-GFP #9 (rechts). GFP wurde bei 475/42 nm angeregt und die Emission bei 537/35 nm detektiert. Die GFP-Fluoreszenz ist in schwarz dargestellt. Der Maßstab beträgt 1 cm und gilt für **(A)** und **(B)**.

Zur Etablierung des GFP-*pull downs* wurden Samen der Linien #9 und #14 verwendet. Für die vollständige Durchführung und Auswertung wurden nur Pflanzen der Linie #9 verwendet, da der FAX1-Transkriptgehalt ähnlicher dem Wildtypellevel ist (Abbildung 6) und somit mögliche Artefakte durch Überexpression reduziert werden.

Ein entscheidender Faktor bei der Vorbereitung für den GFP-*pull down*-Assay ist die geeignete Wahl des Detergens, um den Proteinkomplex möglichst intakt aus der Membran zu lösen ohne mögliche Interaktionen zu stören. Aufgrund von Vorversuchen durch Louis Percifull (2020) wurde ein Solubilisierungspuffer mit n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM) als Detergens gewählt. Die Elution von FAX1-GFP vom „GFP-Trap“-Säulenmaterial (Dynabeads) stellte sich als weitere Hürde heraus. Während der Etablierung des GFP-*pull downs* konnte FAX1-GFP in den solubilisierten Chloroplasten aber nicht im Eluat detektiert werden, bei dem der 2XSDS-Puffer nach Morris als Elutionspuffer verwendet wurde (siehe Kapitel 2.12). Nachdem der Elutionspuffer zu 3XSB-M gewechselt wurde, konnte FAX1-GFP im Eluat detektiert werden (Abbildung 8). Dieser Puffer enthielt sowohl mehr SDS (6% in 3XSB-M im Vergleich zu 5% in

2XSB nach Morris) als auch mehr Glycerin (30% in 3XSB-M im Vergleich zu 20% in 2XSB nach Morris).

Nach erfolgreicher Etablierung des GFP-pull downs wurde versucht, die DDM-Konzentration zu optimieren. Es traten keine Unterschiede zwischen 0,1%, 1% und 2% DDM im Solubilisierungspuffer beim GFP-pull down und der darauffolgenden Massenspektrometrie-Analyse auf, weshalb 1% DDM für den Solubilisierungspuffer festgelegt wurde. Die Western Blots eines vollständigen GFP-pull downs mit Antiseren gegen AtFAX1 und GFP sowie ein Coomassie-Gel sind beispielhaft in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Immunoblots und Coomassie-Gel der Fraktionen eines GFP-pull downs mit FAX1-GFP.**

**(A)** Immunoblots: Für die Aufarbeitung wurden aufgereinigte Chloroplasten entsprechend 45 µg Chlorophyll der Linie #9 und 20 µL „GFP-Trap“-Säulenmaterial (Dynabeads) eingesetzt. Für die Western Blots wurden Antiseren gegen FAX1 (oben) und GFP (unten) verwendet. Die Detektion erfolgte via Chemilumineszenz. Durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden aufgereinigte Chloroplasten entsprechend 0,3 µg Chlorophyll (C) und entsprechende Fraktionen des GFP-pull downs. **(B)** Coomassie-Gel: Es wurden aufgereinigte Chloroplasten entsprechend 100 µg Chlorophyll der Linie #9 und 20 µL Dynabeads eingesetzt. Auf das SDS-Gel aufgetragen wurden aufgereinigte Chloroplasten entsprechend 0,6 µg Chlorophyll (C) und entsprechende Fraktionen des GFP-pull downs. In **(A)** und **(B)**: P: Pellet, SC: solubilisierte Chloroplasten, Ü1-Ü4: Überstand 1-4, E: Eluat. Es wurden jeweils 5 µL von P und 15 µL von SC, Ü1-Ü4 und E aufgetragen. M: Marker ROTI®Mark TRICOLOR. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Mit dem FAX1-Antiserum waren die stärksten Signale bei den intakten Chloroplasten, den solubilisierten Chloroplasten und dem Eluat zu sehen. Schwächere Signale waren im Pellet sowie im ersten Überstand zu verzeichnen, was für eine gute Solubilisierung und Bindung an die GFP-Trap-Säule spricht. Dennoch ist zu beachten, dass unterschiedliche Volumina aufgetragen wurden und die einzelnen Banden somit nur bedingt miteinander vergleichbar sind. Im Vergleich zu den solubilisierten Chloroplasten war das Pellet 2fach sowie das Eluat 6fach konzentriert. Die solubilisierten Chloroplasten waren im Vergleich zu den intakten Chloroplasten ca. 3,75fach konzentriert. Die detektierte Bandengröße von ca. 50 kDa entsprach ungefähr dem berechneten Molekulargewicht von FAX1-GFP mit ~47 kDa. Mit dem GFP-Antikörper konnten jeweils nur eine schwache Bande in den intakten Chloroplasten und den solubilisierten Chloroplasten detektiert werden sowie eine starke Bande im Eluat. Das Bandenmuster entsprach dem für den FAX1-Antikörper, nur in geringerer Intensität.

Bei Betrachtung des Coomassie-Gels wurde deutlich, dass nur wenige Proteine im Pellet zu sehen waren und nicht solubilisiert wurden. Des Weiteren wurden die meisten Proteine schon nach dem ersten Waschschrift von der GFP-Trap-Säule entfernt. In Überstand 4 waren nahezu keine Proteinbanden mehr sichtbar. Nach der Elution waren schwache Banden bei ca. 25, 30 und 50 kDa zu erkennen, die auf mögliche Interaktionspartner von FAX1 hindeuteten (siehe auch Abbildung S2 für die Auftragung weiterer Eluate). Das Eluat sowie ausgeschnittene Banden wurden zur Sequenzierung über Massenspektrometrie verwendet und ausgewertet. Der GFP-*pull down* wurde zweimal komplett unabhängig mit frisch isolierten Chloroplasten durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein GFP-*pull down* mit dem Wildtyp Col-0 durchgeführt und ebenfalls zur Analyse verschickt. Der GFP-*pull down* aller Eluat-Proben wurde mit 1% DDM im Solubilisierungspuffer durchgeführt. In den Banden-Proben wurden DDM-Konzentrationen von 0,1%, 1% oder 2% verwendet.

In Eluat 1 (erster Versuch) konnten 116 Proteine und in Banden 1 (erster Versuch; ausgeschnittene Banden bei 10, 30 und 55 kDa) 39 Proteine detektiert werden. In Eluat 2 (zweiter Versuch) und Banden 2 (zweiter Versuch; 14 ausgeschnittene Gel-Banden verschiedener Ansätze auf Höhe von 15 bis 100 kDa) konnten je 135 und 145 Proteine gemessen und zugeordnet werden. Im Eluat der Wildtyp-Kontrolle Col-0 konnten 62 Proteine detektiert werden (zur Übersicht siehe Abbildung S3). In Tabelle S1 sind alle Proteine aufgeführt, die sowohl in Eluat 1 als auch in Eluat 2 gefunden wurden, abzüglich aller Proteine, die auch in Col-0 detektiert wurden. Proteine, die in Banden 1 und Banden 2 gefunden wurden, sind jeweils in Tabelle S2 und Tabelle S3 aufgelistet. Alle aufgeführten Proteine kommen als potenzielle FAX1-Interaktionspartner in Frage.

Aufgrund der hohen Anzahl detektierter Proteine wurden die Datensätze zusätzlich manuell bereinigt. Dazu wurden insbesondere RNA-binde Proteine, Transkriptionsfaktoren, Histone, Aktin, Hitzeschockproteine und ribosomale Proteine ausgeschlossen (siehe Abbildung S3).

Weiterhin wurden Proteine ausgeschlossen, die am photosynthetischen Elektronentransport sowie dem Calvin-Benson-Bassham (CBB)-Zyklus als Schlüsselenzyme beteiligt sind. Generell können bei dieser Art von Assay viele Hintergrundproteine detektiert werden (Rücksprache mit Dr. Frederik Sommer, TU Kaiserslautern; siehe auch Tadini et al., 2016). Im bereinigten Datensatz der Eluate konnten somit fünf Proteine identifiziert werden, die eine hohe Wahrscheinlichkeit besitzen, mit FAX1 zu interagieren (Tabelle 10). Dazu zählen VIPP1, OEP16.1, LPD2, SAMT1 und PMDH2. Zusätzlich dazu wurden die Datensätze der Banden 1 (Tabelle S2) und Banden 2 (Tabelle S3) vereint und ebenso manuell bereinigt (Tabelle 11). Hierbei konnten 35 Proteine als mögliche FAX1-Interaktionspartner identifiziert werden. Unter diesen konnten 14 Proteine gefunden werden, die Chloroplasten-Membranproteine/-Transporter darstellen oder ein funktioneller Zusammenhang mit dem Fettsäure-/Lipidmetabolismus sowie generell mit Lipidmembranen besteht (Tabelle 11, orange hervorgehoben).

**Tabelle 10: Bereinigter Datensatz des FAX1-GFP-pull downs aus den Eluaten.** Der *Arabidopsis Genome Identifier* (AGI)-Code, die Protein-ID (UniProt), die Beschreibung, Lokalisation, Anzahl an Transmembrandomänen (TMs) sowie das Molekulargewicht (MW) in kDa nach ARAMEMNON (Schwacke et al., 2003) sind dargestellt. Die Lokalisation basiert auf der *consensus prediction AramLocCon* nach Schwacke et al. (2007). In Klammern wird eine bereits experimentell bestimmte Lokalisation aufgeführt. Die Vorhersage der Transmembrandomänen wurde durch *ConPred\_v2* (Arai et al., 2004) bestimmt oder, falls nicht verfügbar, mit *AramTmMulticon* (Schwacke & Flüge, 2018). Es werden Proteine aufgeführt, die sowohl in Eluat 1 als auch in Eluat 2 gefunden wurden, abzüglich aller Proteine, die auch im Wildtyp Col-0 detektiert wurden. Der Datensatz wurde zusätzlich manuell bereinigt (siehe Text). FAX1 und GFP sind hervorgehoben. C: Chloroplast, ENV: *envelope* (Hüllmembran) IE: *inner envelope* (innere Hüllmembran), M: Mitochondrium, OE: *outer envelope* (äußere Hüllmembran), P: Peroxisom, STR: Stroma, THY: Thylakoide.

AGI-Code	Protein-ID	Beschreibung	Lokalisation	TM	MW [kDa]
At1g65260	A0A1P8ATS2;O80796	putative chloroplast membrane fusion chaperone (AtVIPP1/AtIM30/AtPTAC4)	C (THY, IE)	0	36,4
At2g28900	Q9ZV24	putative plastid outer envelope protein (AtOep16-1)	C (OE)	2	15,5
At3g57280	Q93V66	putative plastid fatty acid exporter (AtFAX1)	C (IE)	4	24,3
At4g16155	F4JLP5	plastidic dihydrolipoamide dehydrogenase (AtpLPD2)	M (C, STR)	0	67,1
At4g39460	Q94AG6	S-adenosylmethionine transporter (AtSAMC1/AtSAMT1)	C (ENV, M)	5	34,9
At5g09660	F4KDZ4;A8MRP1;A0A1P8BBQ0;B3H560;Q9ZP05	putative peroxisomal NAD-dependent malate dehydrogenase (AtpMDH2)	M (P)	1	37,4
-	CON__Q9U6Y5	GFP			

**Tabelle 11: Manuell bereinigter Datensatz mit Proteinen aus ausgeschnittenen Gel-Banden zweier unabhängiger FAX1-GFP-pull down-Assays.** Der *Arabidopsis Genome Identifier* (AGI)-Code, die Protein-ID (UniProt), die Beschreibung, Lokalisation, Anzahl an Transmembrandomänen (TMs) sowie das Molekulargewicht (MW) in kDa nach ARAMEMNON (Schwacke et al., 2003) sind dargestellt. Die Lokalisation basiert auf der *consensus prediction AramLocCon* nach Schwacke et al. (2007). In Klammern wird eine bereits experimentell bestimmte Lokalisation aufgeführt. Die Vorhersage der Transmembrandomänen wurde durch *ConPred\_v2* (Arai et al., 2004) bestimmt oder, falls nicht verfügbar, mit *AramTmMulticon* (Schwacke & Flügge, 2018). Es werden Proteine aufgeführt, die aus verschiedenen SDS-Gelbanden des ersten (B1; Tabelle S2) oder zweiten Versuchsansatzes (B2; Tabelle S3) ausgeschnitten und sequenziert wurden. Der Datensatz wurde zusätzlich manuell bereinigt (siehe Text). FAX1 und GFP sind hervorgehoben (grau) sowie Proteine, die interessante Kandidaten für eine Interaktion mit FAX1 darstellen (orange). C: Chloroplast, ENV: *envelope* (Hüllmembran) IE: *inner envelope* (innere Hüllmembran), M: Mitochondrium, N: Nukleus, OE: *outer envelope* (äußere Hüllmembran), P: Peroxisom, PM: Plasmamembran, SP: sekretorischer Weg, STR: Stroma, T: Tonoplast, THY: Thylakoide. \*Beschreibung nach TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>)

AGI-Code	Protein-ID	Beschreibung	Lokalisation	TM	MW [kDa]	Ansatz
At1g10180	Q9SY60	putative Exo84-like component of Exocyst complex (AtEXO84c)	N	0	86,7	B2
At1g12150	Q9FWW5	weak chloroplast movement under blue light protein (DUF827)*	C	0	62,7	B2
At1g24360	P33207	putative dual-localized ketoacyl-ACP reductase (AtKAR1)	C (C / M)	2	33,5	B2
At1g57570	F4I837	putative Jacalin-type lectin (AtJAL14)	M	0	68,9	B2
At1g63680	F4I3P9	putative UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase (AtMURE/AtPDE316)	C	1	85,6	B2
At1g65260	A0A1P8ATS2;O80796	putative chloroplast membrane fusion chaperone (AtVIPP1/AtIM30/AtPTAC4)	C (THY, IE)	0	36,4	B1+B2
At2g20890	Q9SKT0	chloroplast outer envelope membrane thylakoid formation protein (AtTHF1/AtPsb29)	C (STR, OE)	0	33,8	B2
At2g28900	Q9ZV24	putative plastid outer envelope protein (AtOep16-1)	C (OE)	2	15,5	B1+B2
At2g31660	F4IRR2	putative KAP/IMP-beta nucleocytoplasmic transport cargo receptor, ENHANCED MI-RNA ACTIVITY (AtSAD2/AtEMA1)	SP	0	119,3	B2
At2g31820	Q9SKB8	putative membrane protein of unknown function	N	4	73,1	B1
At3g01500	A0A1I9LQB3;A8MQY4;F4K875;F4K873;P42737;P27140	beta carbonic anhydrase (AtBCA1/AtCA1)	- (C)	0	29,5	B2
At3g02970	Q9M8T8	putative Phi-1-like protein of unknown function (AtEXL6)	SP/C	0	36,6	B1
At3g06510	Q93Y07	putative glycosyl hydrolase-like galactosyl transferase, SENSITIVE TO FREEZING (AtSFR2)	SP (OE)	2	70,8	B2

At3g14110	F4JFR2;F4JFR1;Q940U6	putative negative regulator of 5-aminolevulinic acid biosynthesis, FLUORESCENCE-IN-BLUE-LIGHT (AtFLU)	C	1	34,6	B2
At3g14590	A0A1I9LPP2;A0A1I9LPP1;Q67XP8;F4IW75;B3H411	putative (animal synaptotagmin)-like protein of unknown function (AtNTMC2T6.2)	M	0	78,1	B1+B2
At3g15351	F4IYP9;Q9LJR1	P53/DNA damage-regulated protein*	N	0	18,3	B1
At3g22942	Q93V47	putative G-gamma component of canonical heterotrimeric G-protein complex (AtAGG2)	N	0	11,1	B2
At3g53240	A0A1I9LLM1;F4J9A8	putative cell surface receptor (AtRLP45)	SP	1	100,6	B2
At3g57280	Q93V66	putative plastid fatty acid exporter (AtFAX1)	C (IE)	4	24,3	B1+B2
At3g62060	A0A1I9LQL7	putative pectin acetylesterase (AtPAE6)	SP	1	46,5	B1
At3g63410	Q9LY74	putative tocopherol/plastoquinone biosynthesis methyl-phytyl-hydroquinone/-solanyl-benzoquinone methyltransferase (AtVTE3/AtAPG1)	C (IE)	2	37,9	B2
At4g16155	F4JLP5;A8MS68	plastidic dihydrolipoamide dehydrogenase (AtptLPD2)	M/C (STR)	0	67,1	B2
At4g21534	F2Y4A3	putative sphingosine kinase (AtSPHK2)	SP (I)	0	53,9	B1
At4g22540	Q940Y1	putative oxysterol-binding protein (AtORP2A)	N (Zytosol / PM)	0	82	B2
At4g24860	A0A1P8B505;A0A1P8B504;A0A1P8B512;F4JRR2	putative AAA-type ATPase associated with unknown cellular activities	C/N	0	124,2	B1
At4g34900	A0A1P8B6H2;A0A1P8B6H0;F4JLI5;Q8GUQ8	xanthine dehydrogenase (AtXDH2)	-	1	148,8	B2
At5g09660	F4KDZ4;A8MRP1;A0A1P8BBQ0;B3H560;Q9ZP05	putative peroxisomal NAD-dependent malate dehydrogenase (AtpMDH2)	M (P)	1	37,4	B2
At5g12470	Q94CJ5	putative RETICULATA-RELATED protein of unknown function (AtRER4)	C (ENV)	4	41,3	B2
At5g17270	A0A1P8BER5;Q9FFI4	Protein prenyltransferase superfamily protein*	N	1	101	B2
At5g23060	A0A1P8BCX7;Q9FN48	putative calcium-sensing receptor (AtCaS/AtSTR3)	C (THY)	1	41,3	B1+B2
At5g24655	Q8L8S2	protein of unknown function, responsive to sulfur deficiency (AtLSU4)	-	0	10,6	B2
At5g50500	Q9FGP5	protein of unknown function	M/C/SP	0	15,9	B1
At5g57345	Q8LAD4	protein of unknown function, involved in abiotic stress tolerance (AtOxR)	C/M	2	20,2	B2
At5g59840	Q9FJF1;Q9SEH3;Q9FPJ4;P28188;Q9LZD4;P28186	putative RAB-E-class small GTPase (AtRAB-E1b/AtRAB8d)	SP	0	23,8	B2
-	CON__Q9U6Y5	GFP				B1+B2

Aus den Datensätzen der Eluate und den Banden konnten somit 15 Proteine eruiert werden, die eine hohe Wahrscheinlichkeit besitzen, mit FAX1 zu interagieren (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Mögliche Interaktionspartner von FAX1.** Der *Arabidopsis Genome Identifier* (AGI)-Code, der Proteinname, die entsprechende Abkürzung sowie die Lokalisation sind dargestellt. Die Lokalisation basiert entweder auf der *consensus prediction AramLocCon* nach Schwacke et al. (2007) oder wurde bereits experimentell bestimmt (unterstrichen; siehe Kapitel 4.1). C: Chloroplast, ENV: *envelope* (Hüllmembran), IE: *inner envelope* (innere Hüllmembran), M: Mitochondrium, N: Nukleus, OE: *outer envelope* (äußere Hüllmembran), P: Peroxisom, PM: Plasmamembran, SP: sekretorischer Weg, STR: Stroma, T: Tonoplast, THY: Thylakoide.

AGI-Code	Proteinname	Abkürzung	Lokalisation
At1g24360	ketoacyl-ACP reductase 1	KAR1	<u>C</u> / <u>M</u>
At1g65260	vesicle-inducing protein in plastid 1	VIPP1	C ( <u>THY</u> , <u>IE</u> )
At2g20890	thylakoid formation 1	THF1	C ( <u>STR</u> , <u>OE</u> )
At2g28900	outer envelope protein 16.1	OEP16.1	C ( <u>OE</u> )
At3g02970	EXORDIUM-like 6	EXL6	SP / C
At3g06510	SENSITIVE TO FREEZING 2	SFR2	C ( <u>OE</u> )
At3g14590	N-terminal-TM-C2 domain type 6 2	NTMC2T6.2	M
At4g16155	dihydrolipoyl dehydrogenase 2	LPD2	C ( <u>STR</u> )
At4g21534	sphingosine kinase	SPHK2	<u>I</u>
At4g22540	OSBP(oxysterol binding protein)-related protein 2A	ORP2A	<u>Zytosol</u> / <u>PM</u>
At4g39460	S-adenosylmethionine transporter	SAMT1	C ( <u>ENV</u> ) / <u>M</u>
At5g09660	peroxisomal malate dehydrogenase 2	PMDH2	<u>P</u>
At5g12470	RETICULATA-RELATED protein 4	RER4	C ( <u>ENV</u> )
At5g17270	prenyltransferase superfamily protein	-	N
At5g23060	calcium-sensing receptor	CAS	C ( <u>THY</u> )

### 3.3 Charakterisierung der ABCA9/FAX1-Überexpressionslinien in *Arabidopsis thaliana*

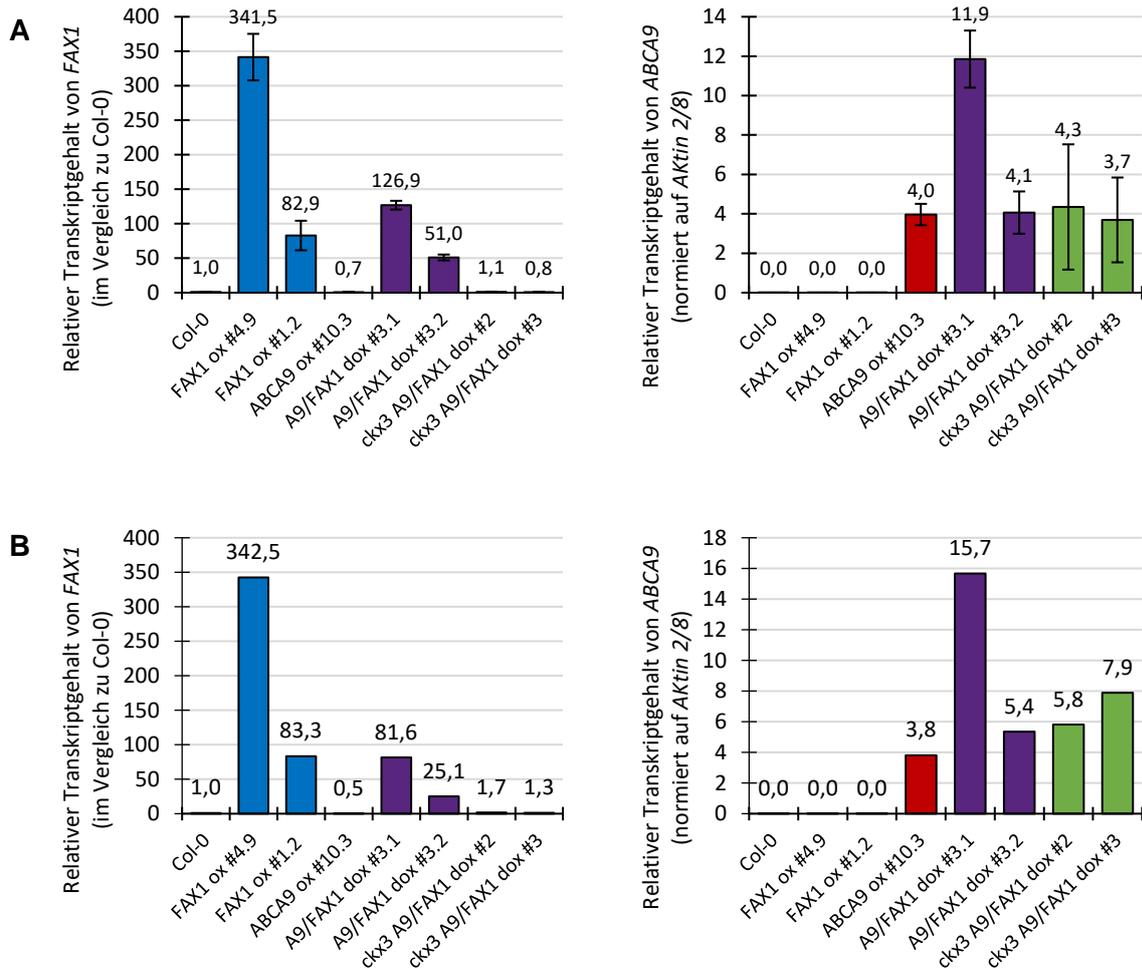
Um herauszufinden, ob die gleichzeitige Überexpression (ox) von *AtFAX1* und *AtABCA9*, welche jeweils den Fettsäureexport aus Plastiden und den Fettsäureimport ins endoplasmatische Retikulum (ER) vermitteln, zu einer Veränderung des Phänotyps sowie einer Steigerung des Ölgehalts in Samen führt, wurden Doppelüberexprimierer für *AtFAX1* und *AtABCA9* untersucht. Außerdem wurden Linien betrachtet, bei denen zusätzlich ein *knockout* des *CKX3*-Gens vorliegt, welches eine Cytokinin-Oxidase kodiert und zu mehr Samen führen sollte (Bartrina et al., 2011). Alle untersuchten Linien wurden im Vorfeld zu dieser Arbeit generiert und im Rahmen dieser Arbeit über mehrere Generationen selektiert, um homozygote Pflanzenlinien zu erhalten. Es wurden Pflanzen, die *AtFAX1* und *AtABCA9* gleichzeitig überexprimieren (A9/FAX1 dox #3.1, A9/FAX1 dox #3.2) sowie Linien, die eine

Überexpression von *AtFAX1* und *AtABCA9* in einer *ckx3 knockout* Mutanten aufweisen (*ckx3* A9/FAX1 dox #2, *ckx3* A9/FAX1 dox #3), auf Erde sowie auf Agar-Platten mit 1% Saccharose ausgesät und phänotypisiert. Zur Kontrolle wurden zwei unabhängige *AtFAX1*-Überexprimierer (*FAX1* ox #4.9, *FAX1* ox #1.2) und eine *AtABCA9* ox Linie (*ABCA9* ox #10.3) phänotypisiert. Da die Transkriptmenge der ausgewählten Gene ein entscheidender Faktor bei der Interpretation der Daten ist, wurde RNA von vier Wochen alten Pflanzen auf Erde und von 2,5 Wochen alten Pflanzen auf Agar-Platte isoliert. Es wurde eine qRT-PCR mit *AtFAX1*-, *AtABCA9*- sowie *Aktin2/8*-spezifischen Primern durchgeführt. Der *knockout* von *ckx3* wurde bereits von Bartrina et al. (2011) nachgewiesen.

Die Einzelüberexprimierer *FAX1* ox #4.9, *FAX1* ox #1.2 und *ABCA9* ox #10.3 wiesen sowohl nach vier Wochen Wachstum auf Erde als auch nach 2,5 Wochen Wachstum auf Agar ein ähnliches Transkriptlevel auf (Abbildung 9). Die *FAX1* ox #4.9 Linie hatte ein ~340fach und die *FAX1* ox #1.2 Linie ein ~85fach erhöhtes *FAX1*-Level im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle Col-0. *ABCA9*-RNA war in den *FAX1* ox Linien sowie in Col-0 nicht nachweisbar, da *ABCA9* im vegetativen Wachstumsstadium nicht exprimiert wird (Kim et al., 2013). Die *ABCA9* Einzelüberexpressionslinie #10.3 wies einen auf *Aktin2/8* normierten *ABCA9*-Transkriptgehalt von ~4 auf Erde und Agar auf. Die *FAX1*-Transkripte waren in dieser Linie leicht herunterreguliert. Im Vergleich zu Col-0 betrug die Transkriptmenge von *FAX1* in vier Wochen alten Pflanzen auf Erde 0,7fach und in 2,5 Wochen alten Pflanzen auf Agar 0,5fach.

Die Doppelüberexprimierer A9/*FAX1* dox #3.1 und A9/*FAX1* dox #3.2 unterschieden sich in ihrem Transkriptgehalt auf Erde und Agar. Die Linie A9/*FAX1* dox #3.1 wies ein ~127fach erhöhtes *FAX1*-Transkriptlevel auf Erde und ein ~82fach erhöhtes Level auf Agar auf. Die Linie A9/*FAX1* dox #3.2 war mit einem *FAX1*-Transkriptgehalt von 51fach auf Erde und ~25fach auf Agar der schwächere Überexprimierer. Der *ABCA9*-Transkriptgehalt war in der Linie A9/*FAX1* dox #3.1 von allen Linien am höchsten, mit ~12 auf Erde und ~16 auf Agar. In der Linie A9/*FAX1* dox #3.2 betrug das *ABCA9*-Transkriptlevel ~4 auf Erde und ~5 auf Agar. In den Doppelüberexprimierern konnte folglich eine Steigerung des Transkriptgehalts von *FAX1* sowie eine gleichzeitige Verminderung des *ABCA9*-Transkriptgehalts in vier Wochen alten Pflanzen auf Erde im Vergleich zu 2,5 Wochen alten Pflanzen auf Agar festgestellt werden.

Bei Betrachtung von *ckx3* A9/*FAX1* dox fiel auf, dass sowohl die Linie *ckx3* A9/*FAX1* dox #2 als auch *ckx3* A9/*FAX1* dox #3 keine *FAX1*-Überexpression mehr aufwiesen. Der relative *FAX1*-Transkriptgehalt der Linie *ckx3* A9/*FAX1* dox #2 betrug 1,1 auf Erde und 1,7 auf Agar. Die Linie *ckx3* A9/*FAX1* dox #3 wies einen *FAX1*-Transkriptgehalt von 0,8 auf Erde und 1,3 auf Agar auf.

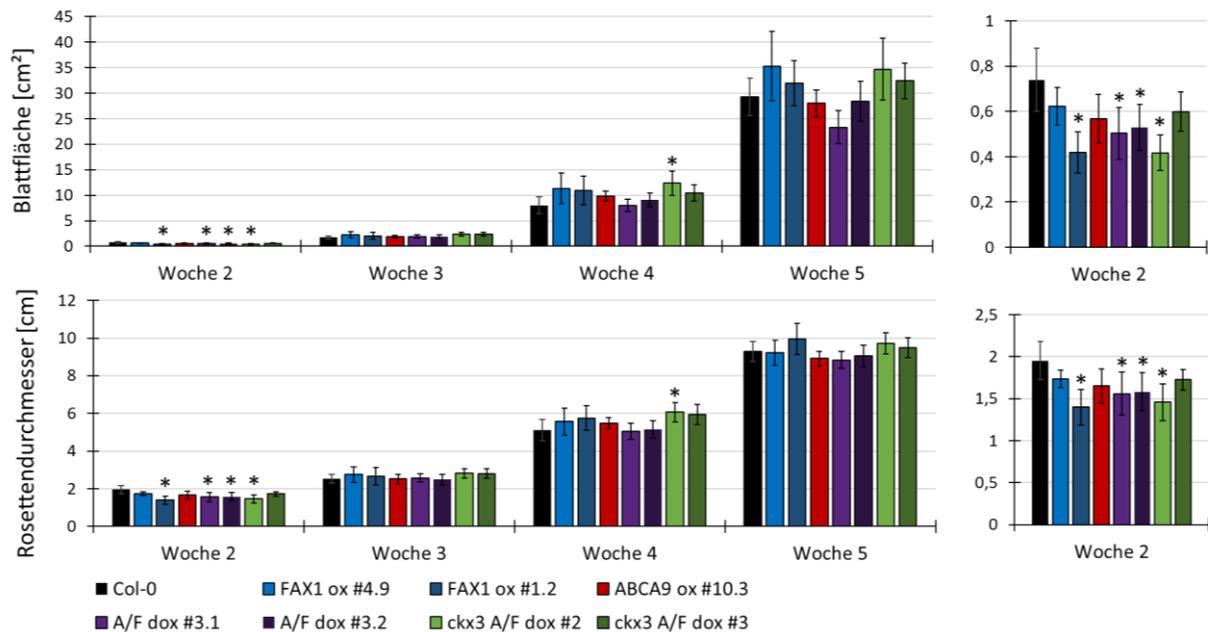


**Abbildung 9: Transkriptlevel von *AtFAX1* und *AtABCA9*.** Werte der Linien FAX1 ox #4.9, FAX1 ox #1.2, ABCA9 ox #10.3, A9/FAX1 dox #3.1, A9/FAX1 dox #3.2, *ckx3* A9/FAX1 dox #2 sowie *ckx3* A9/FAX1 dox #3 sind dargestellt. *AtFAX1* und *AtABCA9* wurden auf *Aktin2/8* normiert. *AtFAX1* wurde zusätzlich in Verhältnis zu Col-0 gesetzt. **(A)** Pflanzen wurden für vier Wochen unter Langtagbedingungen auf Erde angezogen. Für die Bestimmung der Transkriptgehalte wurden dreimal je 3 Pflanzen zu einem biologischen Replikat vereint. Von A9/FAX1 dox #3.1 wurden dreimal je 2 Pflanzen und von A9/FAX1 dox #3.2 zweimal je 3 Pflanzen und einmal 2 Pflanzen zu einem biologischen Replikat vereint. Dargestellt sind der Mittelwert sowie Standardabweichung. N = 3. **(B)** Pflanzen wurden für 2,5 Wochen auf Agar-Platten unter Langtagbedingungen angezogen. Zur Bestimmung der Transkriptmenge wurden 25 Pflanzen zu einem biologischen Replikat vereint. N = 1.

*ABCA9* war in den *ckx3* A9/FAX1 dox Linien überexprimiert, wies aber im Gegensatz zu den anderen Linien eine größere Standardabweichung auf. In der Linie *ckx3* A9/FAX1 dox #2 betrug der *ABCA9*-Transkriptgehalt auf Erde ~4 und auf Agar ~6. Die Linie *ckx3* A9/FAX1 dox #3 wies ebenfalls einen *ABCA9*-Transkriptgehalt von ~4 auf Erde auf. Der Transkriptgehalt auf Agar war mit ~8 ungefähr doppelt so groß. Trotz der fehlenden *FAX1*-Überexpression wurden die Daten der *ckx3* A9/FAX1 dox Linien mit in die Auswertung aufgenommen.

## Phänotypisierung von *Arabidopsis* in der vegetativen Wachstumsphase auf Erde

Zur Phänotypisierung auf Erde wurden im Zeitraum von zwei bis fünf Wochen Bilder der Pflanzen aufgenommen und mit dem Programm *Rosette Tracker* (de Vylder et al., 2012) ausgewertet. Es wurden die Blattfläche sowie der Rosettendurchmesser bestimmt. Nach zwei Wochen Wachstum gab es bereits in der Blattfläche sowie dem Durchmesser der Blattrosette Unterschiede (Abbildung 10).

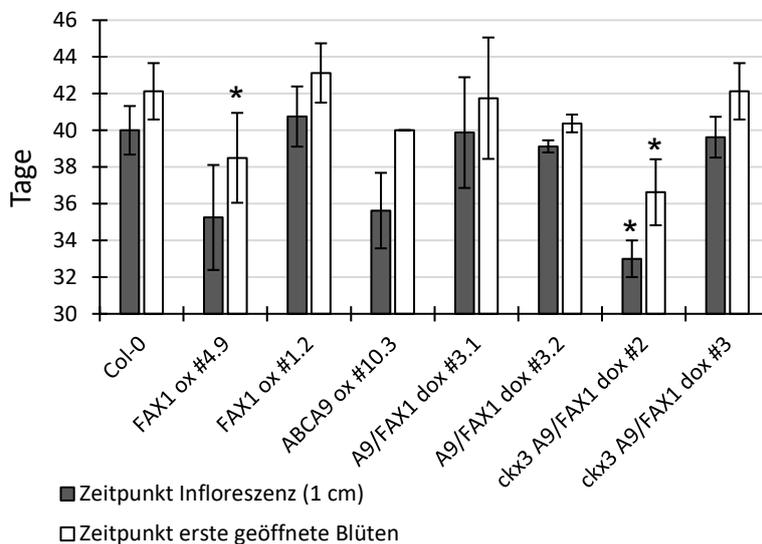


**Abbildung 10: Blattfläche und Rosettendurchmesser im zeitlichen Verlauf.** Gezeigt sind die Blattfläche sowie der Blattrosettendurchmesser von 2, 3, 4 und 5 Wochen alten Pflanzen der Linien FAX1 ox #4.9, FAX1 ox #1.2, ABCA9 ox #10.3, A9/FAX1 dox #3.1, A9/FAX1 dox #3.2, *cck3* A9/FAX1 dox #2 sowie *cck3* A9/FAX1 dox #3. Die Daten wurden mit dem Programm *Rosette Tracker* (de Vylder et al., 2012) ausgewertet. Woche 2 wird aufgrund der geringeren Werte zusätzlich separat dargestellt. „A/F“ entspricht A9/FAX1. Es sind Mittelwerte mit Standardabweichung von je acht einzeln angezogenen Pflanzen je Linie gezeigt. N = 8. Es wurde eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Tukey post-hoc Test durchgeführt, trotz der teilweisen Verletzung der Normalverteilungsannahme sowie der Varianzhomogenität. Es werden signifikante Unterschiede zu Col-0 angegeben. \*p < 0,05.

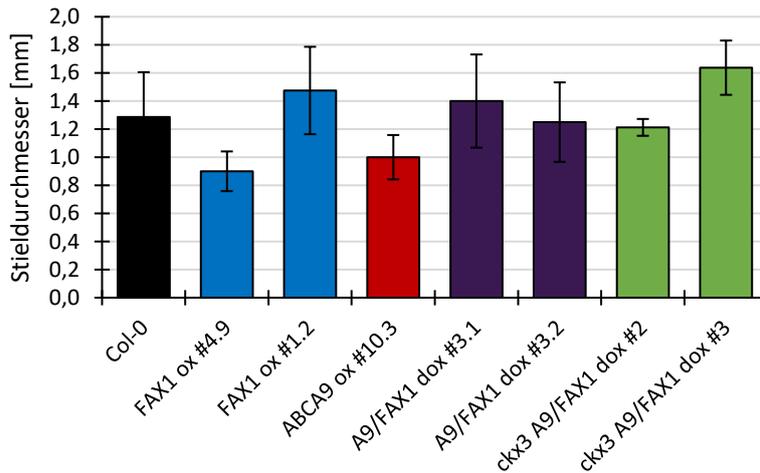
Alle Linien wiesen eine geringere Blattfläche im Vergleich zum Wildtyp Col-0 auf. Bei den Linien FAX1 ox #1.2, A9/FAX1 dox #3.1 und #3.2 sowie *cck3* A9/FAX1 dox #2 waren diese Unterschiede signifikant. Die stärkste Reduktion der Blattfläche zeigten FAX1 ox #1.2 und *cck3* A9/FAX1 dox #2 mit ~0,4 cm<sup>2</sup> im Vergleich zu Col-0 mit ~0,7 cm<sup>2</sup>. Im weiteren Verlauf der wöchentlichen Messungen fiel auf, dass alle Linien nach weiteren zwei Wochen den Wildtyp Col-0 in der Blattfläche eingeholt hatten und sogar höhere Werte aufwiesen. Bei *cck3* A9/FAX1 dox #2 ist dieser Wert mit ~12,4 cm<sup>2</sup> signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Col-0 mit ~8,1 cm<sup>2</sup>.

Bei Betrachtung des Rosettendurchmessers war ein der Blattfläche ähnliches Muster erkennbar. Auch hier wiesen alle Linien nach zwei Wochen Wachstum einen geringeren Durchmesser auf im Vergleich zu Col-0. Wieder waren diese Unterschiede bei FAX1 ox #1.2, A9/FAX1 dox #3.1 und #3.2 sowie *ckx3* A9/FAX1 dox #2 signifikant. Die größten Unterschiede im Rosettendurchmesser zeigten FAX1 ox #1.2 und *ckx3* A9/FAX1 dox #2 mit je ~1,4 und ~1,5 cm im Vergleich zu Col-0 mit ~2 cm. Bereits eine Woche später hatten alle Linien Col-0 wieder eingeholt. Eine weitere Woche später hatte die Linie *ckx3* A9/FAX1 dox #2 einen signifikant größeren Rosettendurchmesser mit ~6,1 cm im Vergleich zu Col-0 mit ~5,1 cm.

Weitere Parameter, die in dieser Studie dokumentiert wurden, sind die Anzahl an Tagen bis zur Bildung einer Infloreszenz von 1 cm und den ersten geöffneten Blüten (Abbildung 11) sowie der Stieldurchmesser der Primär-Infloreszenz (Abbildung 12).



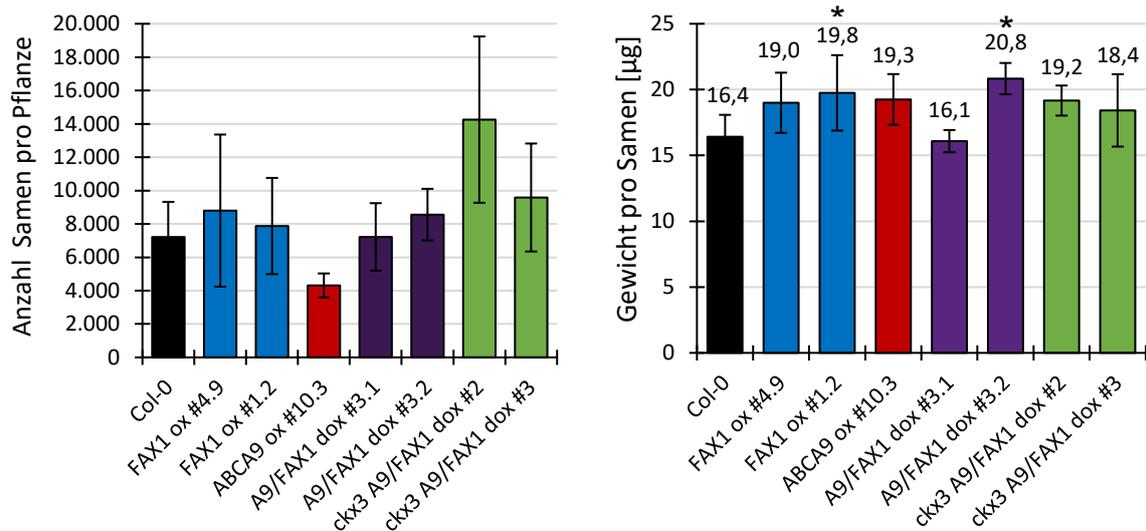
**Abbildung 11: Anzahl an Tagen bis zur Infloreszenz von 1 cm und bis zu den ersten geöffneten Blüten.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Linien FAX1 ox #4.9, FAX1 ox #1.2, ABCA9 ox #10.3, A9/FAX1 dox #3.1, A9/FAX1 dox #3.2, *ckx3* A9/FAX1 dox #2 sowie *ckx3* A9/FAX1 dox #3. Die Skala wurde angepasst und zeigt Werte ab 30 Tagen von je acht einzeln angezogenen Pflanzen je Linie. N = 8. Es wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Es werden signifikante Unterschiede zu Col-0 angegeben. \*p < 0,05.



**Abbildung 12: Stieldurchmesser der verschiedenen Pflanzenlinien.** Gezeigt ist der Stieldurchmesser der Primär-Infloreszenz auf Höhe von 8 cm bei einer Gesamtlänge der Infloreszenz von 15 cm der Linien FAX1 ox #4.9, FAX1 ox #1.2, ABCA9 ox #10.3, A9/FAX1 dox #3.1, A9/FAX1 dox #3.2, *cks3* A9/FAX1 dox #2 sowie *cks3* A9/FAX1 dox #3. Es sind Mittelwerte mit Standardabweichung von je acht einzeln angezogenen Pflanzen je Linie gezeigt. N = 8. Es wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zu Col-0 festgestellt werden.

Der Wildtyp Col-0 brauchte ca. 40 Tage bis die Infloreszenz eine Höhe von 1 cm erreicht hatte. Zwei Tage später ließen sich die ersten geöffneten Blüten erkennen. Signifikante Unterschiede gab es nur bei der Linie FAX1 ox #4.9 in Bezug auf den Zeitpunkt der ersten geöffneten Blüten und der Linie *cks3* A9/FAX1 dox #2 bei beiden Parametern. FAX1 ox #4.9 zeigte nach durchschnittlich 35 Tagen eine Infloreszenz von 1 cm und blühte ca. drei Tage später, nach insgesamt 38 Tagen. Im Vergleich zum Wildtyp Col-0 blühte die Linie FAX1 ox #4.9 ungefähr fünf Tage früher. Die Linie *cks3* A9/FAX1 dox #2 zeigte nach ca. 33 Tagen eine Infloreszenz von 1 cm und blühte ca. drei Tage später, nach insgesamt 36 Tagen. Im Vergleich zu Col-0 war der Zeitpunkt der Infloreszenz von 1 cm also sieben Tage früher und der Zeitpunkt der ersten geöffneten Blüten sechs Tage früher eingetreten. Die verbliebenen Linien zeigten ein ähnliches Muster zum Wildtyp Col-0. Der Stieldurchmesser der Primär-Infloreszenz unterschied sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Linien und im Vergleich zu Col-0.

Nach der Phänotypisierung der vegetativen Phase wurden nach Reifung der Samen das Samengewicht sowie die Anzahl an Samen pro Pflanze bestimmt (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Gesamtzahl der Samen pro Pflanze sowie Samengewicht.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Linien FAX1 ox #4.9, FAX1 ox #1.2, ABCA9 ox #10.3, A9/FAX1 dox #3.1, A9/FAX1 dox #3.2, *ckl3* A9/FAX1 dox #2 sowie *ckl3* A9/FAX1 dox #3. N = 8. Für die Anzahl der Samen pro Pflanze wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Für das Gewicht der Samen wurde eine einfaktorische ANOVA mit anschließendem Tukey post-hoc Test durchgeführt, trotz Verletzung der Normalverteilungsannahme. Es werden signifikante Unterschiede zu Col-0 angegeben. \* $p < 0,05$ .

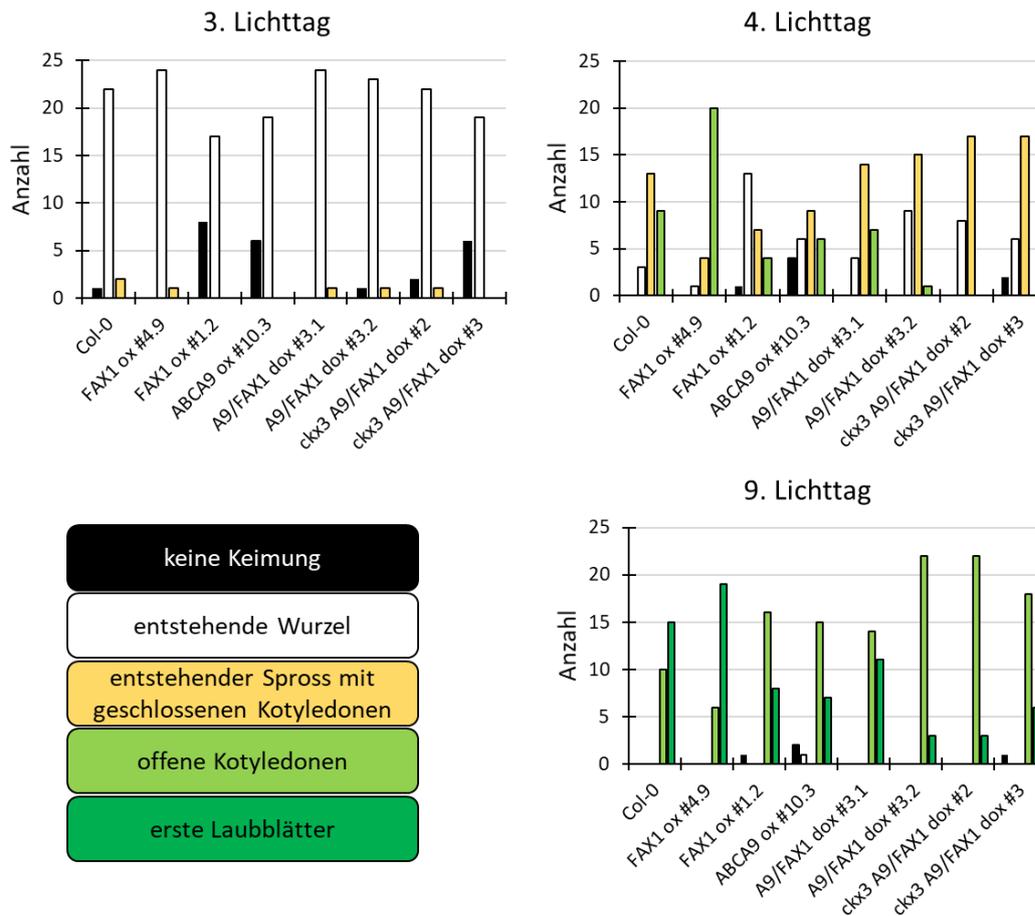
Bei der Messung der Anzahl an Samen konnten keine signifikanten Unterschiede zu Col-0 festgestellt werden. Dennoch ließ sich die Tendenz erkennen, dass die Linie ABCA9 ox #10.3 mit ~4.000 Samen weniger Samen bildete als der Wildtyp Col-0 mit ~7.000 Samen. Die Linie *ckl3* A9/FAX1 dox #2 bildete dagegen mit durchschnittlich ~14.000 Samen mehr Samen als die Kontrolle.

Das Samengewicht aller untersuchten Linien, bis auf Linie A9/FAX1 dox #3.1, lag über dem von Col-0 mit 16,4 µg. Die beiden FAX1 ox Linien wiesen Werte von 19,0 und 19,8 µg auf, wobei nur letzterer signifikant von Col-0 verschieden war. Die Linie ABCA9 ox #10.3 wies mit 19,3 µg Samengewicht einen ähnlichen Wert zu den FAX1 ox Linien auf. Die beiden Doppelüberexprimierer unterschieden sich stark voneinander. Die Linie A9/FAX1 dox #3.1 lag mit 16,1 µg Samengewicht leicht unter der Kontrolle Col-0, wohingegen die Linie A9/FAX1 dox #3.2 mit 20,8 µg den größten Wert aufwies, der sich signifikant von Col-0 unterschied. Die beiden *ckl3* A9/FAX1 Linien lagen mit Werten von 19,2 (*ckl3* A9/FAX1 dox #2) und 18,4 µg (*ckl3* A9/FAX1 dox #3) in einem Bereich mit schwach erhöhtem Samengewicht.

### Phänotypisierung des Keimlingswachstums sowie Samenkeimung von Arabidopsis auf Agar-Platten

Zur Phänotypisierung der verschiedenen Pflanzenlinien wurden zuvor alle Linien gleichzeitig angezogen und Samen geerntet. Um das Wachstum sowie Samenkeimung zu untersuchen, wurden jeweils 25 Samen pro Linie auf einer Platte ausgesät. Die Samen wurden einen Tag

stratifiziert und ab dem dritten Tag in Licht phänotypisiert. Die Pflanzen wurden täglich unter dem Binokular für insgesamt zwei Wochen betrachtet und in Kategorien eingeteilt. Es wurden fünf Kategorien definiert, um die Linien miteinander vergleichen zu können: keine Keimung, entstehende Wurzel, entstehender Spross mit geschlossenen Kotyledonen, offene Kotyledonen und erste Laubblätter. Da die verschiedenen Linien im Verlauf des Experiments phänotypisch sehr ähnlich waren, wurden drei Tage dargestellt, an denen die Unterschiede am größten waren (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Keimlingsentwicklung der Arabidopsis-Linien auf Agar-Platten.** Das Wachstum von je 25 Pflanzen der Linien FAX1 ox #4.9, FAX1 ox #1.2, ABCA9 ox #10.3, A9/FAX1 dox #3.1, A9/FAX1 dox #3.2, *ckx3* A9/FAX1 dox #2 sowie *ckx3* A9/FAX1 dox #3 wurde zwei Wochen auf Agar-Platten (mit 1% Saccharose) dokumentiert. Dargestellt sind die Ergebnisse des 3., 4., und 9. Lichttags. Es wurden folgende Kategorien definiert: keine Keimung, entstehende Wurzel, entstehender Spross mit geschlossenen Kotyledonen, offene Kotyledonen und erste Laubblätter.

Am 3. Lichttag waren fast alle Samen gekeimt und wiesen eine sichtbare Wurzel auf. Die Linien FAX1 ox #1.2, ABCA9 ox #10.3 sowie *ckx3* A9/FAX1 dox #3 besaßen mit je 8, 6 und nochmal 6 ungekeimten Samen die niedrigste Keimfähigkeit. Weitere Unterschiede wurden am 4. Lichttag bemerkbar. So hatten in der Linie FAX1 ox #4.9 bereits 20 von 25 Samen das

Stadium geöffneter Kotyledonen erreicht. Im Wildtyp Col-0, FAX1 ox #1.2, ABCA9 ox #10.3 und A9/FAX1 dox #3.1 waren es zwischen 4 und 9 Samen, die dieses Stadium erreicht hatten. In der Linie A9/FAX1 dox #3.2 sowie in beiden *ckx3* A9/FAX1 dox Linien konnten weniger als 2 Pflanzen mit geöffneten Kotyledonen identifiziert werden. Am 9. Lichttag waren weitere Unterschiede erkennbar. So gab es in den Linien Col-0 und FAX1 ox #4.9 bereits je 15 und 19 Pflanzen, die das Stadium mit ersten Laubblättern erreicht hatten. Darauf folgten die Linien FAX1 ox #1.2, ABCA9 ox #10.3, A9/FAX1 dox #3.1 und *ckx3* A9/FAX1 dox #3 mit 6 bis 11 Pflanzen in dieser Kategorie. Die langsamste Entwicklung zeigten die Linien A9/FAX1 dox #3.2 und die Linie *ckx3* A9/FAX1 dox #2 mit je 3 Pflanzen mit Laubblättern. Es ließ sich kein klarer Phänotyp spezifisch für eine Gruppe von Überexprimierern feststellen.

### 3.4 Charakterisierung der FAX-Proteine in *Chlamydomonas reinhardtii*

#### ***In silico* Untersuchungen der CrFAX-Proteine**

In Arabidopsis existieren sieben FAX-Proteine, die der Proteinfamilie Tmemb\_14 (Pfam: PF03647) sowie der Familie TRANSMEMBRANE PROTEIN 14, 15 (Panther: PTHR12668) angehören (siehe auch Bugaeva et al., 2021). In *Chlamydomonas reinhardtii* konnten über die PANTHER-Datenbank fünf Gene identifiziert werden, die der Familie TRANSMEMBRANE PROTEIN 14, 15 zugeordnet werden können: *Cre06.g254350*, *Cre08.g366000*, *Cre08.g383300*, *Cre09.g387838*, *Cre10.g421750*. Nur drei der fünf Proteine wiesen zusätzlich eine Tmemb\_14-Annotation auf. Dazu gehören *Cre08.g366000*, *Cre08.g383300* und *Cre09.g387838*. Zur Beschreibung der FAX-Proteinfamilie in *Chlamydomonas* wurde das Protein *Cre06.g254350* nicht mitaufgenommen, da es eine für FAX-Proteine untypische Länge von 365 Aminosäuren (längstes AtFAX-Protein ist das Präprotein von AtFAX2 mit 335 Aminosäuren), ein ungewöhnliches Hydrophobizitätsprofil (Abbildung S5) der vermeintlichen Tmemb\_14-Domäne und keine Tmemb\_14-Annotation nach Pfam aufweist. *Cre10.g421750* wurde trotz der fehlenden Tmemb\_14-Annotation nach Pfam bereits als FAX-Protein von Li et al. (2019) beschrieben und weist typische Charakteristika der FAX-Proteine auf (siehe folgender Abschnitt).

Von Li et al. (2019) wurden die Gene *Cre10.g421750* mit *CrFAX1* und *Cre08.g366000* mit *CrFAX2* bezeichnet. In dieser Studie wird im Folgenden der Name *Cre10.g421750* (CrFAX1) mit Cr-cFAX und *Cre08.g366000* (CrFAX2) mit Cr-erFAX ersetzt, um eine vermeintliche Assoziation von CrFAX2 mit AtFAX2 zu vermeiden und die subzelluläre Lokalisation der Proteine hervorzuheben (siehe Kapitel „Subzelluläre Lokalisation von cFAX und erFAX“). Zur Vereinfachung wird im folgenden Text weiterhin auf den Namenszusatz „Cr“ zur Kennzeichnung des Organismus *Chlamydomonas* verzichtet. In Tabelle 13 ist eine Übersicht der FAX-Proteine in *Chlamydomonas* dargestellt.

**Tabelle 13: FAX-Proteine in *Chlamydomonas reinhardtii*.** Dargestellt ist die Lokus-ID (Phytozome-Datenbank), Trivialnamen, die Protein-ID (UniProt), die Länge des Proteins in Aminosäuren, das Molekulargewicht in kDa und die Vorhersage der subzellulären Lokalisation nach TargetP 2.0 (Armenteros et al., 2019). In Klammern sind die Informationen der potenziellen maturen Proteine ergänzt. AS: Aminosäure, ER: Endoplasmatisches Retikulum, MW: *molecular weight* (Molekulargewicht), SP: *secretory pathway*. \*nach Li et al. (2019)

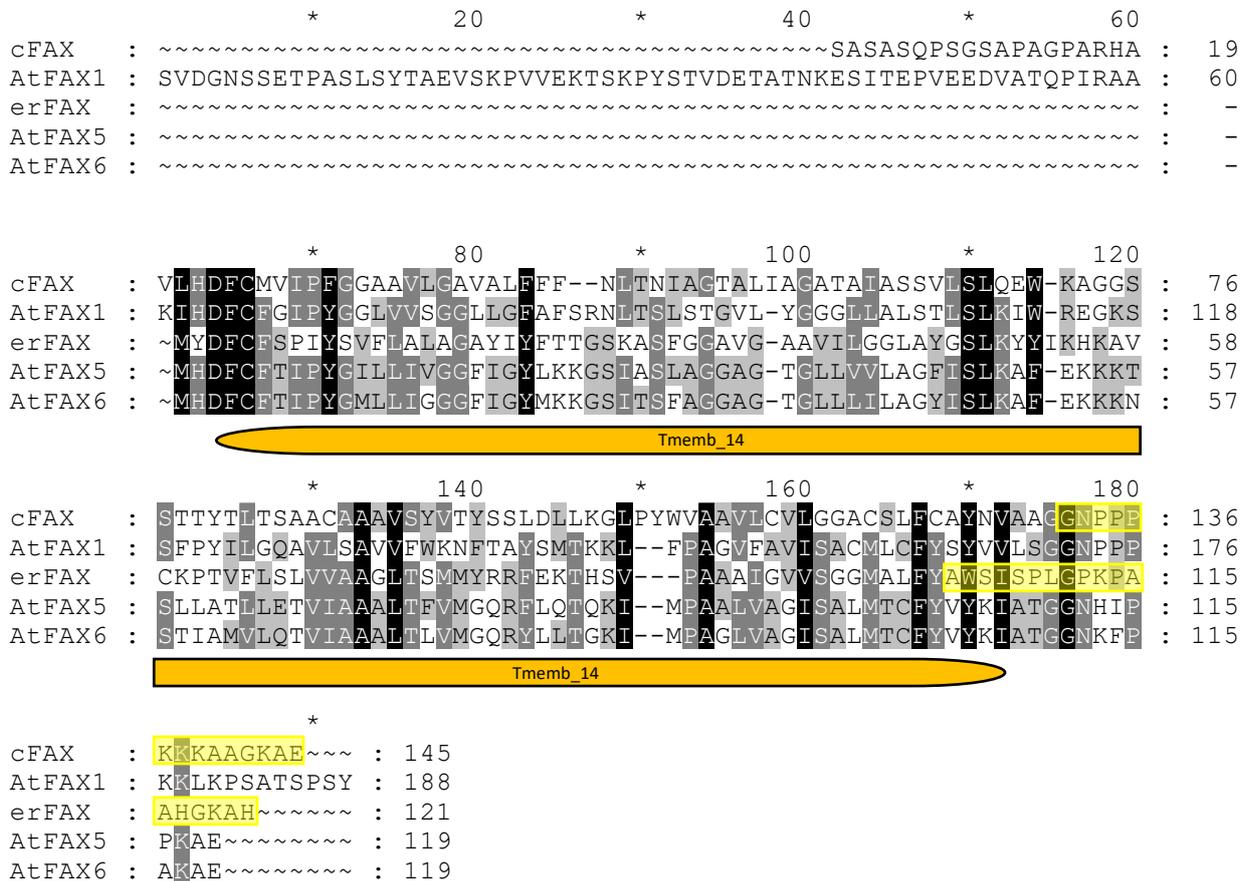
Lokus-ID	Trivialnamen	Protein-ID	Länge [AS]	MW [kDa]	Vorhergesagte Lokalisation
Cre08.g366000	Cr-erFAX (CrFAX2*)	A8J403	121 (92)	12,7 (9,5)	ER/SP
Cre08.g383300	-	A0A2K3DI83	208 (171)	19,7 (15,7)	Chloroplast
Cre09.g387838	-	A0A2K3DDV7	109	11,2	-
Cre10.g421750	Cr-cFAX (CrFAX1*)	A8ICM7	199 (145)	19,9 (14,3)	Chloroplast

Laut Vorhersagen der subzellulären Lokalisation (TargetP 2.0) befinden sich die Proteine Cre08.g383300 und cFAX im Chloroplasten und besitzen ein abspaltbares N-terminales Transitpeptid von 29 bzw. 37 Aminosäuren. Im Vergleich dazu soll erFAX mit 54%iger Wahrscheinlichkeit ein abspaltbares N-terminales Signalpeptid von 29 Aminosäuren aufweisen und im endoplasmatischen Retikulum (ER) und/oder sekretorischen Weg lokalisiert sein. Für das Protein Cre09.g387838 konnte keine Signalsequenz identifiziert und damit keine potenzielle Lokalisation bestimmt werden.

Um die Proteine in die pflanzliche FAX-Familie einordnen zu können, wurden Sequenzanalysen durchgeführt. Es wurden die maturen Proteinsequenzen von cFAX und Cre08.g383300 verwendet. Vom Protein erFAX wurde die Sequenz des möglichen Präproteins verwendet, da die Schnittstelle für die Abspaltung des potenziellen Signalpeptids in der Tmemb\_14-Domäne liegt. Beim Vergleich der Proteinsequenzen konnte herausgefunden werden, dass die Proteine cFAX und erFAX in eine Gruppe mit AtFAX1 sowie AtFAX5 und AtFAX6 eingeordnet werden können. Das Protein cFAX besitzt eine Sequenzähnlichkeit zu AtFAX1 von 37%, zu AtFAX5 von 40% und zu AtFAX6 von 36%. Demgegenüber besitzt erFAX eine Sequenzähnlichkeit zu AtFAX1 von 26%, zu AtFAX5 von 51% und zu AtFAX6 von 48%. AtFAX5 und AtFAX6 sind Isoformen mit einer Sequenzähnlichkeit von 90% und werden deshalb in dieser Studie auch als AtFAX5/6 abgekürzt. Allgemein besitzen FAX1- und FAX5/6-Proteine ein konserviertes Motiv am Beginn der Tmemb\_14-Domäne mit der Peptidsequenz „HDFCXXIPY/FG“ (Bugaeva et al., 2021). Dieses Sequenzmotiv lässt sich vollständig in cFAX wiederfinden, wohingegen in erFAX nur die Peptidabfolge „DFC“ mit dem Sequenzmotiv übereinstimmt (Abbildung 15). Ein FAX1-spezifisches Motiv ist „GGNPPPKK“ am C-Terminus des Proteins (Bugaeva et al., 2021). Dieses Motiv lässt sich auch in cFAX wiederfinden, in

erFAX jedoch nicht. Ein FAX5/6-spezifisches Motiv ist „KXE/D“ am C-Terminus. Dieses Motiv lässt sich in cFAX wiederfinden. In erFAX ist ein ähnliches Motiv, „KAH“, vorzufinden.

Aufgrund dieser Sequenzanalysen lässt sich cFAX eher der FAX1-Unterfamilie zuordnen, wohingegen erFAX aufgrund der geringen Größe, Sequenzähnlichkeit und vorhergesagter Lokalisation eher dem FAX5/6-Typ zuzuordnen ist.



**Abbildung 15: FAX1- und FAX5/6-Proteine in *Arabidopsis thaliana* und *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Die maturen AtFAX1- und cFAX-Sequenzen wurden nach der Vorhersage von TargetP 2.0 (Armenteros et al., 2019) ausgewählt. Die Tmemb\_14-Domäne ist als oranger Balken unter den Sequenzvergleichen dargestellt. Die Bindestelle des jeweiligen Peptid-Antikörpers für cFAX und erFAX ist gelb markiert. Verschiedene Graustufen geben Sequenzübereinstimmungen an (Schwarz: 100%; dunkelgrau: 80%; hellgrau: 60%, weiß: <60%).

Die beiden anderen FAX-Proteine in *Chlamydomonas*, Cre08.g383300 und Cre09.g387838, lassen sich in eine Gruppe mit AtFAX3 und AtFAX7 einordnen. So besitzt Cre08.g383300 eine Sequenzähnlichkeit zu AtFAX3 von 38% und zu AtFAX7 von 31%. Cre09.g387838 besitzt eine Sequenzähnlichkeit zu AtFAX3 von 28% und zu AtFAX7 von 47%. Es lassen sich einige FAX3- oder FAX7-spezifische Motive in den *Chlamydomonas*-Proteinsequenzen wiederfinden. So kann in Cre08.g383300 das FAX3-spezifische Motiv „KSL“ zu Beginn der zweiten Helix der Tmemb\_14-Domäne und in Cre09.g387838 das FAX3/FAX7-spezifische Motiv „MGY“ in der ersten Helix identifiziert werden (Bugaeva et al., 2021; Abbildung S6). Cre08.g383300 besitzt

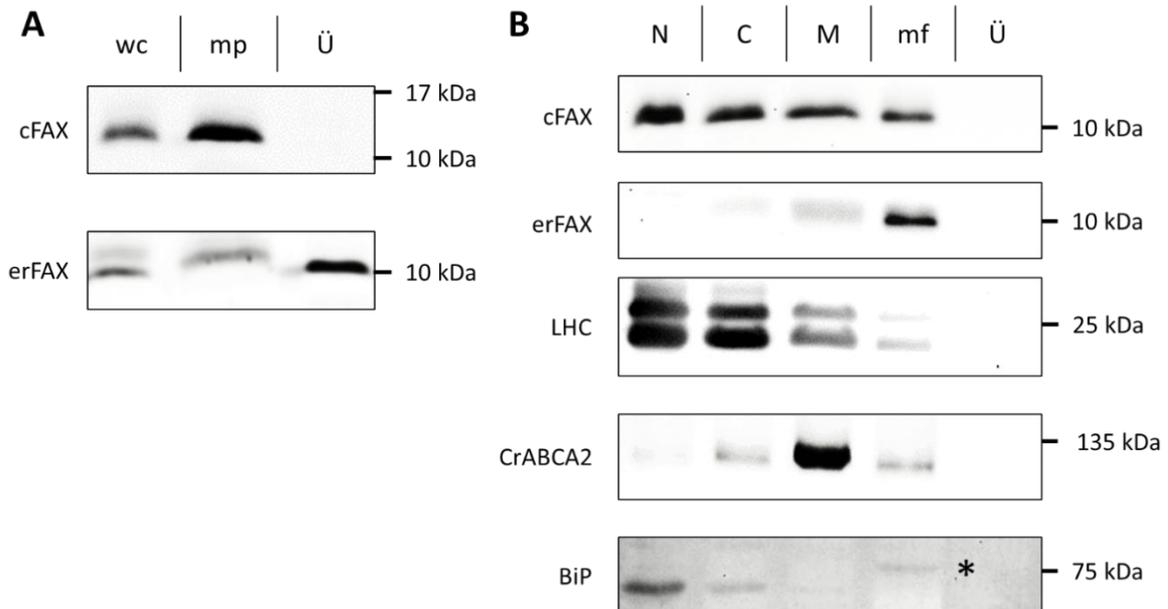
ebenfalls, wie auch FAX3, einen Poly-Glycin-Bereich am N-Terminus und wird im Chloroplasten vorhergesagt.

Basierend auf den Erkenntnissen der Sequenzanalysen und subzellulären Vorhersage, lässt sich Cre08.g383300 als ein FAX3-Protein einordnen. Aufgrund des fehlenden FAX3-spezifischen Poly-Glycin-Motivs und der unbestimmten Lokalisation, lässt sich Cre09.g387838 der Unterfamilie der FAX7-Proteine zuordnen. Da das Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung von cFAX und erFAX war, werden im Folgenden nur noch die Chlamydomonas-Proteine cFAX und erFAX näher betrachtet.

### **Subzelluläre Lokalisation von cFAX und erFAX**

Laut Vorhersage nach TargetP 2.0 befindet sich cFAX im Chloroplasten und kann aufgrund der Sequenzanalysen als orthologes Protein zu AtFAX1 betrachtet werden. FAX1 wurde bereits in der inneren Hüllmembran (*inner envelope*; IE) von Erbsenchloroplasten nachgewiesen (Li et al., 2015), sodass diese subzelluläre Lokalisation auch für cFAX vermutet wird. AtFAX5/6 sowie erFAX werden im ER bzw. sekretorischen Weg vorhergesagt (Li et al., 2015; Tabelle 13). Hinweise für eine Lokalisation von AtFAX5 und AtFAX6 im sekretorischen Weg konnte Könnel (2021) durch GFP-*targeting* Experimente liefern. Als zu AtFAX5/6 orthologes Protein wird erFAX daher ebenfalls im ER und/oder sekretorischen Weg vermutet.

Um die subzelluläre Lokalisation von cFAX und erFAX näher eingrenzen zu können, wurde in einem ersten Ansatz ein Protokoll zur Anreicherung von Membranproteinen aus Chlamydomonas-Zellen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit Gefrier-Auftau-Zyklen aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert. Mit spezifischen Antikörpern gegen cFAX und erFAX konnten Immunoblot-Analysen durchgeführt werden. Es wurden Proteine der gesamten Zelle, aus pelletierten Membranen und dem Überstand in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt. Das Protein cFAX konnte hier zwischen 10 und 17 kDa detektiert werden (Abbildung 16A), was mit dem berechneten Molekulargewicht von 14,3 kDa des maturen Proteins (Tabelle 13) übereinstimmt. Bei Betrachtung des Western Blots der einzelnen Fraktionen konnte cFAX in der Fraktion aus der gesamten Zelle schwach und in den Membranproteinen stärker detektiert werden. Im Überstand konnte kein cFAX-Signal nachgewiesen werden. Das erFAX-Protein konnte knapp über 10 kDa detektiert werden. Dies entspricht ungefähr den Größen für das potenzielle Präprotein von 12,7 kDa und dem möglichen maturen Protein von 9,5 kDa (Tabelle 13). Das Protein konnte in der gesamten Zelle, schwach in den Membranproteinen und stark im Überstand detektiert werden.



**Abbildung 16: Nachweis und subzelluläre Lokalisation von cFAX und erFAX durch Western Blot-Analysen. (A)** Zur Anreicherung von Membranproteinen wurden Chlamydomonas-Zellen mit vier Gefrier-Auftau-Zyklen aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert. Aufgetragen wurden je 10 µg der Proteine aus der gesamten Zelle (*whole cell*, wc), Membranproteine (mp) und Proteine des Überstandes (Ü). **(B)** Fraktionierung von Chlamydomonas-Zellkompartimenten durch differentielle Zentrifugation. Aufgetragen wurden je 20 µg Proteine der Fraktionen Nucleus (N), Chloroplasten (C), Mitochondrien (M), mikrosomale Fraktion (mf) und Überstand (Ü). Antikörper gegen *light harvesting complex* (LHC)-Proteine wurden als Chloroplasten-Kontrolle verwendet. Antikörper gegen CrABCA2 und BiP (*binding immunoglobulin protein*) wurden als ER-Kontrolle verwendet. Der Asterisk markiert ein schwaches BiP-Signal auf der richtigen Höhe. Es wurden spezifische Antikörper gegen cFAX oder erFAX verwendet. Die Zahlen geben das Molekulargewicht der Proteine in kDa an.

Um eine feinere Auftrennung verschiedener Zellkompartimente zu erreichen, wurde ein Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung umgesetzt. Durch differentielle Zentrifugation wurde versucht, die Fraktionen Nucleus, Chloroplasten, Mitochondrien, mikrosomale Fraktion und lösliche Proteine im Überstand zu erhalten. Mit Ausnahme des Überstandes wiesen alle Fraktionen eine grüne Farbe auf, deren Intensität mit steigender Zentrifugalkraft abnahm.

Das cFAX-Protein konnte in allen Fraktionen, bis auf den Überstand, mit einer Größe von etwas über 10 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 16B). Das schwächste sichtbare Signal zeigte sich in der mikrosomalen Fraktion. Anders verhielt sich erFAX. Dieses Protein zeigte ein starkes Signal bei 10 kDa in der mikrosomalen Fraktion und ein sehr schwaches Signal in den Mitochondrien. Als Kontrolle für Chloroplastenproteine wurde ein Antiserum gegen LHC (*light harvesting complex*)-Proteine verwendet. Hier zeigte sich, dass die Intensität der Banden bei ~22 und ~26 kDa vom Nucleus bis zur mikrosomalen Fraktion stetig abnahm und keine Banden im Überstand nachweisbar waren. Als ER-Kontrolle wurde ein Antiserum gegen den ABC-Transporter CrABCA2 verwendet, der ortholog zu AtABCA9 in Arabidopsis ist. Hier konnte auf Höhe von ~130 kDa eine starke Bande in der Mitochondrienfraktion, und je eine

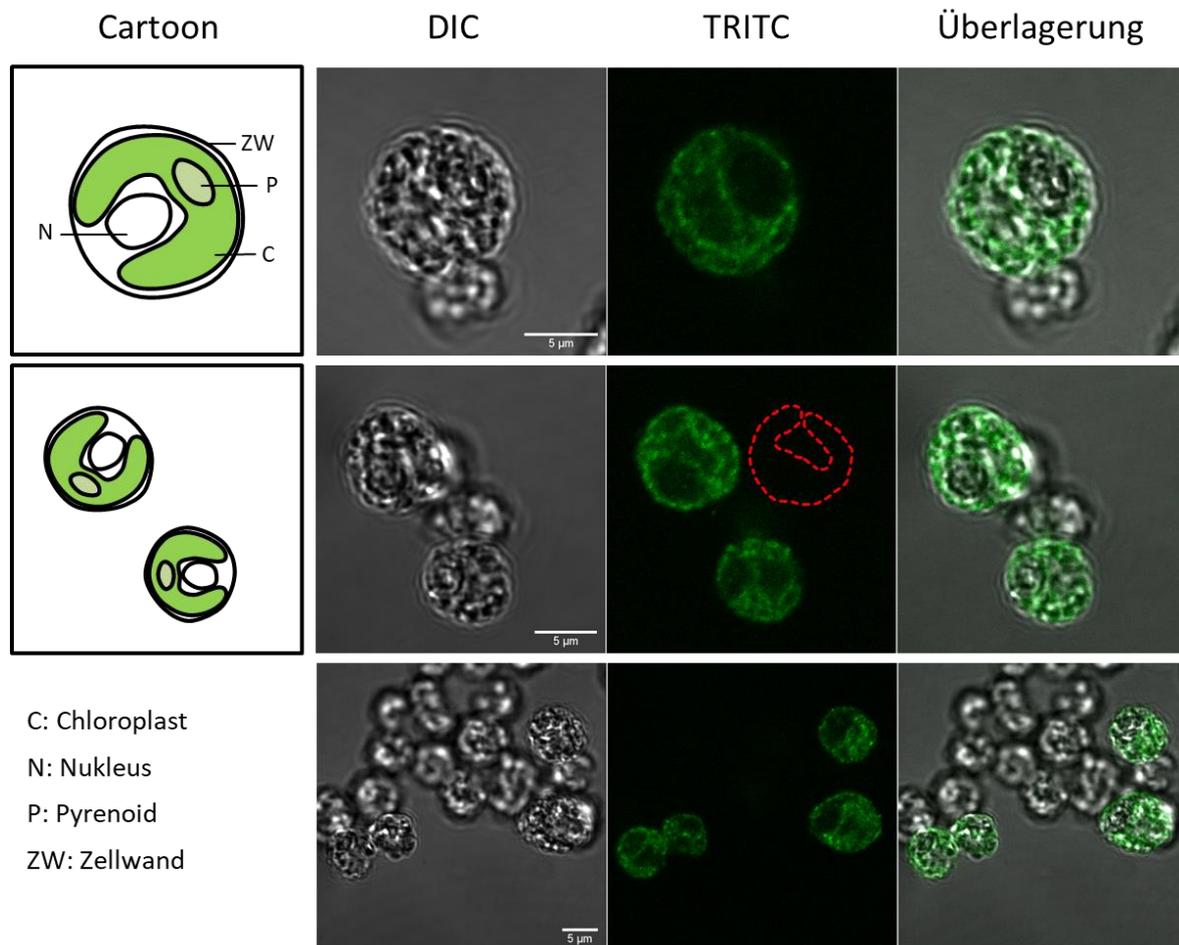
schwache Bande in Chloroplasten und der mikrosomalen Fraktion detektiert werden. Zusätzlich wurde als ER-Kontrolle ein Antiserum gegen das lumenale Protein BiP (*binding immunoglobulin protein*) verwendet. Hier konnte nur eine sehr schwache Bande auf der richtigen Höhe von ca. 75 kDa in der mikrosomalen Fraktion detektiert werden. Eine vermeintliche Hintergrundbande auf Höhe von ~70 kDa konnte im Nukleus und schwach im Chloroplasten detektiert werden. Darüber hinaus wurden die Hefe-spezifischen Antikörper ScBiP, ScPDI, ScSec61 $\alpha$  und ScSec61 $\alpha$  getestet, die gegen verschiedene ER-Proteine gerichtet sind. Mit keinem der Antiseren konnten Proteine in *Chlamydomonas* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um das vorhergesagte, N-terminale Chloroplasten-Transitpeptid von cFAX näher zu bestimmen, wurde eine Bande auf Höhe der cFAX-Bande des Western Blots aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten. Als Probe wurde die Membranproteinfraction (siehe Abbildung 16A) verwendet. Die ausgeschnittene Bande wurde per Massenspektrometrie an der TU Kaiserslautern (AG Schroda) durch Dr. Frederik Sommer sequenziert. Dazu wurde ein In-Gel-Verdau mit Trypsin als Protease durchgeführt und die Peptide gemessen. Als N-terminalstes Fragment von cFAX konnte das Peptid „SASASQPSGSAPAGPAR“ detektiert werden (Abbildung S7). Da Trypsin spezifisch nach den Aminosäuren Lysin und Arginin schneidet und im Präprotein cFAX keine dieser Aminosäuren unmittelbar vor der detektierten Peptidsequenz auftritt, kann mit einiger Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass das gemessene Peptid den N-Terminus der maturen cFAX-Proteinsequenz darstellt. Dies entspricht exakt der Vorhersage für cFAX durch TargetP 2.0 (Abbildung 15 und Abbildung S7). Zusätzlich dazu wurde auch eine entsprechende AtFAX1-Bande aus Arabidopsis-Chloroplasten sequenziert. Als N-terminalstes Fragment von AtFAX1 konnte das Peptid „SVDGNSSETPASLSYTAEVSKPVVEK“ detektiert werden (Abbildung S7). Dies entspricht exakt der vorhergesagten Schnittstelle für eine stromale Peptidase im AtFAX1-Präprotein durch TargetP 2.0 (Abbildung 15). Da Lysin als letzte Aminosäure in der Sequenz des vorhergesagten Chloroplasten-Transitpeptids und direkt damit N-terminal vor dem sequenzierten Peptidfragment auftritt, kann nicht mit Sicherheit die Richtigkeit der Vorhersage aus diesem Experiment geschlossen werden.

Um die Lokalisation der beiden CrFAX-Proteine mit einer weiteren Methode nachzuweisen, wurde ein Protokoll zur Immunofluoreszenz durchgeführt. Dabei wurden *Chlamydomonas*-Zellen mit den spezifischen cFAX- oder erFAX-Antikörpern behandelt und anschließend mit einem sekundären Antikörper, gekoppelt an einen Fluorophor, inkubiert. Durch diesen Versuchsansatz kann unter Zuhilfenahme eines Laser-Scanning-Mikroskops die Lokalisation des Proteins in der Zelle bestimmt werden. Als Negativkontrolle wurde ein HA-Antikörper verwendet, um eine mögliche Hintergrundfluoreszenz aufgrund unspezifischer Bindungen

aufzuzeigen. Es konnte eine schwache uniforme Hintergrundfluoreszenz in der gesamten Chlamydomonas-Zelle detektiert werden (Abbildung S8).

Bei Betrachtung der Immunfluoreszenz-Aufnahmen nach Inkubation mit dem cFAX-Antiserum ließ sich ein distinktes Fluoreszenzsignal erkennen, welches sich klar von der Hintergrundfluoreszenz abhob (Abbildung 17). Die Fluoreszenzsignale ließen sich um den Chloroplasten erkennen. In einigen Chlamydomonas-Zellen waren die Loben des Chloroplasten deutlich zu erkennen (Abbildung 17, Mitte).

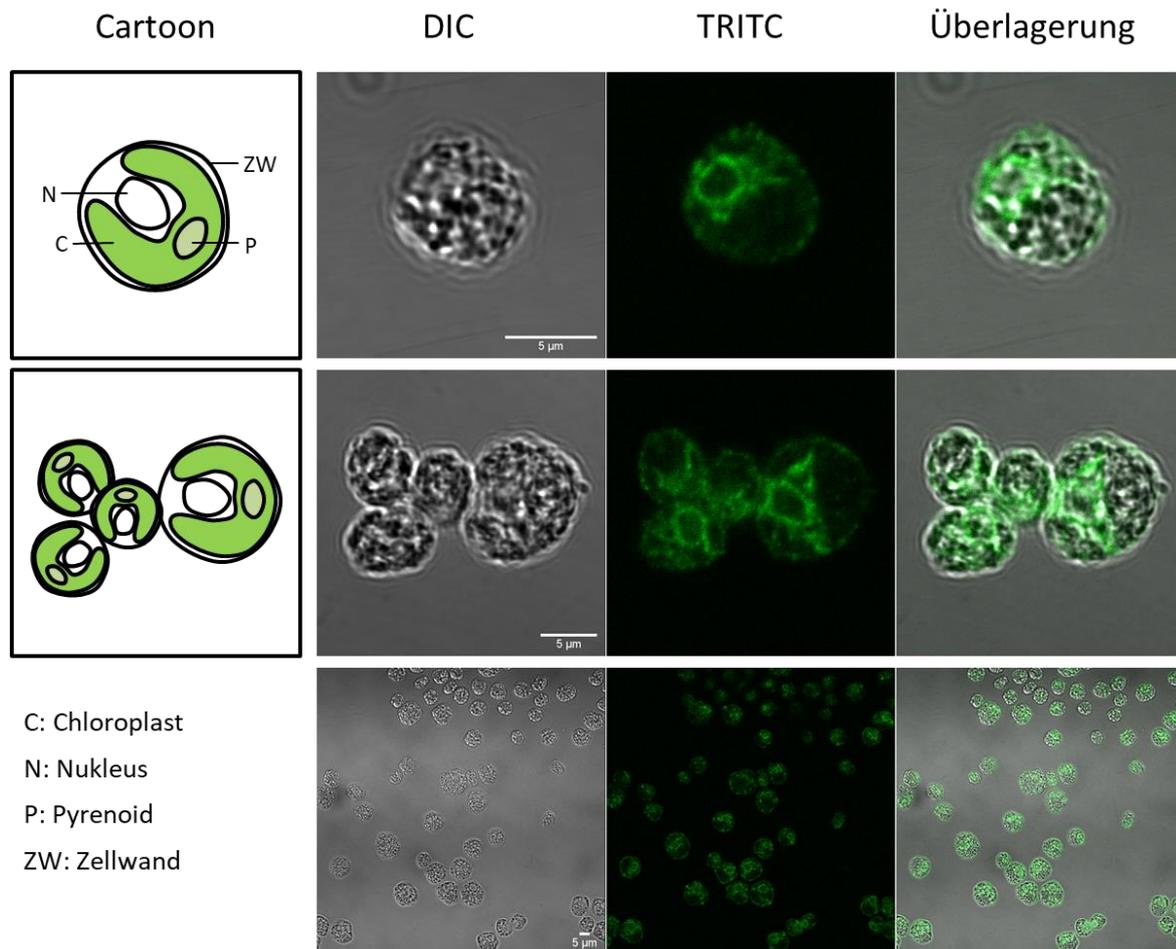


**Abbildung 17: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von cFAX.** Chlamydomonas-Zellen wurden auf einem Objektträger fixiert und mit cFAX-Antikörpern behandelt. Als Fluorophor des sekundären Antikörpers wurde TRITC (Tetramethylrhodamine-isothiocyanate) gewählt. Dargestellt sind eine DIC (*differential interference contrast*)-Aufnahme, TRITC-Fluoreszenz sowie eine Überlagerung beider Bilder. Ein Cartoon ist zur Verdeutlichung der Orientierung der Chlamydomonas-Zellen dargestellt. Zusätzlich ist in der mittleren Fluoreszenzaufnahme eine rote Umrandung der nebenstehenden Chlamydomonas-Zelle zu sehen, um die Sichtbarkeit der beiden Loben des Chloroplasten zu verdeutlichen. Der Maßstab entspricht 5 µm. Die Fluoreszenz wurde bei 561 nm angeregt und die Emission von 565 bis 583 nm aufgenommen (Laser-Scanning-Mikroskop: LEICA LSM480).

Durch die Vorbehandlung der Proben mit Methanol (siehe Kapitel 2.16) hatten sich die Zellen etwas zusammengezogen, sodass die Loben des Chloroplasten häufig überlappen. Aufgrund

der Verteilung des Fluoreszenzsignals und im Vergleich mit der entsprechenden Literatur (Mackinder et al., 2017; Nguyen et al., 2013; siehe Diskussion) lässt sich cFAX in der Chloroplasten-Hüllmembran lokalisieren.

Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen von erFAX zeigten ein anderes Bild auf. Hier ließ sich ein klares Signal um den Nukleus sowie Ausstülpungen daraus feststellen (Abbildung 18). Aufgrund dieser Verteilung des Fluoreszenzsignals lässt sich erFAX im ER/Nukleus und/oder Membranen des sekretorischen Wegs lokalisieren.



**Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von erFAX.** Chlamydomonas-Zellen wurden auf einem Objektträger fixiert und mit erFAX-Antikörpern behandelt. Als Fluorophor des sekundären Antikörpers wurde TRITC (Tetramethylrhodamine-isothiocyanate) gewählt. Dargestellt sind eine DIC (*differential interference contrast*)-Aufnahme, TRITC-Fluoreszenz sowie eine Überlagerung beider Bilder. Ein Cartoon ist zur Verdeutlichung der Orientierung der Chlamydomonas-Zellen dargestellt. Der Maßstab entspricht 5 µm. Die Fluoreszenz wurde bei 561 nm angeregt und die Emission von 565 bis 583 nm aufgenommen (Laser-Scanning-Mikroskop: LEICA LSM480).

Zusätzlich wurde erFAX auch mit einem C-terminalen HA-Tag exprimiert und eine Immunfluoreszenz mit HA-Antikörpern durchgeführt. Es konnten vesikelförmige Signale um den Nukleus detektiert werden (Abbildung S9).

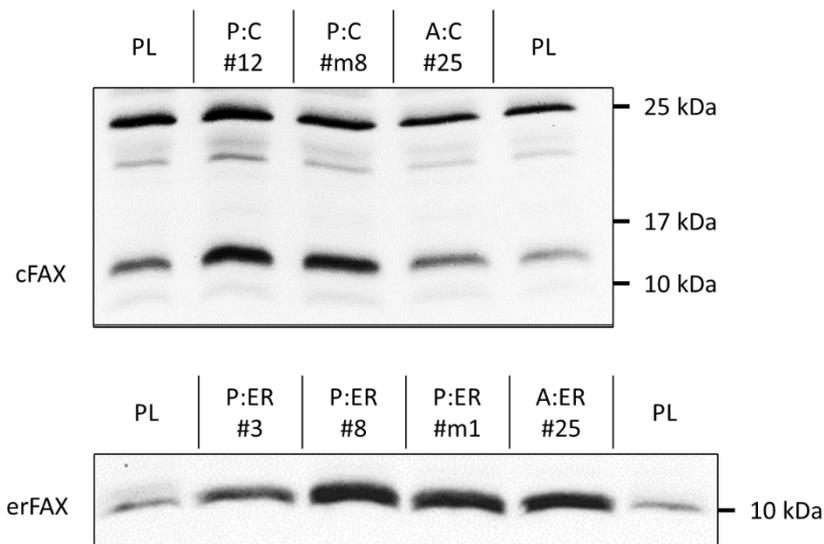
Als Kontrollen für das Erscheinungsbild von ER und Chloroplasten in *Chlamydomonas* wurden mVenus-Genkonstrukte generiert, die Signalsequenzen zur Lokalisation in das entsprechende Organell aufwiesen. Das Protein mVenus stellt eine gelb fluoreszierende Variante von GFP dar. *Chlamydomonas* wurde mit diesen Genkonstrukten (siehe Abbildung 3) transformiert und die Fluoreszenz von mVenus sowie Chlorophyll unter einem Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet. Das mVenus-Protein, welches in das ER lokalisiert werden sollte, zeigte ein für ER typisches Muster um den Nukleus sowie Ausstülpungen ins Zytoplasma (Abbildung S10). Eine teilweise netzartige Struktur war erkennbar. Das Chloroplasten-lokalisierte mVenus wies eine schwache Fluoreszenz im Chloroplasten auf (Abbildung S11). In der nicht-transformierten Kontrolle konnte nur ein schwaches Hintergrundsignal detektiert werden (Abbildung S12).

### **Überexpression und *knockdown* von FAX-Proteinen in *Chlamydomonas***

Um die Funktion von cFAX und erFAX näher untersuchen zu können, wurden Überexpressionslinien der jeweiligen Proteine generiert. Dabei wurde das native Gen entweder hinter den *PSAD*-Promotor (Fischer & Rochaix, 2001) oder den *AR*-Hybrid-Promotor (*HSP70A-RBCS2*; Schroda et al., 2000) geschaltet und *Chlamydomonas*-Zellen mit dem Genkonstrukt transformiert. Die Auswahl geeigneter transformierter Linien wurde durch Proteinextraktion und anschließendem Western Blot getroffen, um Überexpressionslinien zu identifizieren. Insgesamt wurden pro Gen ca. 80 Transformanten (40 pro Promotor) getestet. Generell konnte festgestellt werden, dass Transformanten mit dem *PSAD*-Promotor häufiger eine stärkere Überexpression aufwiesen als solche mit dem *AR*-Promotor. Eine Überexpression von cFAX trat insgesamt seltener und in geringerer Intensität auf als von erFAX. In Abbildung 19 sind die drei stärksten Überexpressionslinien für cFAX und die vier stärksten für erFAX dargestellt.

Als starke cFAX-Überexpressionslinien konnten P:C\_#12 und P:C\_#m8 identifiziert werden. „P“ steht hierbei für den verwendeten *PSAD*-Promotor. Hier konnten im Vergleich zur Elternlinie intensivere Banden auf Höhe von ~14 kDa detektiert werden. Zum besseren Vergleich der cFAX-Intensitäten wurde eine Hintergrundbande auf Höhe von 25 kDa unbekanntem Ursprungs ebenfalls gezeigt. Die Intensität dieser Bande scheint nicht abhängig von der cFAX-Expression zu sein, was im Laufe der Experimente zur Überexpression und zum *knockdown* von cFAX ersichtlich wurde. Diese Bande kann daher als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinmengen angesehen werden. Die Linie A:C\_#25 zeigte ein der Elternlinie ähnliches oder nur schwach erhöhtes cFAX-Proteinlevel. „A“ steht hierbei für den verwendeten *AR*-Hybrid-Promotor. Für das Protein erFAX konnten P:ER\_#8, P:ER\_#m1 und A:ER\_#25 als starke Überexprimierer identifiziert werden. P:ER\_#3 zeigte im Vergleich dazu eine schwächere Überexpression. Alle erFAX-Überexpressionslinien zeigten eine deutlich intensivere Bande auf Höhe von 10 kDa im Vergleich zur Elternlinie. Der Nachweis von

Überexpressionslinien zeigt jeweils die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen cFAX und erFAX auf.



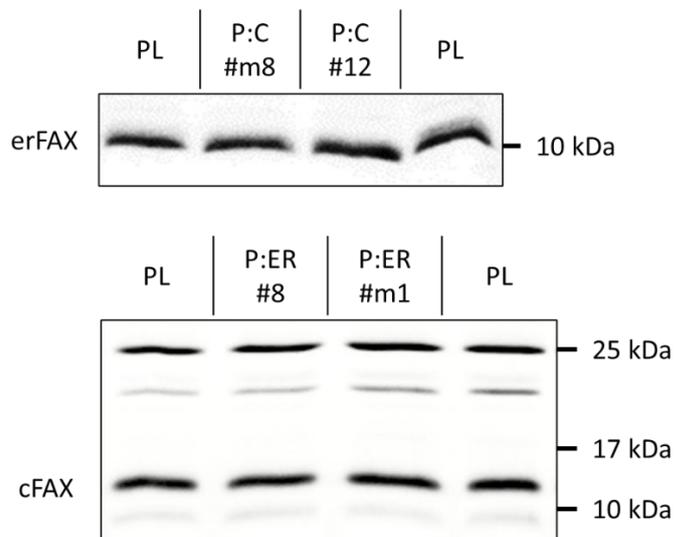
**Abbildung 19: Überexpression von cFAX und erFAX in Chlamydomonas.** Dargestellt sind Western Blots ausgewählter Überexpressionslinien sowie der Elternlinie (PL, *parental line*) UVM4. Es wurden Proteine nach einer Extraktion aus der gesamten Zelle entsprechend 2 µg Chlorophyll verwendet. Als cFAX-Überexpressionslinien wurden P:C\_#12, P:C\_#m8 sowie A:C\_#25 aufgetragen. Als erFAX-Überexpressionslinien wurden P:ER\_#3, P:ER\_#8, P:ER\_#m1 und A:ER\_#25 aufgetragen. „A“ und „P“ stehen für den jeweiligen Promotor (*AR* oder *PSAD*). „C“ und „ER“ geben cFAX oder erFAX an. Ein zusätzliches „m“ gibt eine Linie eines unabhängigen Transformationsansatzes an. cFAX sowie erFAX wurden jeweils mit spezifischen Antikörpern via Chemilumineszenz detektiert. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Zusätzlich wurden induzierbare Mutanten für cFAX generiert, da bei einem ersten Screen keine cFAX-Überexpression nachgewiesen wurde und eine toxische Wirkung einer cFAX-Überexpression nicht ausgeschlossen werden konnte. Als induzierbarer Promotor wurde der *NIT1*-Promotor (Fernandez et al., 1989; Loppes et al., 1999) gewählt, der durch einen Wechsel der Stickstoffquelle im Medium von Ammonium zu Nitrat aktiviert wird. Es konnten drei Linien identifiziert werden, die nach Induktion einen höheren cFAX-Proteinlevel aufwiesen (Abbildung S13). Da im Verlauf der Arbeit konstitutive cFAX-Überexpressionslinien identifiziert werden konnten (siehe Abbildung 19), wurden keine weiteren Versuche mit den induzierbaren Linien durchgeführt.

Für alle weiteren Versuche wurden die cFAX-Überexpressionslinien P:C\_#12 und P:C\_#m8 verwendet, da diese die stärkste Überexpression aufwiesen. Mit Hilfe einer Eichgerade konnte die Proteinmenge von cFAX für P:C\_#12 auf 1,79fach ( $\pm 0,16$ ; N = 3) und für P:C\_#m8 auf 1,83fach ( $\pm 0,13$ ; N = 4) im Vergleich zur Elternlinie bestimmt werden. Als erFAX-Überexpressionslinien wurden P:ER\_#8 und P:ER\_#m1 ausgewählt. Diese wiesen mit einer erFAX-Überexpression von je 2,47fach ( $\pm 0,07$ ; N = 4) und 2,72fach ( $\pm 0,38$ ; N = 4) im Vergleich

zur Elternlinie die stärkste Überexpression auf. Replikate stellen hier die Anzahl an Auftragungen dar, die mit der Eichgerade verglichen wurden. Es wurden je zwei unabhängige Western Blots für die Bestimmung der Überexpression verwendet.

Von Li et al. (2019) wurde auf Transkriptebene gezeigt, dass bei einer *erFAX*-Überexpression auch die *cFAX*-Expression ansteigt. Um eine potenzielle Regulation des jeweils anderen FAX-Gens in den hier ausgewählten Überexpressionslinien auf Proteinebene zu untersuchen, wurde das *erFAX*-Proteinlevel in *cFAX*-Überexpressionslinien und das *cFAX*-Proteinlevel in *erFAX*-Überexpressionslinien gemessen (Abbildung 20).

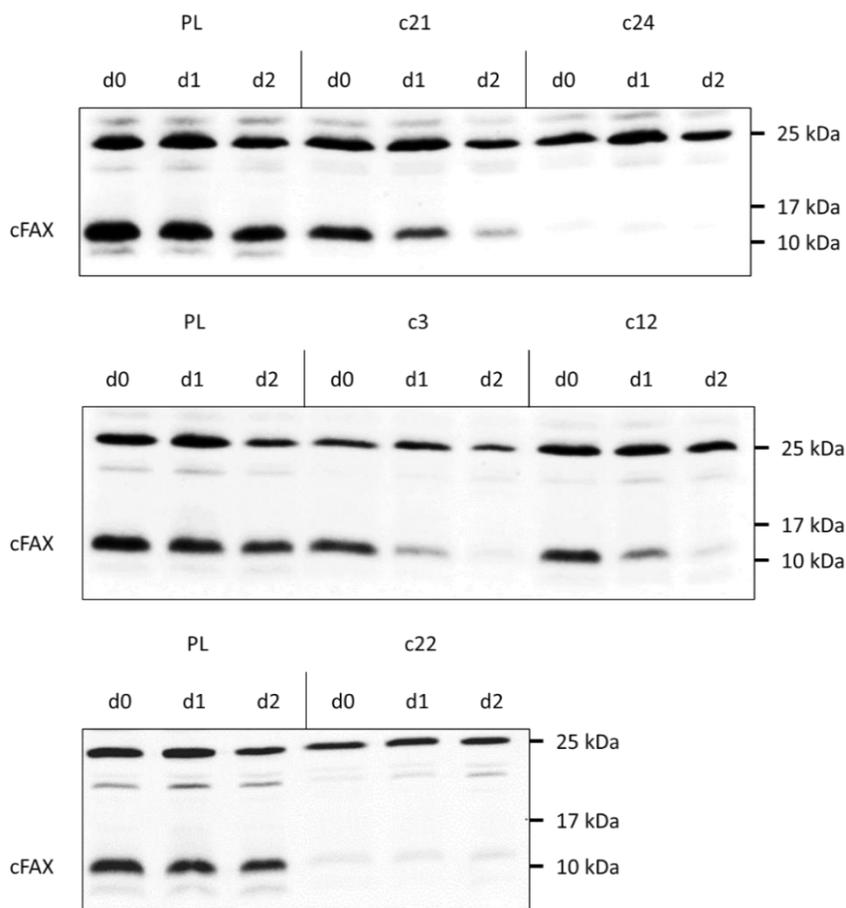


**Abbildung 20: Proteinlevel von cFAX und erFAX in Chlamydomonas FAX-Überexpressionslinien.** Dargestellt sind Western Blots ausgewählter Überexpressionslinien sowie der Elternlinie (PL, *parental line*) UVM4. Als *cFAX*-Überexpressionslinien wurden P:C\_#m8 und P:C\_#12 aufgetragen. Als *erFAX*-Überexpressionslinien wurden P:ER\_#8 und P:ER\_#m1 aufgetragen. „P“ steht für den *PSAD*-Promotor. „C“ und „ER“ geben *cFAX* oder *erFAX* an. Ein zusätzliches „m“ gibt eine Linie eines unabhängigen Transformationsansatzes an. Für *cFAX*-Überexpressionslinien wurden Proteine nach einer Extraktion aus der gesamten Zelle entsprechend 4 µg Chlorophyll verwendet. Für *erFAX*-Überexpressionslinien wurden Proteine entsprechend 2 µg Chlorophyll verwendet. *cFAX* sowie *erFAX* wurden jeweils mit spezifischen Antikörpern via Chemilumineszenz detektiert. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Es konnte keine Änderung des FAX-Proteinlevels in den entsprechenden Überexpressionslinien festgestellt werden. Das *cFAX*-Proteinlevel wurde nicht durch eine *erFAX*-Überexpression erhöht. Ebenso wurde das *erFAX*-Proteinlevel nicht durch eine *cFAX*-Überexpression beeinflusst.

Um die Funktion von *cFAX* und *erFAX* weiter untersuchen zu können, wurden auch *knockdown*-Linien durch artifizielle microRNA (amiRNA)-Konstrukte generiert. Es sollten konstitutive und induzierbare amiRNA-Linien generiert werden, indem der *PSAD*- oder *NIT1*-Promotor verwendet wurde. Aufgrund von Verunreinigungen des *PSAD*-Plasmids konnten nur

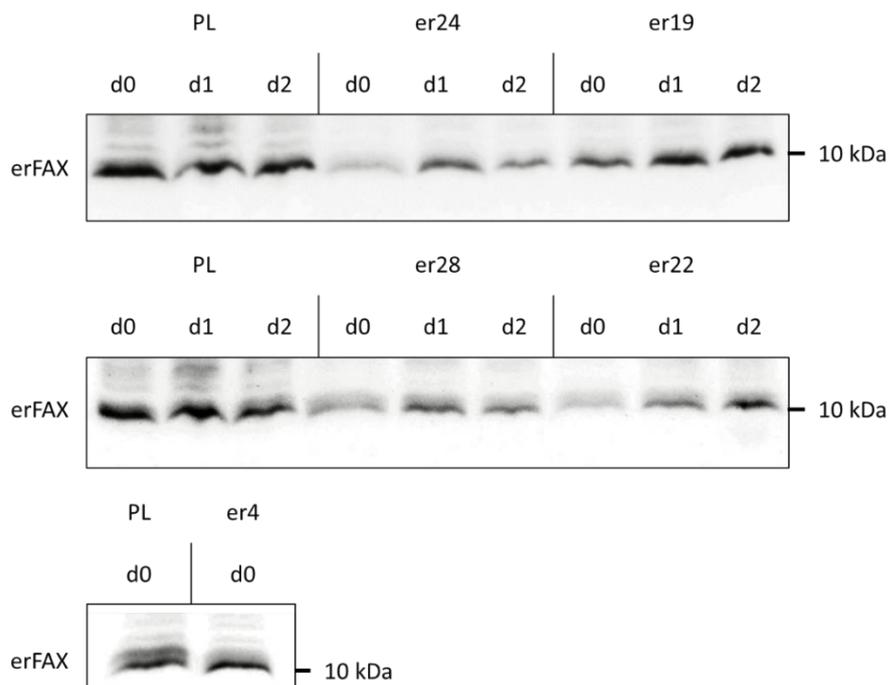
Genkonstrukte mit dem induzierbaren *NIT1*-Promotor erstellt und *Chlamydomonas* damit transformiert werden. Die Auswahl geeigneter Transformanden wurde durch Proteinextraktion von Zellen, die einen Tag in Induktionsmedium herangezogen wurden, und anschließendem Western Blot getroffen. Bei einem Vergleich mit der nicht-transformierten Elternlinie sollte ein geringeres Proteinlevel detektiert werden. Insgesamt wurden ca. 30 Transformanden pro FAX-Gen getestet. Es wurden fünf Linien ausgesucht, die ein geringeres cFAX-Proteinlevel im Vergleich zur Elternkontrolle aufwiesen. Hier wurden Proteine im zeitlichen Verlauf von zwei Tagen nach Induktion extrahiert, um die Dynamik des induzierten *knockdown*-Effekts nachvollziehen zu können. Bei Betrachtung der anschließenden Western Blots konnten die Linien c3, c12 und c21 als induzierbare *knockdown*-Linien für cFAX identifiziert werden, die einen deutliche Verringerung des cFAX-Levels über zwei Tage aufwiesen (Abbildung 21).



**Abbildung 21: cFAX-knockdown in *Chlamydomonas*.** Dargestellt sind Western Blots ausgewählter cFAX-knockdown-Linien sowie der Elternlinie (PL, *parental line*) cw15-325. Es wurden Proteine nach einer Extraktion aus der gesamten Zelle entsprechend 2  $\mu$ g Chlorophyll verwendet. Als cFAX-knockdown-Linien wurden c3, c12, c21, c22 und c24 aufgetragen. Es wurden Proben von Tag 0 (d0; nicht induziert), nach einem Tag (d1) oder zwei Tagen (d2) in Induktionsmedium aufgetragen. cFAX wurde mit spezifischen Antikörpern via Chemilumineszenz detektiert. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Hier konnten cFAX-Proteinbanden bei ~14 kDa detektiert werden. Erneut wurde eine Hintergrundbande bei 25 kDa als Kontrolle gezeigt (s.o.). Überraschenderweise konnten auch zwei Linien, c22 und c24, identifiziert werden, die einen konstitutiven *knockdown*-Effekt aufwiesen, bei dem cFAX auch vor Induktion kaum mehr nachweisbar war. Diese Linien können als konstitutive cFAX-*knockdown*-Linien betrachtet werden und wurden für weiterführende Experimente genutzt.

Als potenzielle erFAX-*knockdown*-Linien wurden vier Linien ausgesucht, die ein geringeres erFAX-Proteinlevel im Vergleich zur Elternkontrolle aufwiesen, und Proteine im zeitlichen Verlauf von zwei Tagen nach Induktion extrahiert, um ebenfalls die Dynamik des induzierten *knockdown*-Effekts nachvollziehen zu können. Bei Betrachtung der anschließenden Western Blots konnte festgestellt werden, dass keine der ausgewählten Linien einen typischen Abfall des erFAX-Proteinlevels auf Höhe von 10 kDa über zwei Tage aufwies (Abbildung 22). Alle Transformanden wiesen bereits im nicht-induzierten Zustand ein geringeres erFAX-Level auf als die Elternkontrolle und können somit als konstitutive *knockdown*-Linien verwendet werden.



**Abbildung 22: erFAX-*knockdown* in Chlamydomonas.** Dargestellt sind Western Blots ausgewählter erFAX-*knockdown*-Linien sowie der Elternlinie (PL, *parental line*) cw15-325. er4 ist als Kontrolle ebenfalls aufgeführt. Es wurden Proteine nach einer Extraktion aus der gesamten Zelle entsprechend 2  $\mu$ g Chlorophyll verwendet. Als erFAX-*knockdown*-Linien wurden er19, er22, er24 und er28 aufgetragen. Es wurden Proben von Tag 0 (d0; nicht induziert), nach einem Tag (d1) oder zwei Tagen (d2) in Induktionsmedium aufgetragen. PL und er4 wurden zusätzlich unter nicht-induzierenden Bedingungen angezogen und aufgetragen. erFAX wurde mit spezifischen Antikörpern via Chemilumineszenz detektiert. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Entgegen den Erwartungen stieg das erFAX-Proteinlevel nach einem Tag in Induktionsmedium an und erreichte nach zwei Tagen in den Linien er19 und er22 nahezu das Level der Elternkontrolle. Für weiterführende Versuche wurden die Linien er22 und er28 ausgewählt und als konstitutive *knockdown*-Linien behandelt. Der Nachweis von *knockdown*-Linien zeigt erneut die jeweilige Spezifität der verwendeten Antikörper gegen cFAX und erFAX auf.

Um einen möglichen Einfluss der FAX-Überexpression oder des *-knockdowns* auf das Wachstum aufzuzeigen, wurden Wachstumskurven in einem zeitlichen Verlauf von fünf Tagen erstellt. Als Kontrollen wurden UVM4 für die Überexpressionslinien sowie c12 und er4 für die *knockdown*-Linien gewählt. Die Linien c12 und er4 wurden mit dem entsprechenden amiRNA-Konstrukt transformiert, zeigten aber unter nicht-induzierenden Bedingungen keinen *knockdown*-Effekt (Abbildung 21, Abbildung 22). Da beide Linien durch das amiRNA-Konstrukt ohne Arginin im Medium wachsen konnten (die Elternlinie cw15-325 ist auxotroph gegenüber Arginin), wurden diese für alle Folgeexperimente verwendet.

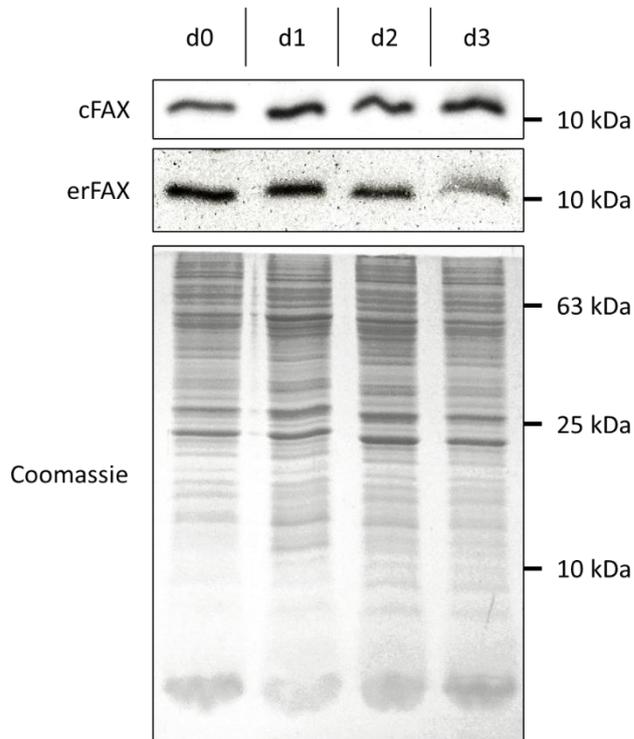
Bei Betrachtung der Wachstumskurven konnten keine signifikanten Unterschiede der jeweiligen Linien zu den Kontrollen festgestellt werden (Abbildung S14).

### **FAX-Proteine in Chlamydomonas unter Stickstoffmangel**

In Chlamydomonas wird die Produktion von TAG unter verschiedenen Stressbedingungen induziert (Goncalves et al., 2016; Merchant et al., 2012). Um zu überprüfen, ob cFAX und/oder erFAX bei der TAG-Synthese auf Proteinebene in ihrer Abundanz reguliert werden, wurden zunächst wildtypische Chlamydomonas-Zellen Stickstoffmangelbedingungen ausgesetzt.

Es wurden Proteine über einen Zeitraum von drei Tagen extrahiert und per Western Blot das cFAX- und erFAX-Level überprüft (Abbildung 23). Zusätzlich wurde ein Coomassie-Gel derselben Proben angefertigt, um die aufgetragene Proteinmenge miteinander vergleichen zu können. Da das Coomassie-Gel eine vergleichbare Intensität der einzelnen Proben aufwies, ließen sich die Bandenintensitäten des Western Blots miteinander vergleichen.

Beim Vergleich der Intensität der cFAX-Banden fiel auf, dass ab einem Tag unter Stickstoffmangel das cFAX-Proteinlevel etwas erhöht war. Das erFAX-Protein zeigte eine Veränderung der Bandenintensität am dritten Tag unter Stickstoffmangel. Hier schien die Proteinmenge abzunehmen. Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt und sollte mit weiteren Replikaten verifiziert werden.

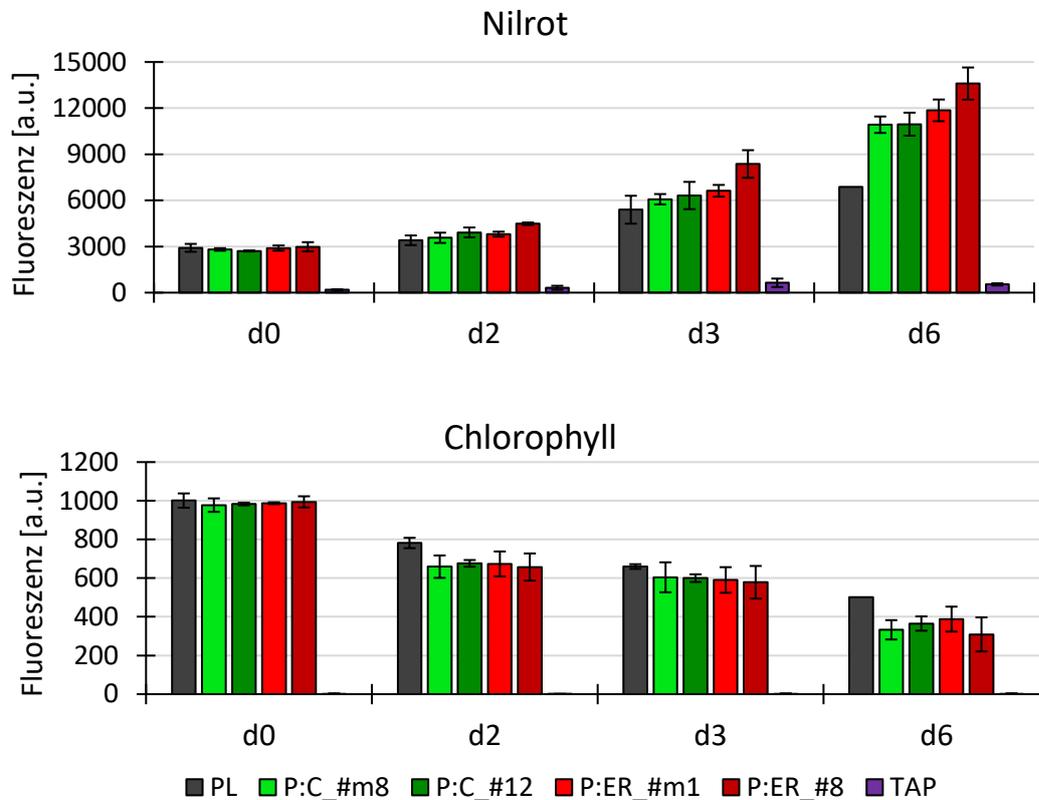


**Abbildung 23: Stickstoffmangelexperiment mit wildtypischen Chlamydomonas-Zellen.** Chlamydomonas-Zellen (UVM4) wurden für drei Tage unter Stickstoffmangelbedingungen in Flüssigkultur gehalten. Zu Beginn des Experiments wurden die Proben auf eine OD750 von 0,3 eingestellt. Es wurden Proben an Tag 0 (d0), Tag 1 (d1), Tag 2 (d2) und Tag 3 (d3) entnommen. Tag 0 entspricht dem Wachstum unter Normalbedingungen in TAP-Medium. Es wurden je 200 µg Proteine der kompletten Zelle aufgetragen. Für den Western Blot wurden spezifische Antikörper gegen cFAX oder erFAX verwendet. Die Detektion erfolgte via Chemilumineszenz. Ein Coomassie-Gel wurde mit denselben Proben angefertigt. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. TAP: Tris-Acetat-Phosphat.

Da vermutet wird, dass die FAX-Proteine einen Einfluss auf die TAG-Biosynthese haben, wurde mit den generierten Überexpressions- und *knockdown*-Linien eine Nilrotfärbung im zeitlichen Verlauf von sechs Tagen unter Stickstoffmangelbedingungen durchgeführt. Mit Nilrot lassen sich neutrale Lipide wie TAG anfärben und quantifizieren (Greenspan et al., 1985; Rumin et al., 2015), sodass Linien, die eine Veränderung in der Lipidakkumulation aufweisen, per Nilrotfärbung identifiziert werden können. Das Wachstum wurde ebenfalls verfolgt, um mögliche Effekte aufzeigen zu können. Da unter Stickstoffmangel ein Chlorophyllabbau erfolgen sollte, wurde als Kontrolle die Chlorophyll-Fluoreszenz gemessen. Das Nilrot-Experiment wurde für die Überexpressions- und die *knockdown*-Linien getrennt durchgeführt.

Es konnten Unterschiede in der Nilrot- sowie der Chlorophyll-Fluoreszenz in den cFAX- und erFAX-Überexpressionslinien im Vergleich zur Elternlinie festgestellt werden (Abbildung 24). Bereits nach zwei Tagen konnte in allen Linien ein Abfall der Chlorophyll-Fluoreszenz gemessen werden, was eine charakteristische Reaktion auf Stickstoffmangel darstellt (Preininger et al., 2015; Siaux et al., 2011). Die Überexpressionslinien zeigten dabei eine etwas

niedrigere Chlorophyll-Fluoreszenz als die Elternlinie. Nach drei und sechs Tagen sank die Chlorophyll-Fluoreszenz weiter ab. Die Unterschiede der Überexpressionslinien zu der Elternlinie waren an Tag 6 am größten.



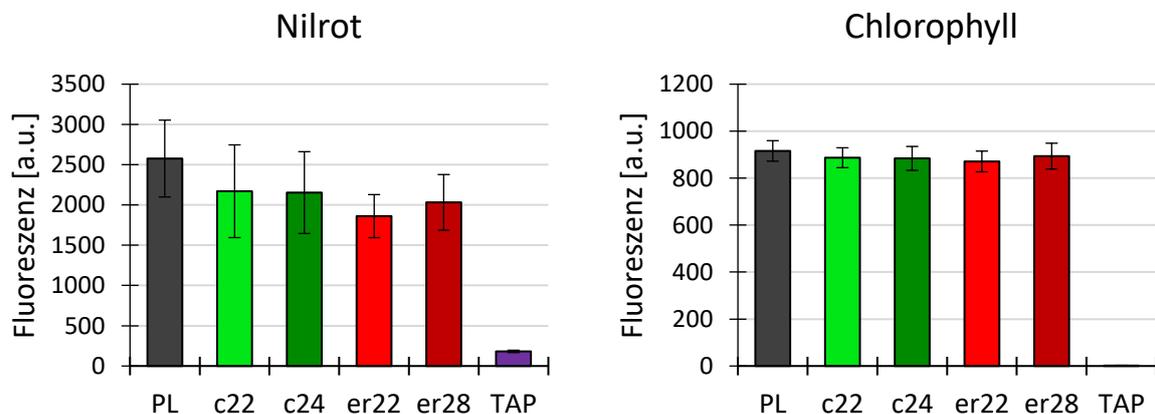
**Abbildung 24: Nilrot- und Chlorophyll-Fluoreszenz der FAX-Überexpressionslinien unter Stickstoffmangel.** Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung im zeitlichen Verlauf von Tag 0 (d0), Tag 2 (d2), Tag 3 (d3) und Tag 6 (d6) nach Wechsel zu Stickstoffmangel-Medium. Die Überexpressionslinien P:C\_#m8, P:C\_#12, P:ER\_#m1 und P:ER\_#8 sowie die Elternlinie (PL, *parental line*) UVM4 sind dargestellt. „P“ steht für den *PSAD*-Promotor. „C“ und „ER“ geben cFAX oder erFAX an. Ein zusätzliches „m“ gibt eine Linie eines unabhängigen Transformationsansatzes an. TAP-Medium wird zur Einschätzung der Hintergrundfluoreszenz gezeigt. N = 3 (PL, d6: N = 2). Vor der Messung wurden alle Zellen auf eine OD750 von 0,3 eingestellt. Chlamydomonas-Zellen sowie TAP-Medium wurden zur Detektion der Nilrot-Fluoreszenz bei 530/14 nm angeregt und die Emission bei 570/5 nm gemessen. Chlorophyll wurde bei 435/5 nm angeregt und die Emission bei 685/5 nm gemessen. TAP: Tris-Acetat-Phosphat.

Bei Betrachtung der Nilrot-Fluoreszenz wurde ein stetiger Anstieg der Fluoreszenz im Verlauf der sechs Tage in allen Linien verzeichnet. Nach bereits zwei Tagen ließ sich in P:ER\_#8 mit ~4.500 eine deutlich höhere Fluoreszenz-Intensität messen als in der Elternlinie mit ~3.400. Alle anderen Mutanten wiesen Intensitäten zwischen ~3.600 und ~3.900 auf. Einen Tag später war dieser Effekt noch deutlicher zu sehen. Hier wies P:ER\_#8 eine Intensität von ~8.400 auf, die Elternlinie im Vergleich dazu nur ~5.400. An Tag 6 waren die größten Unterschiede zu verzeichnen. Hier wiesen alle Überexpressionslinien Intensitäten zwischen 10.900 und 13.600 auf, wohingegen in der Elternlinie eine Fluoreszenz-Intensität von ~6.900 gemessen wurde.

Hierbei ist zu beachten, dass an Tag 6 nur zwei Replikate der Elternlinie vermessen werden konnten. Durch das Nilrot-Experiment ließ sich somit ein schnellerer Anstieg der TAG-Menge in den FAX-Überexpressionslinien im Vergleich zur Elternlinie indirekt nachweisen.

Beim Wachstum unter Stickstoffmangel gab es nur geringe Unterschiede zwischen den Linien (Abbildung S15). Die Elternlinie sowie P:C\_#m8 zeigten im Vergleich zu den anderen Linien das schnellste Wachstum während des gesamten Experiments. Hier muss angemerkt werden, dass in diesen zwei Linien auch die Start-OD750 mit je 0,31 und 0,32 etwas höher war als die der anderen Linien mit 0,29.

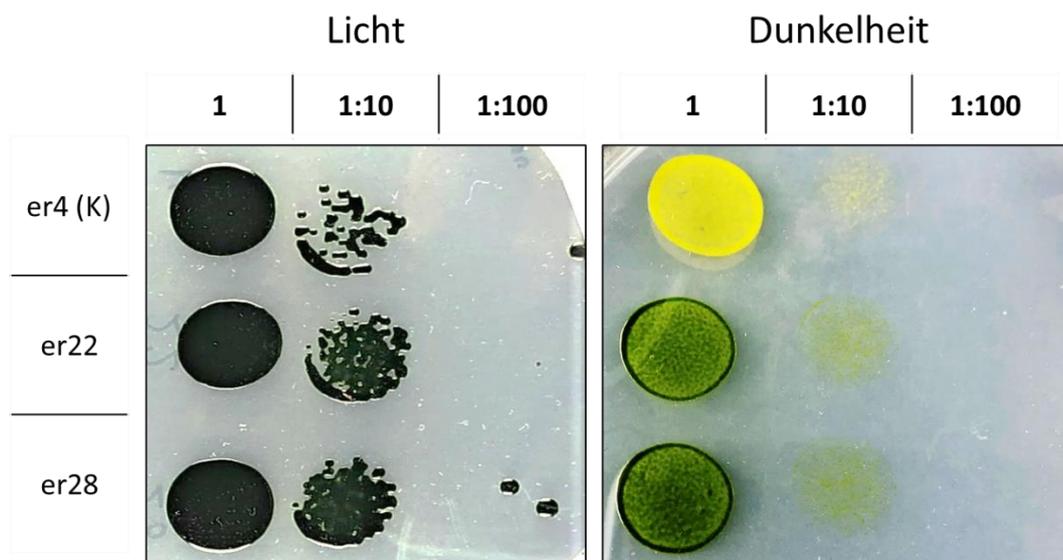
Für die *knockdown*-Linien konnte das Nilrotexperiment unter Stickstoffmangel aufgrund von Verunreinigungen nicht ausgewertet werden. Lediglich eine Nilrot- und Chlorophyll-Fluoreszenzmessung der *knockdown*-Linien zusammen mit der Elternlinie konnte unter Normalbedingungen mit Arginin-Supplementation (die Elternlinie cw15-325 ist auxotroph gegenüber Arginin) durchgeführt werden. Es konnte kein Unterschied in der Chlorophyll-Fluoreszenz festgestellt werden (Abbildung 25). Bei Betrachtung der Nilrot-Fluoreszenz konnte im Mittel eine geringere Intensität der *knockdown*-Linien im Vergleich zur Elternlinie detektiert werden. Da die Streuung der Messwerte relativ groß war, kann hier nur von Tendenzen gesprochen werden. Schlussfolgernd zeigt das Experiment, dass die *knockdown*-Linien einen geringeren TAG-Gehalt aufweisen könnten als die Elternkontrolle. Diese Feststellung muss durch direkte Messungen des TAG-Gehalts bestätigt werden.



**Abbildung 25: Nilrot- und Chlorophyll-Fluoreszenz der FAX-*knockdown*-Linien.** Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Die *knockdown*-Linien c22, c24, er22 und er28 sowie die Elternlinie (PL, *parental line*) cw15-325 sind dargestellt. „c“ und „er“ geben das artifizielle microRNA-Konstrukt für cFAX oder erFAX an. N = 3. Aufgrund der Arginin-Auxotrophie von cw15-325 wurde dem TAP-Medium Arginin zugesetzt. Vor der Messung wurden alle Zellen auf eine OD750 von 0,3 eingestellt. Chlamydomonas-Zellen sowie TAP-Medium wurden zur Detektion der Nilrot-Fluoreszenz bei 530/14 nm angeregt und die Emission bei 570/5 nm gemessen. Chlorophyll wurde bei 435/5 nm angeregt und die Emission bei 685/5 nm gemessen. TAP: Tris-Acetat-Phosphat.

## Einfluss von Licht auf den Phänotyp der Chlamydomonas-Linien

Um zu überprüfen, ob die Abwesenheit von Licht, als Einflussfaktor auf den Energiehaushalt der Zelle, einen Effekt auf die generierten FAX-Linien ausübt, wurde ein *drop dilution*-Assay durchgeführt. Dazu wurden Chlamydomonas-Zellen auf Agar-Platten getropft und zwei Wochen in Dauerlicht oder Dunkelheit inkubiert. In den Überexpressionslinien konnte kein Unterschied zur Elternlinie festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Alle Zellen nahmen hier in Abwesenheit von Licht eine gelbe Farbe an. In den *knockdown*-Linien konnte dagegen ein Effekt beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrolle blieben die erFAX-*knockdown*-Linien grün (Abbildung 26). Dieser Effekt konnte auch in den konstitutiven cFAX-*knockdown*-Linien (c22 und c24) im Vergleich zur Kontrolle reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). In einem weiteren Versuch wurden auch die induzierbaren cFAX-*knockdown*-Linien c12 und c21 auf Platten aus Induktionsmedium aufgetropft. Auch hier konnte eine Grünfärbung der Zellen, die im Dunkeln angezogen wurden, festgestellt werden.



**Abbildung 26: „green-in-the-dark“-Phänotyp von erFAX-*knockdown*-Linien.** Gezeigt ist ein *drop dilution*-Assay mit den *knockdown*-Linien er22 und er28 sowie der Kontrolle er4 (K). „er“ gibt das artifizielle microRNA-Konstrukt für erFAX an. Es wurden 50 µL Tropfen der Chlamydomonas-Kulturen mit einer OD750 von 0,5 auf eine TAP-Agar-Platte aufgetropft. Zusätzlich wurde eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung aufgebracht. Die Platten wurden für zwei Wochen in Dauerlicht oder Dunkelheit inkubiert. Das Experiment wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Repräsentativ wurde ein Replikat dargestellt.

## 4. Diskussion

Lipide nehmen in Pflanzen diverse Funktionen als Bestandteil von Zellmembranen, als Energiespeicher oder auch als Signalmoleküle ein. Bis heute sind zahlreiche Proteine und Stoffwechselwege im Lipidmetabolismus nicht vollständig untersucht, sodass weitere Studien notwendig sind, um die komplexen Vorgänge in der Pflanzenzelle verstehen zu können. In Landpflanzen und grünen Mikroalgen findet die *de novo* Synthese von Fettsäuren in Plastiden statt, welche als Bausteine für die Bildung von Membranlipiden oder Triacylglycerol (TAG) dienen (Übersicht in Li-Beisson et al., 2013 und Li-Beisson et al., 2019). Der *missing link* im Transport von Fettsäuren über die Chloroplasten-Hüllmembranen wurde erst 2015 von Li und Kollegen durch die Charakterisierung von FAX1 aufgeklärt. FAX-Proteine sind trotz vieler Studien noch weitestgehend in ihrem Transport- und Wirkmechanismus unverstanden. Eine Beteiligung am Lipidmetabolismus sowie eine Funktion im Transport von Fettsäuren konnten für die meisten FAX-Proteine in Arabidopsis nachgewiesen werden (Bugaeva et al., 2021; Könnel, 2021; Li et al., 2015, 2020; Tian et al., 2018, 2019). In der vorliegenden Studie sollte der Transport- und Wirkmechanismus von FAX-Proteinen durch die Untersuchung der Membrantopologie und Orientierung in der Lipidmembran sowie durch Identifikation von möglichen Interaktionspartnern des AtFAX1-Proteins näher aufgeklärt werden. Des Weiteren sollte durch die gleichzeitige Überexpression von *AtFAX1* und *AtABCA9* eine Steigerung der TAG-Produktion erreicht werden. In der Grünalge Chlamydomonas sind im Vergleich zu Arabidopsis FAX-Proteine kaum untersucht. In dieser Studie sollten daher Mitglieder der FAX-Proteinfamilie in Chlamydomonas vorgestellt und die zu AtFAX1 und AtFAX5/6 orthologen Proteine näher untersucht werden, um einen *missing link* im Fettsäureexport aus dem Chloroplasten und die Funktion eines vermeintlich im ER/sekretorischen Weg lokalisierten FAX-Proteins zu eruieren. Der Einfluss auf die Lipid-Produktion durch die FAX-Proteine in Chlamydomonas sollte ebenfalls überprüft werden.

### 4.1 Topologie und Interaktionspartner von FAX-Proteinen

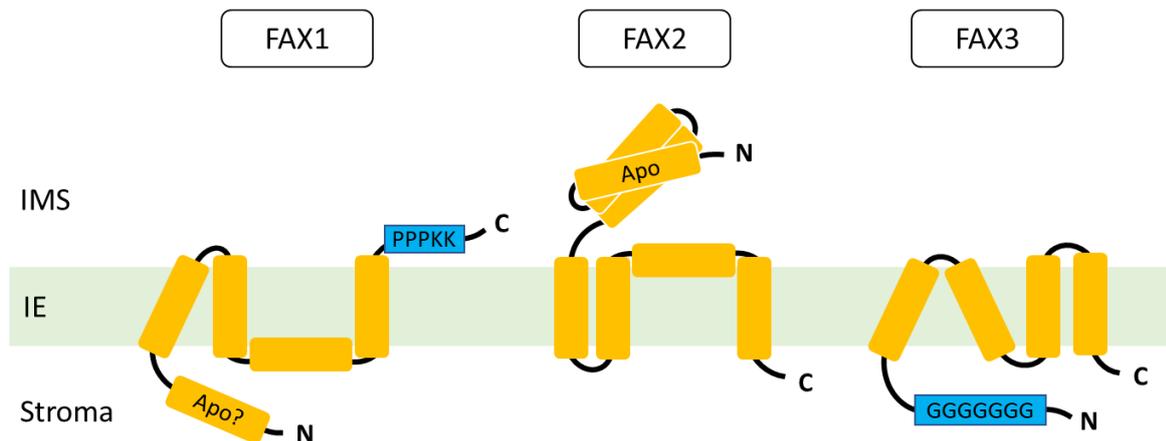
#### **FAX-Proteine unterscheiden sich in ihrer Membrantopologie sowie Orientierung in der Lipidmembran**

Plastidäre FAX-Proteine wurden in den letzten Jahren von verschiedenen Forschungsgruppen untersucht. Für AtFAX1-4 konnte eine direkte Beteiligung am Fettsäuretransport nach heterologer Expression in Hefe nachgewiesen werden (Bugaeva et al., 2021; Könnel, 2021; Li et al., 2015; Tian et al., 2019). Für AtFAX1, AtFAX2 und AtFAX4 konnte ebenfalls eine Beteiligung an der TAG-Produktion in Arabidopsis beschrieben werden (Li et al., 2015, 2020; Tian et al., 2018, 2019). Der Mechanismus des Fettsäuretransports von FAX-Proteinen ist bis

*dato* unbekannt. Um den Transportmechanismus näher aufzuklären, wurden in dieser Arbeit die Membrantopologie sowie Orientierung der FAX-Proteine in der Lipidmembran durch einen proteolytischen Verdau von Membranvesikeln bestimmt. Dazu wurden Vesikel der inneren Hüllmembran (IE) aus Erbsenchloroplasten verwendet, die zum Großteil die native Orientierung aufweisen (Keegstra & Yousif, 1986). Mit Hilfe von Peptidantikörpern konnten so aus dem Fragmentierungsmuster der FAX-Proteine nach einer Proteolyse der IE-Vesikel mit Thermolysin Rückschlüsse auf die Membrantopologie und Orientierung gezogen werden.

In der unbehandelten Kontrolle konnten PsFAX1, PsFAX2 und PsFAX3 zunächst mit einem 3 bis 5 kDa größeren Molekulargewicht detektiert werden als rechnerisch vorhergesagt. Dies könnte an einer unzutreffenden Vorhersage der Länge des Chloroplasten-Transitpeptids liegen, wodurch ein *de facto* längerer N-Terminus als vorhergesagt zu einem größeren Molekulargewicht der maturen Proteine beitragen könnte. Ein Indiz gegen diese Annahme lieferte eine Proteolyse der detektierten maturen PsFAX-Proteinbanden durch Trypsin mit nachfolgender Detektion der Peptidfragmente per Massenspektrometrie. Hier konnten die N-terminalsten Peptide im Bereich der vorhergesagten Schnittstelle für die stromale Peptidase detektiert werden, was auf die Richtigkeit der Vorhersage der Chloroplasten-Transitpeptide für PsFAX1, PsFAX2 und PsFAX3 hindeutet. Ein weiterer Faktor könnten unbekannte posttranslationale Modifikationen sein, die das Laufverhalten der FAX-Proteine beeinflussen. Dies könnte auch der Grund für die sichtbare Doppelbande von PsFAX2 sein, welche durch modifizierte und nicht-modifizierte FAX2-Proteine hervorgegangen sein könnte. Da sich die beiden detektierten Banden in ihrem Laufverhalten nur um ca. 1 bis 2 kDa unterscheiden, kämen beispielsweise Glykosylierung, Phosphorylierung und/oder Oxidation (von z.B. Methionin oder Cystein) als posttranslationale Modifikationen in Frage (Übersicht in Millar et al., 2019). Ubiquitinierung, SUMOylierung oder N-terminale Modifikationen können, abgesehen von der Abspaltung des Chloroplasten-Transitpeptids, aufgrund der zusätzlichen Größe der Modifikation oder der Sequenzeigenschaften von PsFAX2 weitestgehend als Ursache der detektierten Doppelbande ausgeschlossen werden. Ebenso wurde gezeigt, dass ein Shift in der Größe von Proteinbanden in der SDS-PAGE recht häufig bei Membranproteinen vorkommt, was oft in einer unvollständigen Denaturierung des Proteins durch SDS begründet ist (Rath et al., 2009). Spezifisch für helikale Membranproteine konnte auch der Einfluss der Acrylamid-Konzentration in der SDS-PAGE als Einflussfaktor der Proteinmobilität nachgewiesen werden (Rath et al., 2013). Um diese Probleme zu umgehen, könnte ein Molekulargewichtsstandard spezifisch für Membranproteine verwendet werden, wie bereits von Rath et al. (2010) beschrieben. In Bezug zur Membrantopologie und Orientierung lieferte das Fragmentierungsmuster von PsFAX3 klare Indizien, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus zum Stroma orientiert sind. Des Weiteren scheint FAX3 keine zur Lipidmembran parallel angeordnete, amphiphile Helix wie FAX1 zu besitzen und somit vier

$\alpha$ -helikale Transmembrandomänen aufzuweisen. Diese Topologie wird auch durch Sequenzanalysen in Bugaeva et al. (2021) unterstützt. Das Fragmentierungsmuster von PsFAX1 nach Proteolyse durch Thermolysin war uneindeutig, da nicht alle detektierten Banden Proteinfragmenten von FAX1 zugeordnet werden konnten. Dennoch konnte der N-Terminus im Stroma lokalisiert werden. Das in FAX1 konservierte Motiv „GGNPPPKK“ am C-Terminus würde somit, ausgehend von dem postulierten Modell, in den Intermembranraum ragen. Für PsFAX2 wurde das eine vorhandene Fragment im Verlauf der Thermolysin-Proteolyse vollständig abgebaut, was darauf hindeutet, dass der N-Terminus in den Intermembranraum ragt. Die Lokalisation des C-Terminus kann, basierend auf den ermittelten Ergebnissen, nicht festgelegt werden, wird aber aufgrund von Sequenzanalysen der  $\alpha$ -Helices in der Tmemb\_14-Domäne (Bugaeva et al., 2021) im Stroma vermutet. Auffällig war ein detektierbares PsFAX2-Peptidfragment zu Beginn der Proteolyse, was in der Größe grob dem für FAX2 postulierten Apolipoprotein-*helix bundle* entsprach. Es konnte von Wetterau et al. (1988) gezeigt werden, dass das menschliche Apolipoprotein E3 teilweise proteolytisch resistent ist. Zusätzlich konnte auch für das Protein VIPP1 (*vesicle-inducing protein in plastids*) eine proteolytische Resistenz einer Apolipoprotein-ähnlichen-Domäne nachgewiesen werden (Aseeva et al., 2004). Daher wird vermutet, dass das Apolipoprotein-*helix bundle* aufgrund des dichten Packungsgrads und einer möglichen starken Assoziation mit Lipiden schwerer zugänglich für Thermolysin ist und somit im Versuchsablauf erst später abgebaut wird. Zusätzlich konnte eine schwache Bande des muren PsFAX2-Proteins während des gesamten Versuchsablaufs detektiert werden, was ein Hinweis auf eine teilweise proteolytische Resistenz darstellt. In Abbildung 27 sind die untersuchten FAX-Proteine mit ihren charakteristischen Domänen und Sequenzmotiven schematisch dargestellt. Die aufgestellten Strukturmodelle zeigen auf, dass sich die FAX-Proteine untereinander sowohl in ihrer Membrantopologie als auch in der Orientierung in der Lipidmembran unterscheiden. Dies ist insofern überraschend, da für alle plastidären FAX-Proteine eine ähnliche Funktion im Fettsäuretransport postuliert wird (Bugaeva et al., 2021; Li et al., 2015, 2020; Tian et al., 2018, 2019).



**Abbildung 27: Schematische Darstellung der FAX-Proteine in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten.** Dargestellt sind Modelle von FAX1, FAX2 und FAX3 basierend auf dem proteolytischen Verdau mit Thermolysin und der Verteilung hydrophober und amphiphiler  $\alpha$ -Helices (siehe Bugaeva et al., 2021). Der N- und C-Terminus sind mit „N“ und „C“ markiert. Orange Balken stellen  $\alpha$ -helikale Domänen dar. FAX1 und FAX2 besitzen Helices, die strukturell einer Apolipoprotein-Domäne (Apo) ähneln. Zusätzlich wurden Sequenzmotive für FAX1 („PPPKK“) und FAX3 (Poly-Glycin-Bereich) hervorgehoben (blaue Kästen). IE: *inner envelope* (innere Hüllmembran), IMS: *intermembrane space* (Intermembranraum).

Für **FAX1** wird eine N-terminale, nicht-membranassoziierte  $\alpha$ -Helix genannt, die am Fettsäuretransport beteiligt sein könnte (Li et al., 2015) und nach den Ergebnissen dieser Studie ins Stroma ragt. Da die *de novo* Synthese von Fettsäuren im Stroma stattfindet, könnte diese Helix an der Übertragung von Fettsäuren, nach Abspaltung von Acyl-ACP durch eine Thioesterase, beteiligt sein. Da diese Helix im orthologen Chlamydomonas-Protein cFAX nicht vorhanden ist (Bugaeva et al., 2021; Strukturmodellierung mit Phyre2, Kelley et al., 2015, Daten nicht gezeigt), scheint die Notwendigkeit dieser nicht-membranassoziierten  $\alpha$ -Helix nicht gegeben zu sein und sie könnte somit eher eine unterstützende Funktion im Fettsäuretransport einnehmen. Von Könnel et al. (2019) wurde diskutiert, ob das „PPPKK“-Motiv am C-Terminus von FAX1 an der Biegung von Membranen beteiligt sein könnte oder zur Interaktion mit anderen Proteinen am OE/Intermembranraum dient. Es wurde bereits 1988 gezeigt, dass IE und OE zahlreiche Membrankontakte aufweisen (Cremers et al., 1988). Des Weiteren konnten schon membranübergreifende Proteinkomplexe zwischen IE und OE charakterisiert werden (Fan et al., 2015; Inoue, 2011; Richardson & Schnell, 2020). Aufgrund der Position des Motivs im Intermembranraum kann eine Funktion in der Bildung von Membrankontaktstellen zwischen IE und OE durch Bindung an Interaktionspartner vermutet werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass AtFAX3 partiell in der Lage ist, den Verlust von AtFAX1 *in planta* auszugleichen (Bugaeva et al., 2021). Dies lässt darauf schließen, dass die Funktion im Transport von Fettsäuren nicht zwingend vom Vorhandensein einer horizontal

zur Lipidmembran angeordneten amphiphilen Helix oder dem Vorhandensein des „PPPKK“-Motivs abhängig ist und eher in der Tmemb\_14-Domäne an sich liegt.

**FAX2** scheint spezifisch für Samenpflanzen zu sein (Bugaeva et al., 2021) und ist dort insbesondere für die TAG-Produktion in Samen wichtig (Li et al., 2020; Tian et al., 2019). Ein charakteristisches Merkmal von FAX2 ist das Apolipoprotein-*helix bundle* am N-Terminus. Für das Insekten-Apolipoprotein Apolipoprotein III und das menschliche Apolipoprotein E konnte eine Fähigkeit zur Lipidbindung nachgewiesen werden. Hierbei existiert eine Lipid-freie und eine Lipid-assoziierte Form, bei der durch eine Lipid-getriggerte Konformationsänderung eine stabile Protein-Lipid-Interaktion etabliert wird (Übersicht in Weers & Ryan, 2006 und Hauser et al., 2011). In FAX2 könnte die Apolipoprotein-Domäne im Intermembranraum an einer erhöhten Bildung von Membrankontaktstellen durch Protein-Lipid-Interaktion am OE beteiligt sein und somit einen verstärkten Fluss von Fettsäuren aus den Plastiden in das ER zur TAG-Produktion ermöglichen. Ein Hinweis dafür liefert die punktuelle Signalverteilung von FAX2-GFP in Tabak- und Arabidopsis-Protoplasten, welche Membrankontaktstellen in der Chloroplasten-Hüllmembran darstellen könnten (Bugaeva et al., 2021; Tian et al., 2019).

Auffällig ist die invertierte Membrantopologie von PsFAX2 zu PsFAX1. FAX1- und FAX2-Proteine lassen sich aufgrund konservierter Sequenzmotive und der Verteilung geladener Aminosäuren innerhalb der Tmemb\_14-Domäne in einer gemeinsamen Untergruppe von FAX-Proteinen wiederfinden (Bugaeva et al., 2021) und scheinen phylogenetisch recht eng miteinander verwandt zu sein (Alexander Banguela-Castillo, Katrin Philipp, unveröffentlicht). Von Duran und Meiler (2013) wurde unter anderem diskutiert, dass Proteine, die eine hohe Neigung haben mit sich selbst zu interagieren (in Form von Homo-Oligomeren), durch Genduplikation und Mutationen eine invertierte Membrantopologie aufweisen können. Durch die entgegengesetzte Membrantopologie stabilisieren sich die Proteine gegenseitig und es können sich neue, spezialisierte Funktionen der einzelnen Proteine durch Genmutationen etablieren. Eine Ursache für die unterschiedliche Membrantopologie könnte in der Reduktion oder Erweiterung der Apolipoprotein-verwandten-Domäne in FAX1 und FAX2 liegen oder im Vorhandensein des „PPPKK“-Motivs. Dies könnte in weiterführenden Studien untersucht werden, indem artifizielle FAX-Proteine, die eine verlängerte oder verkürzte Apolipoprotein-Domäne aufweisen, in Arabidopsis exprimiert und isolierte Chloroplastenmembranen anschließend einer Proteolyse unterzogen werden. Ebenso kann durch Mutagenese der Einfluss des „PPPKK“-Motivs auf die Membrantopologie eruiert werden. Ein Indiz für die Entstehung von FAX1- und FAX2-Proteinen durch Genduplikation und Neofunktionalisierung liefert die Untersuchung der FAX-Proteine in den Moosen *Physcomitrella patens* und *Marchantia polymorpha*. In diesen Moosen lässt sich kein FAX2-Protein identifizieren. Dafür existieren FAX-Proteine, die eine FAX1-ähnliche Tmemb\_14-Domäne und eine FAX2-ähnliche Apolipoprotein-Domäne am N-Terminus aufweisen (Bugaeva et al., 2021). Durch

Genduplikation und Mutationen könnten sich daraus FAX1 mit einer zusätzlichen, nicht-membranassoziierten  $\alpha$ -Helix (als Überbleibsel der Apolipoprotein-Domäne) sowie FAX2 mit einer Apolipoprotein-Domäne mit einer für Samenpflanzen spezifischen Funktion etabliert haben (siehe Abbildung 27). Das Fehlen von FAX2 sowie der nicht-membranassoziierten  $\alpha$ -Helix im FAX1-Protein in *Chlamydomonas* (Bugaeva et al., 2021) liefern weitere Indizien dafür, dass FAX1 und FAX2 in Samenpflanzen erst durch die Verknüpfung einer Apolipoprotein-Domäne an ein FAX1-ähnliches FAX-Protein in Moosen entstanden sein könnten.

Für Ps**FAX3** konnte die charakteristische Poly-Glycin-Domäne im Stroma lokalisiert werden. Lange Glycin-reiche Bereiche, wie sie in FAX3-Proteinen vorzufinden sind (Bugaeva et al., 2021), werden in der Literatur nur selten funktionell beschrieben. So werden beispielsweise für das Protein TGD5 zwei Glycin-reiche Transmembrandomänen postuliert, die an der Bildung und Organisation des TGD-Superkomplexes zwischen IE und OE beteiligt sein könnten (Fan et al., 2015). Des Weiteren konnte für das Hefe-Protein Mic10 gezeigt werden, dass konservierte Glycin-reiche Motive in zwei Transmembrandomänen essenziell für die membranbiegenden Eigenschaften und die Bildung von Oligomeren in der inneren Mitochondrienmembran sind (Barbot et al., 2015). Im Unterschied zu TGD5 und Mic10 ist die Glycin-reiche Domäne in PsFAX3 in einem ungeordneten Proteinbereich vorzufinden, der keine helikalen Strukturen auszubilden scheint (Bugaeva et al., 2021; Strukturmodellierung mit Phyre2, Kelley et al., 2015, Daten nicht gezeigt). Erst kürzlich konnte in einer Studie mit Glycin-reichen Peptiden, die eine intrinsisch ungeordnete Struktur aufweisen, gezeigt werden, dass 6 bis 10 Glycine in direkter Abfolge („*poly-Gly tracts*“) zur Selbstassemblierung in Fibrillen oder gelartigen Strukturen führt (Kar et al., 2021). FAX3 Proteine in Erbse, *Arabidopsis* und *Chlamydomonas* besitzen in ihrer Proteinsequenz 7 Glycine in direkter Abfolge, sodass hier eine Bildung von Di- oder Oligomeren durch Selbstassemblierung der Poly-Glycin-Domäne vermutet werden kann. Des Weiteren könnte hier FAX3 auch ein Netzwerk zur Etablierung von Mikrodomänen ausbilden, die den Transport von Fettsäuren ermöglichen könnten. Im Stroma wäre ebenfalls eine Interaktion mit anderen Proteinen durch die Poly-Glycin-Domäne möglich. In weiterführenden Studien wäre die Untersuchung von FAX3-Überexpressionslinien interessant, da die Bildung von fibrillären Strukturen, zumindest in Studien mit 25-Aminosäuren-langen Peptiden, dosisabhängig ist (Kar et al., 2021).

Basierend auf den Ergebnissen aus der Proteolyse von IE-Vesikeln lässt sich schlussfolgern, dass die einzelnen FAX-Proteine leicht unterschiedliche Strukturen in der Lipidmembran ausbilden. Da alle untersuchten FAX-Proteine in der Lage sind Fettsäuren zu transportieren, scheinen die unterschiedliche Membrantopologie und Orientierung mit spezifischen Funktionen oder Spezifitäten (zum Beispiel für Fettsäuren) verbunden zu sein, die bis *dato* weitestgehend unbekannt sind.

## Mögliche Interaktionspartner von AtFAX1 weisen unterschiedliche Charakteristika auf

AtFAX1 ist bisher das einzige FAX-Protein, dessen Verlust zu Phänotypen führt, die nicht vollständig durch andere FAX-Proteine ausgeglichen werden können. Zusätzlich zur verringerten Biomasse sind *knockout* Mutanten von *FAX1* männlich steril und zeigen Defekte in der äußeren Pollenzellwand sowie in der Pollenschlauchkeimung *in vitro* (Bugaeva et al., 2021; Li et al., 2015). Um mögliche Interaktionspartner von AtFAX1 zu identifizieren, wurde in dieser Studie eine Ko-Immunopräzipitation mit FAX1-GFP (*GFP-pull down*-Assay) etabliert. Zwei entscheidende Faktoren waren die Wahl des Detergens zur Solubilisierung aus der Lipidmembran sowie die Elutionsstärke des Puffers zum Lösen des FAX1-GFP-Komplexes von dem mit GFP-Antikörpern bestückten Trägermaterial. Als Detergens wurde n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM) verwendet, welches ein mildes, nicht-ionisches Detergens darstellt. Die Wahl des Detergens unterscheidet sich je nach Protein sowie der Zusammensetzung der Lipidmembran und ist maßgeblich entscheidend, ob intakte Proteinkomplexe aus der Membran solubilisiert werden können (Duquesne & Sturgis, 2010; Seddon et al., 2004). Die Stärke des Elutionspuffers (hier: SDS- und Glycerin-Konzentration) wurde während der Etablierung des *GFP-pull down*-Assays auf 6% SDS und 30% Glycerin erhöht, um FAX1-GFP vom Trägermaterial lösen zu können. Dies könnte in der hohen Hydrophobizität von FAX1 beziehungsweise des Proteinkomplexes begründet sein, die eine für SDS nur schwer zugängliche Umgebung ausbildet. Es wurde bereits nachgewiesen, dass die Konzentration des Detergens sowie von Glycerin Auswirkungen auf die Proteinaggregation und -präzipitation haben und für jedes Protein optimiert werden müssen (Avila et al., 2015). Es sollte angemerkt werden, dass mit diesem *GFP-pull down*-Assay Proteinkomplexe aus Chloroplasten junger Arabidopsis-Pflanzen isoliert wurden und deshalb auch nur die Proteinkomplexe in diesem Pflanzenstadium widerspiegeln. Des Weiteren wurde zwar sichergestellt, dass FAX1-GFP das FAX1-Protein ersetzen kann, es könnte dennoch zu einer Beeinflussung des Proteinkomplexes durch den GFP-Tag oder durch die Überexpression von FAX1-GFP kommen.

Basierend auf der Studie von Tian et al. (2019) und dem postulierten Fettsäure-Transportmechanismus über vektorielle Acylierung, wurden Thioesterasen und/oder LACS-Proteine als mögliche FAX1-Interaktionspartner vermutet. Sowohl im Datensatz der Eluate als auch in den Datensätzen der ausgeschnittenen Banden konnten keine Thioesterasen oder LACS-Proteine als mögliche FAX1-Interaktionspartner identifiziert werden. Insgesamt wurden mithilfe des *GFP-pull down*-Assays 15 Proteine identifiziert, die mit FAX1 interagieren und somit Aufschluss über den Transportweg von Fettsäuren geben könnten. Ein weiterer Indikator für eine mögliche Interaktion mit FAX1 ist die Ko-Migration von Proteinen in einer *Blue Native*

(BN)-PAGE. In einer BN-PAGE können intakte Proteinkomplexe nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Nach der Aufteilung des Polyacrylamid-Gels in einzelne Banden, sortiert nach Größe und anschließender Sequenzierung, können so Proteine identifiziert werden, die in einem Komplex gleicher Größe vorhanden sind. Da unterschiedliche Proteine in verschiedenen Proteinkomplexen gleicher Größe vorhanden sein können, dient die Ko-Migration nur als zusätzlicher Hinweis für eine mögliche Interaktion. Takabayashi et al. (2017) führten eine BN-PAGE mit einer aufgereinigten Hüllmembranfraktion von Arabidopsis-Chloroplasten durch und teilten das Gel in 66 Banden auf. FAX1 konnte hierbei nur in Bande 60 detektiert werden. Von den 15 Proteinen, die in der vorliegenden Studie durch einen GFP-*pull down*-Assay als mögliche FAX1-Interaktionspartner eruiert werden konnten, sind nur RER4 und OEP16.1 ebenfalls in dieser BN-PAGE-Bande zu finden (Abbildung S4). Im Folgenden werden die einzelnen Proteine, geordnet nach AGI-Code, diskutiert und in einen möglichen Kontext mit FAX1 gebracht.

#### KAR1 (At1g24360)

Die  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Reduktase 1 (KAR1) ist eine Kernkomponente im Fettsäure-Synthase (FAS)-Komplex und dient der Verlängerung der entstehenden Acyl-Kette um C2-Einheiten pro Zyklus. Eine duale Lokalisation in Chloroplasten und Mitochondrien wurde durch GFP-*targeting* Experimente sowie Organell-spezifische Komplementation bestätigt (Guan et al., 2020). *Knockout* Mutanten für *KAR1* sind embryoletal (Bryant et al., 2011; Guan et al., 2020). Aufgrund der Funktion von KAR1 im FAS-Komplex ist eine direkte Interaktion mit FAX1 unwahrscheinlich.

#### VIPP1 (At1g65260)

VIPP1 ist ein plastidäres Protein, das ursprünglich nach seiner Rolle im Transport von Membranvesikeln von der Hüllmembran zu den Thylakoiden als *vesicle-inducing protein in plastids* bezeichnet wurde (Kroll et al., 2001). Eine Lokalisation von VIPP1 in Thylakoiden sowie in der IE von Chloroplasten konnte durch Immunoblotanalysen nachgewiesen werden (Aseeva et al., 2004; Kroll et al., 2001). Nach heutigem Stand ist VIPP1 ein multifunktionelles Protein, dessen Mutanten pleiotrope Effekte aufweisen. So wird davon ausgegangen, dass VIPP1 eine generelle Funktion bei der Aufrechterhaltung plastidärer Hüll- und Thylakoidmembranen (Nordhues et al., 2012; Zhang et al., 2012, 2016) sowie der Biogenese und Assemblierung von Thylakoidmembran-Proteinkomplexen einnimmt (Nordhues et al., 2012). Umfassendere mögliche Funktionen von VIPP1 sind in der Übersicht von Zhang & Sakamoto (2015) dargestellt sowie in Theis et al. (2020) zusammengefasst. In Arabidopsis sind *vipp1* Mutanten nur mit Saccharose-Supplementation auf Agar-Platten lebensfähig und sind blassgrün (Kroll et al., 2001; Zhang et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die Chloroplasten eine ballonartige Struktur aufweisen, welche durch Anschwellen der

Chloroplasten aufgrund osmotischen Stresses begründet wird (Zhang et al., 2012). Als mögliche Ursache hierfür werden Membranbeschädigungen durch fehlendes VIPP1 genannt. Strukturell besteht VIPP1 hauptsächlich aus  $\alpha$ -helikalen Domänen (Otters et al., 2013) und bildet riesige homo-oligomere Komplexe ( $> 1$  MDa), die in enger Verbindung zur inneren Hüllmembran stehen und ringartige Strukturen bilden (Aseeva et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine 24-Aminosäure-lange amphipathische Helix am N-Terminus für die Bindung an die innere Hüllmembran sowie die Bildung großer Oligomere nötig ist (Otters et al., 2013). Des Weiteren besitzt VIPP1 eine annotierte Region, die als „Apolipoprotein-III like“ (apoLp-III) bezeichnet wird. Die apoLp-III-Domäne entspricht einer Art Lipoprotein in Insekten, welche in ähnlicher Form auch in AtFAX2 gefunden werden kann (Bugaeva et al., 2021). Analysen der VIPP1-Helices von Zhang & Sakamoto (2015) haben gezeigt, dass VIPP1 ein typisches amphipathisches Protein ist, welches für Membranbindung geeignet ist, und als *apolipoprotein-like protein* in Chloroplasten bezeichnet werden kann.

In Bezug zu FAX1 lässt sich anhand dieser bekannten Informationen keine direkte Verbindung zum Fettsäuretransport herstellen. Dennoch scheint VIPP1 am Membranlipidtransport beteiligt zu sein und könnte durch amphiphile Helices an der Biegung von Membranen mitwirken. Für FAX1 wurde postuliert, dass dieses Membranbiegung induziert und Membrankontaktstellen herstellen könnte (Könnel et al., 2019). Es wäre vorstellbar, dass FAX1, in Zusammenarbeit mit VIPP1, an der Formung der IE von Chloroplasten beteiligt ist, um einen Lipidtransport zu den Thylakoiden zu ermöglichen oder eine Membranbiegung zur Bildung von Membrankontaktstellen zum OE induziert. Darüber hinaus konnte von Wang et al. (2008) gezeigt werden, dass VIPP1 auch im Pollen beziehungsweise Pollenschlauch auf Transkriptionsebene exprimiert wird, also dort, wo *fax1* Mutanten einen starken Defekt aufweisen. Eine spezifische Funktion eines FAX1-VIPP1-Komplexes in der Pollenkeimung wäre aufgrund des hohen Lipidumsatzes (Ischebeck, 2016) denkbar.

### THF1 (At2g20890)

*Thylakoid Formation 1* (THF1) wurde in Arabidopsis erstmalig von Wang und Kollegen im Jahr 2004 charakterisiert und nach dessen Rolle in der Organisation von Thylakoidstrukturen benannt. THF1 konnte im Stroma und im OE sowie in Stromuli (Stroma-gefüllte, schlauchartige Ausstülpungen von Plastiden) nachgewiesen werden (Huang et al., 2006; Wang et al., 2004). Bis dato ist nicht vollends geklärt, ob THF1 membranständig und/oder membranassoziiert ist (siehe Huang et al., 2006). Arabidopsis *thf1* Mutanten zeigen pleiotrope Effekte, wie z.B. Blatt-Panuschierung (Wang et al., 2004), verringertes Wachstum (Gan et al., 2014; Wang et al., 2004) und ein „*stay-green*“-Phänotyp in Dunkelheit (Huang et al., 2013). Auf zellulärer Ebene akkumulieren *thf1* Mutanten in nicht-grünen Plastiden Membranvesikel und weisen keine organisierten Thylakoidstrukturen auf, weshalb THF1 eine generelle Rolle in der Chloroplasten- und Blattentwicklung zugesprochen wird (Wang et al., 2004). Es lässt sich kein

direkter Bezug von THF1 zu Lipiden oder Fettsäuren herstellen. Die Lipidzusammensetzung in *thf1* Mutanten ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Gan et al., 2014). Interessant ist der „*stay-green*“-Phänotyp in Dunkelheit, der in ähnlicher Form in *Chlamydomonas* in der vorliegenden Studie durch den *knockdown* von FAX-Proteinen erreicht wurde. Für die *Arabidopsis thf1* Mutante konnte gezeigt werden, dass der „*stay-green*“-Phänotyp auf einem Defekt im Abbau des PSII-LHCII-Komplexes beruht (Huang et al., 2013). Basierend auf den genannten Erkenntnissen ist eine Interaktion von THF1 mit FAX1 und damit eine Beteiligung am Fettsäuretransport unwahrscheinlich.

#### OEP16.1 (At2g28900)

OEP16.1 wurde ursprünglich aus Erbse als 16 kDa Protein der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten isoliert (Pohlmeyer et al., 1997) und darauffolgend der PRAT (*preprotein and amino acid transporter*)-Proteinfamilie zugeordnet (Rassow et al., 1999). Es stellt ein Kanalprotein dar, welches selektiv für Aminosäuren ist (Pohlmeyer et al., 1997). Ungewöhnlich für ein Protein der äußeren Hüllmembran sind die vier  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen, aus denen OEP16.1 aufgebaut ist (Linke et al., 2004; Ni et al., 2011). Unter normalen Wachstumsbedingungen zeigen *oep16.1 knockout* Mutanten keinen Phänotyp (Philippart et al., 2007). Dennoch zeigen *in vivo* Studien, dass OEP16.1 sowie das verwandte Protein OEP16.2 eine Rolle in der Samenentwicklung und Keimung einnehmen und wohl daran beteiligt sind, Aminosäuren über die äußere Hüllmembran zu transportieren (Pudelski et al., 2012). Die genaue Funktion von OEP16.1 in *Arabidopsis* ist jedoch nicht zweifelsfrei geklärt. Dass FAX1-GFP mit OEP16.1 ko-immunopräzipitiert ist vorerst ungewöhnlich, da OEP16.1 ein Membranprotein der äußeren Hüllmembran darstellt. Entsprechend eines Modells, bei dem FAX1 Membranbiegung induziert und Kontakt zum OE aufbaut (Könnel et al., 2019), wäre ein direkter Kontakt von FAX1 zu OEP16.1 durchaus möglich. Da die genaue Funktion von OEP16.1 nicht bekannt ist, könnte ein membranübergreifender Komplex aus FAX1 und OEP16.1 zum Transport von Fettsäuren über die innere und äußere Hüllmembran beitragen. Eventuell könnte OEP16.1 hier eine regulierende Funktion einnehmen, die nur unter bestimmten Bedingungen zum Tragen kommt, da *oep16.1* keinen Phänotyp aufweist. Ein weiteres Indiz für eine Interaktion von FAX1 mit OEP16.1 liefert die Ko-Migration in einer BN-PAGE (Takabayashi et al., 2017).

#### EXL6 (At3g02970)

In *Arabidopsis* besteht die EXORDIUM (EXO)/EXO-like (EXL)-Proteinfamilie aus acht Mitgliedern, zu denen auch EXL6 gehört (Schröder et al., 2009). Bis *dato* existieren nur publizierte Daten zu EXO, EXL1, EXL2 und EXL4. *Arabidopsis exo* und *exl1* Mutanten zeigen eine geringere Biomasseproduktion und scheinen in einem Signalweg mit Brassinosteroiden involviert zu sein (Schröder et al., 2009, 2012). Expressionsanalysen weisen darauf hin, dass

EXL2 und EXL4 ähnliche Rollen spielen könnten (Schröder et al., 2012). EXO konnte durch GFP-*targeting* im Apoplasten lokalisiert werden. Proteomanalysen konnten ebenfalls zeigen, dass EXO und EXL1-EXL4 Bestandteil des Zellwandproteoms sind (Schröder et al., 2009). EXL5 und EXL6 sind die einzigen EXL-Proteine, die mitunter eine Vorhersage zur Lokalisation im Chloroplasten aufweisen (Aramemnon, Schwacke et al., 2007). EXL6 scheint spezifisch in Blüten und Pollen exprimiert zu sein (Schröder et al., 2009). Da die Funktion der EXO/EXL-Proteine nicht vollständig aufgeklärt ist, lässt sich nur schwer eine Verbindung zu FAX1 herstellen. Da EXL6 eine vorhergesagte Lokalisation im Chloroplasten aufweist und EXO/EXL-Proteine an der Biomasseproduktion, ähnlich zu Phänotypen von *FAX1*-Mutanten, beteiligt sind, wäre eine Interaktion von EXL6 mit FAX1 durchaus möglich. Es sollte angemerkt werden, dass EXL6 auch die Abkürzung für das Protein *EXTRACELLULAR LIPASE 6* ist und in der Literatur deshalb der AGI-Code zur eindeutigen Identifikation herangezogen werden sollte, da es in publizierten Studien teilweise zu Verwechslungen kam (z.B. in Ferguson et al., 2017).

#### SFR2 (At3g06510)

Das Enzym SENSITIVE TO FREEZING 2 (SFR2) stellt eine Galactosyltransferase dar und ist in Arabidopsis maßgeblich am Umbau von Lipiden bei Temperaturen unter 0 °C beteiligt, um Froststress besser überstehen zu können (Fourrier et al., 2008). Dabei werden Galactose-Reste von MGDG auf ein anderes MGDG-Molekül übertragen, wodurch DAG und DGDG entstehen. Galactose-Reste von MGDG können auch auf andere Galactolipide übertragen werden, wodurch DAG und Oligogalactolipide entstehen. Das entstandene DAG kann nun mithilfe weiterer Enzyme zu TAG umgewandelt werden (Moellering et al., 2010). SFR2 ist im OE lokalisiert, wobei der Großteil des Proteins, inklusive der katalytischen Domäne, ins Zytosol ragt (Fourrier et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die Funktion von SFR2 durch Ansäuerung des Zytosols aktiviert wird (Barnes et al., 2016, 2019). In Arabidopsis führt der Verlust von SFR2 zu einem frostsensitiven Phänotyp, bei dem keine Oligogalactolipide mehr gebildet werden (Moellering et al., 2010) und die Chloroplasten stark beschädigt vorliegen (Fourrier et al., 2008). Bei Temperaturen über 0 °C zeigen *sfr2* Mutanten keinen Phänotyp (Mckown et al., 1996). In Bezug zu FAX1 lässt sich keine direkte Verbindung von SFR2 mit dem Fettsäuretransport herstellen. Dennoch ist SFR2 maßgeblich am Lipidumbau während Froststress beteiligt. Hierbei könnte FAX1 an der Bildung von Membrankontaktstellen beteiligt sein und den Lipidaustausch begünstigen.

#### NTMC2T6.2 (At3g14590)

N-Terminal-Transmembran-C2-Domäne-Proteine (NTMC2) stehen in enger Verwandtschaft zu Synaptogaminen (Syts) in Säugern und FAM62 (erweiterte Syts, Esyts) in Metazoa. In Landpflanzen lassen sich sechs Typen von NTMC2-Genen finden, die je ein bestimmtes Muster an Sequenzkonservierung und Intronpositionen aufweisen (Craxton, 2007). Typ 1-3

lassen sich den Syts zuordnen, wohingegen Typ 4-6, wozu auch NTMC2T6.2 gehört, der Esyt-Familie zugeschrieben werden. NTMC2T6 besitzt in der C2-Domäne ein konserviertes Calcium-Bindemotiv (Huang et al., 2017). In Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass das verwandte Protein NTMC2T1.2 (zur Abgrenzung im Folgenden SYT2 genannt) mithilfe dieser C2-Domäne calciumabhängig an eine Phospholipidmembran bindet und wichtig für Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum ist (Wang et al., 2015). Zu NTMC2T6 konnte in *micro array*-Daten von sieben Tagen alten Reiskeimlingen gezeigt werden, dass die Expression von OsNTMC2T6 unter Trocken- und Salzstress ansteigt, und somit NTMC2T6 in der Membranreparatur unter abiotischen Stressbedingungen wirken könnte (Huang et al., 2017). Basierend auf diesen Erkenntnissen lässt sich schlussfolgern, dass NTMC2-Proteine durchaus membranbindende Eigenschaften besitzen können und einen generellen Effekt auf Membranen ausüben. Interessant ist der beschriebene Phänotyp von SYT2, bei dem ein Defekt in Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum gezeigt wurde (Wang et al., 2015), was ähnlich zu einem Phänotyp von *fax1* Mutanten ist (Bugaeva et al., 2021; Li et al., 2015). Basierend auf Vorhersagen ist NTMC2T6.2, je nach Spleißvariante, im Nukleus, Mitochondrium oder sekretorischen Weg lokalisiert (Aramemnon, Schwacke et al., 2007) und besitzt keine Transmembrandomänen. Dennoch konnten von Kleffmann et al. (2004) und Takabayashi et al. (2013, 2016, 2017) NTMC2T6.2 auch in Chloroplasten detektiert werden, sodass eine Interaktion mit FAX1 an der inneren Hüllmembran möglich wäre.

#### LPD2 (At4g16155)

Die plastidäre Lipoamiddehydrogenase 2 (pILPD2) ist eins von zwei LPD-Proteinen, die Teil des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (PDC) im Stroma von Chloroplasten sind (Blume et al., 2013; Drea et al., 2001). LPD2 gehört zu den Flavoprotein-Oxidoreduktasen und katalysiert im plastidären PDC die Reoxidation des Lipoamid-Cofaktors (Drea et al., 2001). Der PDC ist ein Multienzymkomplex, der Pyruvat zu Acetyl-CoA umsetzt (Reid et al., 1977), welches als Grundbaustein für die Fettsäuresynthese dient. Bis auf die Tatsache, dass LPD2 und FAX1 im Fettsäuremetabolismus eine Rolle spielen, lässt sich ein direkter Bezug nur schwer herstellen. Eine wichtige Eigenschaft für die Interaktion mit LPD2 könnte die Bindung von Liponsäure an der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinresten sein. LPD2 erkennt diese Lipoylgruppe und bindet an diese, unabhängig vom Protein (Lutziger & Oliver, 2000). In FAX1 gibt es zum Beispiel im „PPKKK“-Motiv konservierte Lysine, die als Bindestellen für Liponsäure und damit auch LPD2 dienen könnten. Im Komplex mit FAX1 könnte LPD2 an Redoxreaktionen mit Fettsäuren beteiligt sein oder auch den initialen Schritt der Fettsäurebiosynthese über die Untereinheit LPD2 im PDC regulatorisch beeinflussen. Da das „PPKKK“-Motiv von FAX1, basierend auf der vorliegenden Studie zur Membrantopologie, in den Intermembranraum ragt, ist eine direkte Interaktion mit LPD2 über dieses Motiv jedoch unwahrscheinlich.

SPHK2 (At4g21534)

Sphingosin-Kinasen (SPHKs) katalysieren die Phosphorylierung von Sphingosin zu Sphingosin-1-phosphat. Bis *dato* existieren in Arabidopsis zwei SPHKs (SPHK1 und SPHK2), deren katalytische Aktivität mit verschiedenen langkettigen Sphingoiden nachgewiesen wurde. SPHK2 wurde mithilfe von GFP-*targeting* und Immunoblotanalysen im Tonoplasten lokalisiert (Guo et al., 2011). Arabidopsis *sphk2* Mutanten zeigen eine verringerte Sensitivität gegenüber Abscisinsäure-vermittelten Signalkaskaden (z.B. zur Stomataschließung, Aufhebung der Keimruhe etc.), wohingegen SPHK2-Überexpressionslinien eine erhöhte Sensitivität diesbezüglich aufweisen. SPHKs scheinen in einem Signalweg mit der Phospholipase Dα1 an der Bildung von PA beteiligt zu sein, welches als Signalmolekül wirkt und dessen Bindung an SPHKs wiederum zu einer Erhöhung der katalytischen Aktivität von SPHKs führt (Guo et al., 2012). Da SPHK2 keinen direkten Bezug zum Fettsäuretransport aufweist und im Tonoplasten lokalisiert ist, scheint eine Interaktion mit FAX1 unwahrscheinlich.

ORP2A (At4g22540)

Das OSBP (*oxysterol binding protein*)-related protein 2A (ORP2A) ist eines von 12 ORP-Proteinen in Arabidopsis (Umate, 2011). Es konnten Hinweise gefunden werden, dass ORP2A im Zytosol lokalisiert und mit der Plasmamembran assoziiert ist. Hier interagiert ORP2A mit der calciumabhängigen Proteinkinase 3 (CPK3) (Berendzen et al., 2012). Bisher wurde nur ORP3A näher charakterisiert, welches am Transport von Sterolen zwischen ER und Golgi-Apparat beteiligt zu sein scheint und am ER lokalisiert ist (Saravanan et al., 2009). ORP-Proteine scheinen auch an der Bildung von Membrankontaktstellen beteiligt zu sein (Barajas et al., 2014; Ye et al., 2020). In *Petunia inflata* wurde das Protein PiORP1 untersucht und in der Plasmamembran von Pollenschläuchen lokalisiert. Hier wurde eine Funktion in der Kontrolle der Lipidverteilung und -menge während des Pollenschlauchwachstums postuliert (Skirpan et al., 2006). Generell scheinen ORP-Proteine eine Funktion im Lipidmetabolismus und/oder der Bildung von Membrankontaktstellen aufzuweisen. Dennoch scheint kein direkter Zusammenhang zum Fettsäuretransport aus dem Chloroplasten zu bestehen. Da auch keine Hinweise vorliegen, dass ORP2A im Chloroplasten lokalisiert ist, scheint eine Interaktion mit FAX1 unwahrscheinlich.

SAMT1 (At4g39460)

S-Adenosylmethionin-Transporter 1 (SAMT1) gehört zur *mitochondrial carrier* Proteinfamilie und stellt ein integrales Membranprotein dar, welches am Transport von S-Adenosylmethionin beteiligt ist. In Arabidopsis konnte durch GFP-*targeting* und Immunoblotanalysen gezeigt werden, dass SAMT1 sowohl in der Chloroplasten-Hüllmembran als auch im Mitochondrium lokalisiert ist (Bouvier et al., 2006; Palmieri et al., 2006). *Knockout* Mutanten zeigen ein beeinträchtigtes Wachstum und eine geringe Keimungseffizienz, bei der weniger als 20%

lebensfähige Keimlinge entstehen (Bouvier et al., 2006). Im Vergleich zu FAX1 scheint der *knockout* von SAMT1 zu einem ähnlichen Phänotyp bezüglich des Wachstums und der Keimung zu führen. Dennoch lässt sich kein direkter Bezug zum Fettsäuretransport oder Lipidmetabolismus feststellen.

#### PMDH2 (At5g09660)

PMDH2 (peroxisomale NAD<sup>+</sup>-Malatdehydrogenase 2) ist eine von zwei Malatdehydrogenasen, die durch GFP-*targeting* Experimente im Peroxisom lokalisiert wurde. Des Weiteren konnte eine *pmdh2* Mutante durch MDH2 mit einer peroxisomalen Targetingsequenz komplementiert werden, was die Lokalisation im Peroxisom bestätigte (Pracharoenwattana et al., 2007). Die *pmdh2* Einzelmutante zeigt keinen erkennbaren Phänotyp. Nur wenn beide peroxisomalen MDHs ausgeknockt sind, gibt es einen sichtbaren Effekt. Die *pmdh1 pmdh2* Doppelmutante keimt zwar, stellte aber das Wachstum im Keimlingsstadium ein, wenn nicht extern Saccharose supplementiert wird. Dieser Phänotyp ist charakteristisch für Mutanten, die einen Defekt in der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren aufweisen (Theodoulou & Eastmond, 2012). Aufgrund der Lokalisation von PMDH2 sowie der Funktion in der  $\beta$ -Oxidation ist eine Interaktion mit FAX1 eher unwahrscheinlich. Dennoch sollte angemerkt werden, dass PMDH2 von einigen Gruppen auch im Chloroplasten detektiert wurde (unter anderem Kleffmann et al., 2004; Takabayashi et al., 2017), sodass eine duale Lokalisation denkbar wäre. Hier könnte PMDH in Kombination mit FAX1 zur Reduktion von Fettsäurederivaten dienen.

#### RER4 (At5g12470)

RER4 gehört zur *reticulata-related* (RER)-Familie, die aus sieben Mitgliedern besteht. Ein charakteristisches Merkmal vieler RER-Mutanten ist das Hervortreten der Blattnervatur. Dies ist durch die geringere Anzahl und Größe an Mesophyllzellen zwischen den Blattadern begründet, was häufig auch mit veränderter Plastidenanzahl oder -differenzierung einhergeht. Die *RER4* Mutante *rer4-1* zeigte einen schwachen *reticulata*-Phänotyp sowie ein reduziertes Blattwachstum, was nur unter Schwachlichtbedingungen festgestellt werden konnte. Hier ist anzumerken, dass *rer4-1* keine *knockout* Mutante ist, da ein *RER4*-Transkriptgehalt von ca. 30% detektiert werden konnte (Pérez-Pérez et al., 2013). Bei der Untersuchung der verschiedenen RER-Proteine konnten RE, RER1, RER3, sowie RER4 in der Hüllmembran von Chloroplasten nachgewiesen werden (zusammengefasst in Pérez-Pérez et al., 2013). Durch Proteomanalysen konnte RER4 in der inneren Hüllmembran lokalisiert werden (Simm et al., 2013). Des Weiteren konnte eine nahe Verwandtschaft von RER4 zu RER2/3 aufgrund Proteinähnlichkeit, Genexpression und *loss-* und *gain-of-function*-Studien ermittelt werden. *Rer3* Mutanten zeigen zusätzlich zum *reticulata*-Phänotyp einen Defekt in der Samenkeimung und Keimlingsentwicklung (Pérez-Pérez et al., 2013). Bisher konnte keine präzise Funktion der RER-Proteine festgestellt werden. RER4 besteht, ähnlich zu den FAX-Proteinen, aus vier

Membranhelices und hat wie FAX3 einen Poly-Glycin-Bereich am N-Terminus. Da die Funktion von RER4 unbekannt ist, lässt sich nur schwer eine Interaktion mit FAX1 diskutieren. Ein möglicher Hinweis liefert die, im Vergleich zu den anderen RER-Genen, recht starke Expression von *RER4* in Mikrogameten sowie zu Beginn der Embryoentwicklung (Pérez-Pérez et al., 2013), also dort, wo *fax1* Mutanten einen Phänotyp aufweisen (Bugaeva et al., 2021; Li et al., 2015). Wang et al. (2008) konnten ebenfalls eine Expression von *RER4* im Pollen bzw. Pollenschlauch auf Transkriptionsebene nachweisen. Es wäre denkbar, dass eine *rer4 knockout* Mutante einen ähnlichen Pollenphänotyp aufweisen könnte wie *fax1*. Da RER4 in der inneren Hüllmembran lokalisiert wurde (Simm et al., 2013), mit FAX1 in einer BN-PAGE ko-migriert (Takabayashi et al., 2017) und auf Transkriptionsebene in Pollen bzw. Pollenschläuchen exprimiert wird (Wang et al., 2008), kann das Protein als wichtiger Kandidat für eine mögliche Interaktion mit FAX1 angesehen werden.

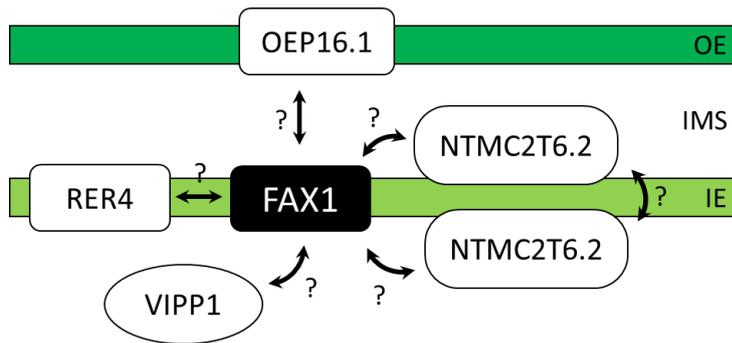
#### „prenyltransferase superfamily protein“ (At5g17270)

Das Protein At5g17270 wurde nach TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>) als „prenyltransferase superfamily protein“ eingeordnet. Dennoch konnte dieses Protein nach eingehender Recherche nicht zu den Prenyltransferasen zugeordnet werden. Nach der PANTHER-Datenbank wird dieses Protein in eine nicht-charakterisierte Familie eingeordnet (PTHR16193), welche keine funktionellen Annotationen aufweist. Es kann keine Verbindung zur Prenyltransferase-Aktivität festgestellt werden. Aufgrund der unklaren Zuordnung und Funktion von At5g17270 lässt sich kein Bezug zu FAX1 herstellen.

#### CAS (At5g23060)

Das Protein *calcium sensing receptor* (CAS) stellt ein calcium- und lichtreguliertes Phosphoprotein dar (Cutolo et al., 2019; Stael et al., 2012), welches durch Immunoblotanalysen in Thylakoiden lokalisiert werden konnte (Cutolo et al., 2019; Vainonen et al., 2008). Durch topologische Analysen konnte gezeigt werden, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus des Proteins im Stroma lokalisiert sind. Interessanterweise scheint CAS eine „Transmembran“-Domäne zu besitzen, die horizontal in die Thylakoidmembran integriert. Funktionell scheint CAS an einer phosphorylierungsabhängigen Akklimatisierung an Starklicht beteiligt zu sein (Cutolo et al., 2019). Der Verlust von CAS führt in Arabidopsis zu einem reduzierten Wachstum (Vainonen et al., 2008). Basierend auf diesen Erkenntnissen scheint kein funktioneller Zusammenhang mit FAX1 zu bestehen.

In Abbildung 28 sind zusammenfassend Interaktionspartner von AtFAX1 dargestellt, die nach Diskussion und Literaturrecherche als Hauptkandidaten für eine mögliche Interaktion angesehen werden. Dazu zählen VIPP1, OEP16.1, NTMC2T6.2 und RER4.



**Abbildung 28: Mögliche Interaktionspartner von FAX1.** Dargestellt sind Proteine, die basierend auf Ko-Immunopräzipitation und Literaturrecherche eine hohe Wahrscheinlichkeit besitzen, mit FAX1 im Chloroplasten zu interagieren. Zur genaueren Beschreibung der Proteine siehe Text. IE: *inner envelope* (innere Hüllmembran), IMS: *intermembrane space* (Intermembranraum), OE: *outer envelope* (äußere Hüllmembran).

Grundsätzlich sollte erwähnt werden, dass mit dem durchgeführten GFP-*pull down*-Assay durchaus auch Proteine ko-immunopräzipitieren, die nicht zwingend mit FAX1 interagieren müssen. Von Avila et al. (2015) wurde angemerkt, dass partiell gelöste Membranbereiche mit dem *bait* präzipitieren und somit Proteine in direkter Nähe nachgewiesen werden können, die nicht direkt mit dem *bait* interagieren. Um die Aussagekraft des GFP-*pull down*-Assays mit FAX1-GFP zu erhöhen, könnte eine membranverankerte GFP-Kontrolle verwendet werden, wie bereits von Kadota et al. (2014) gezeigt.

## 4.2 Überexpression von *FAX1* und *ABCA9* in *Arabidopsis thaliana*

### Phänotypische Auswirkungen der Überexpression von *FAX1* und *ABCA9*

Um einen stärkeren Fluss von Fettsäuren in die eukaryotische Lipidsynthese zu fördern, wurden *FAX1*, als Protein für den Fettsäureexport in Plastiden, sowie *ABCA9*, als Fettsäureimporter im ER, gleichzeitig in *Arabidopsis* überexprimiert (*A9/FAX1 dox*). Zusätzlich wurden *A9/FAX1 dox* in eine *Arabidopsis*-Linie eingekreuzt, die eine *knockout*-Mutation im Gen *CKX3* aufweist (*ckx3 A9/FAX1 dox*). *Arabidopsis ckx3* Mutanten bilden mehr Samen (Bartrina et al., 2011), was zu einer zusätzlichen Steigerung des Samen-TAG-Gehalts pro Pflanze führen könnte. Als Kontrolle dienten Linien, die *FAX1* und *ABCA9* einzeln überexprimieren. Alle Linien wurden im Vorfeld dieser Arbeit in der AG Philippar generiert. Sowohl die *FAX1 ox* Linien als auch *A9/FAX1 dox* Linien zeigten eine unterschiedlich starke Überexpression der entsprechenden Gene nach vier Wochen Wachstum auf Erde, sodass eine transkriptabhängige Auswertung der Phänotypen möglich ist. Bei der Analyse der Transkriptgehalte der *ckx3 A9/FAX1 dox* Linien wurde erkennbar, dass beide Linien keine *FAX1*-Überexpression aufwiesen und somit eher als *ckx3 ABCA9 ox* Linien behandelt werden sollten. Da das *FAX1*-Überexpressionskonstrukt (*35S::FAX1*) per PCR im Genom

nachgewiesen werden konnte, wird von einem möglichen Gen-Silencing der *FAX1*-Überexpression ausgegangen. Die Stilllegung von Transgenen kann durch Positionseffekte (Wilson et al., 1990) oder epigenetische Regulation begründet sein (Kohli et al., 2010; Rajeevkumar et al., 2015). Ebenso konnte beschrieben werden, dass die Überexpression eines Gens mit dem 35S-Promotor in T-DNA-Insertionslinien (hier: SALK\_050938, *ckx3-1* Mutante) zu einer *trans*-Inaktivierung des Transgens führen kann (Daxinger et al., 2008). Zu Beginn der Phänotypisierung auf Erde (zwei Wochen alte Pflanzen) zeigten alle Linien tendenziell eine geringere Blattfläche als auch einen geringeren Rosettendurchmesser, waren also generell kleiner als der Wildtyp Col-0. Für die beiden Doppelüberexprimierer waren diese Parameter signifikant von Col-0 verschieden. Da die A9/FAX1 dox Linien Gene überexprimieren, die wichtig für die Synthese von Lipiden sind (Kim et al., 2013; Li et al., 2015; Tian et al., 2018), könnte ein Ungleichgewicht in der Lipidhomöostase zu einer verringerten Mobilisierung von Speicherlipiden im frühen Wachstumsstadium führen. Die somit verminderte Energiezufuhr zu Beginn des Pflanzenwachstums könnte sich in zwei Wochen alten Pflanzen in einer verringerten Biomasse widerspiegeln. Hierzu könnten in Folgeexperimenten Pflanzen schon ab Beginn der Keimung phänotypisiert werden, um mögliche Effekte der gleichzeitigen Überexpression von *FAX1* und *ABCA9* im frühen Wachstumsstadium zu eruieren. In der vorliegenden Studie wurde die Keimlingsentwicklung nur auf Agar-Platten mit Saccharose-Supplementation untersucht, sodass dieser Versuchsansatz ungeeignet ist, Defekte in der Mobilisierung energiereicher Verbindungen herauszustellen. Im weiteren Verlauf der Phänotypisierung auf Erde wurde deutlich, dass die untersuchten Linien den Wildtyp schon eine Woche später im Wachstum eingeholt hatten. Bei Betrachtung der Zeitpunkte der Infloreszenz von 1 cm und der ersten geöffneten Blüten konnte kein signifikanter Unterschied für eine Gruppe von Überexprimierern im Vergleich zum Wildtyp Col-0 festgestellt werden. Die Unterschiede im Stieldurchmesser der Primär-Infloreszenz zwischen den Linien waren ebenfalls nicht signifikant. Von Li et al. (2015) konnte ein signifikant dickerer Durchmesser der Primär-Infloreszenz für *FAX1*-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp Col-0 ermittelt werden. In der vorliegenden Studie konnte dies für die untersuchten *FAX1* ox Linien nicht beobachtet werden. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte ein unterschiedlicher Messansatz sein. Die Primär-Infloreszenz wurde in der vorliegenden Studie auf Höhe von 8 cm vermessen, sobald diese eine Gesamthöhe von 15 cm erreicht hatte. In der Studie von Li und Kollegen wurde der untere Abschnitt des zweiten Internodiums von sieben Wochen alten Arabidopsis-Pflanzen gemessen. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Durchmesser der Primär-Infloreszenz in *FAX1* ox erst in einem späten Entwicklungsstadium zunimmt und somit der Vergleich des Stieldurchmessers je nach Entwicklungsstand der Pflanze variiert.

In Bezug zur Samenmenge wurde erwartet, dass sich durch das *ckx3 knockout* Allel mehr Samen in den *ckx3* A9/FAX1 dox Linien im Vergleich zu Col-0 bilden. Es konnte kein

signifikanter Unterschied in der Samenmenge aller untersuchten Linien im Vergleich zum Wildtyp Col-0 festgestellt werden. Beim Vergleich des Samengewichts mit dem Wildtyp Col-0 wurde ersichtlich, dass alle Linien, bis auf A9/FAX1 dox #3.1, schwerere Samen bildeten. In den Linien FAX1 ox #1.2 und A9/FAX1 dox #3.2 ist dieser Unterschied signifikant. In Arabidopsis macht TAG ca. 35-40% des Samengewichts aus (Theodoulou & Eastmond, 2012), sodass das Samengewicht als Indikator für einen erhöhten Gehalt an TAG genutzt werden kann. Von Tian et al. (2018) wurde *FAX1* mit einem samenspezifischen Promotor überexprimiert, um den TAG-Gehalt in Samen zu steigern. Dabei wurden die Samen von Linien gewogen, die *FAX1* zu ~300fach, ~250fach und ~120fach überexprimiert hatten. Das RNA-Level wurde hierbei in den Schoten gemessen. In diesen Linien konnte eine Steigerung des Samengewichts von 16 bis 18% erreicht werden. Auch eine Steigerung des Gesamtfettsäuregehalts konnte in den Überexpressionslinien nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie wurden die Samen von zwei *FAX1*-Überexpressionslinien gewogen, die *FAX1* in Blättern zu ~340fach und ~80fach im Vergleich zu Col-0 überexprimierten. Mit einer jedoch nicht signifikanten Gewichtszunahme von je 16 und 21% konnten ähnliche Ergebnisse zu Tian et al. erzielt werden, obwohl der 35S-Promotor und kein samenspezifischer Promotor genutzt wurde. Anhand der vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen von Tian et al. lässt sich schlussfolgern, dass die RNA-Menge von *FAX1* ab einem bestimmten Level keinen zusätzlichen Beitrag zur TAG-Produktion liefern kann. Dennoch sollte angemerkt werden, dass das Transkriptlevel von *FAX1* in dieser Studie nicht in Schoten sondern in der gesamten oberirdischen Blattrosette gemessen wurde, und somit präzise Aussagen über den Einfluss des Transkriptgehalts auf das Samengewicht mit Daten dieser Studie nicht möglich sind. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit wurden von Kim et al. (2013) acht verschiedene *ABCA9*-Überexpressionslinien untersucht. Da *ABCA9* natürlicherweise nicht in Blättern exprimiert wird, können keine relativen Angaben bezüglich des Transkriptlevels zu Col-0 gemacht werden. Die von Kim et al. auf Ubiquitin normierten Expressionswerte schwankten zwischen ~2 und ~300, je nach Linie. Da im selben Datensatz der Wildtyp keine Expression zeigte, wird davon ausgegangen, dass Blattmaterial zur Messung verwendet wurde. In der Studie von Kim et al. wurden dazu allerdings keine Angaben gemacht. Die Steigerung des Samengewichts der Linien schwankte zwischen 5 und 23%, wobei keine Korrelation der Transkriptmenge mit dem Samengewicht hergestellt werden konnte. In der vorliegenden Studie wurde eine nicht-signifikante Steigerung von ~18% in der *ABCA9* ox Linie ermittelt und liegt damit also eher, vergleichend mit den Linien von Kim et al., im oberen Bereich. Ähnlich zu *FAX1* scheint der Effekt der Überexpression nicht mit dem Transkriptlevel von *ABCA9* zu korrelieren. Auch hier scheint es ein unteres Limit an *ABCA9*-Transkript zu geben, ab dem keine weitere Steigerung des TAG-Gehalts in Samen möglich ist. Da dennoch Unterschiede im Samengewicht zwischen den verschieden starken Überexpressionslinien von Kim et al. gemessen werden konnten,

scheinen andere Ursachen, wie Positionseffekte des inserierten Transgens (Wilson et al., 1990), eine entscheidende Rolle zu spielen. Ebenso könnte eine Inaktivierung/Aktivierung des gebildeten Proteins die Produktion von TAG beeinflussen. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnten somit bereits publizierte Daten zum Samengewicht in *FAX1*- als auch in *ABCA9*-Überexpressionslinien reproduziert werden, die jedoch keine Signifikanz aufwiesen.

Die beiden *ABCA9/FAX1* dox Linien zeigten ein gegensätzliches Bild beim Samengewicht. So waren die Samen der Linie *A9/FAX1* dox #3.1 in etwa so schwer wie der Wildtyp. Die Linie *A9/FAX1* dox #3.2 hatte mit einer Steigerung des Samengewichts um 27% die schwersten Samen aller Linien und ist signifikant verschieden vom Wildtyp Col-0. Diese Ergebnisse entsprechen nicht der Erwartung, dass additive Effekte der *FAX1*- sowie *ABCA9*-Überexpression zu einem gesteigerten Samengewicht führen sollten. Die Erhöhung des TAG-Gehalts in Samen scheint bei einer starken Überexpression beider Gene beeinträchtigt zu werden, wohingegen eine vergleichsweise schwache Überexpression den TAG-Gehalt in Samen erhöht. Im Gegensatz zu den *FAX1* ox oder *ABCA9* ox Linien scheint hier ein oberer Schwellenwert im Transkriptgehalt von *FAX1* und/oder *ABCA9* zu existieren, ab welchem die TAG-Bildung auf Wildtyplevel reguliert wird. Da *FAX1* in der *FAX1* ox Linie deutlich stärker exprimiert und kein negativer Einfluss auf die TAG-Menge nachgewiesen wurde, wird von einem inhibierenden Effekt des *ABCA9*-Transkriptlevels in der Linie *A9/FAX1* dox #3.1 ausgegangen. Um klare Aussagen treffen zu können, müssen in Folgeexperimenten weitere unabhängige Linien, die *FAX1* und *ABCA9* überexprimieren, untersucht und das Transkriptlevel sowie der Proteingehalt von *FAX1* und *ABCA9* quantifiziert werden.

Bei der Messung der Transkriptgehalte von 2,5 Wochen alten Arabidopsis-Pflanzen auf Agar-Platten fiel auf, dass die Einzelüberexpressionslinien ein vergleichbares Level an Transkripten wie vier Wochen alte Pflanzen auf Erde aufwiesen. In den Doppelüberexprimierern dagegen war der Transkriptgehalt deutlich verändert. So lag der *FAX1*-Transkriptgehalt auf Agar-Platten bei *A9/FAX1* dox #3.1 nur noch bei 64% im Vergleich zum Transkriptgehalt auf Erde, in der Linie *A9/FAX1* dox #3.2 sogar nur bei 49%. *ABCA9* wurde dagegen in den 2,5 Wochen alten Arabidopsis-Pflanzen auf Agar-Platten stärker exprimiert. So war das Transkriptlevel jeweils um 32% im Vergleich zum Transkriptlevel der vier Wochen alten Arabidopsis-Pflanzen auf Erde erhöht. In den *ckx3* *A9/FAX1* dox Linien war ebenfalls eine Steigerung des *ABCA9*-Transkriptgehalts um 35% (*ckx3* *A9/FAX1* dox #2) und 114% (*ckx3* *A9/FAX1* dox #3) festzustellen. Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Genexpression könnten eine Mischung von Positionseffekten des inserierten Transgens (Wilson et al., 1990) zusammen mit der variablen Genexpression des 35S-Promotors sein. Kiselev et al. (2021) konnten kürzlich zeigen, dass sich die Transgenexpression durch den 35S-Promotor je nach Entwicklungsstadium der Pflanze unterscheidet. Des Weiteren wurden in den Pflanzen auf

Erde nur die oberirdischen Pflanzenteile zur RNA-Isolation verwendet, sodass ein möglicher Einfluss der Wurzel auf die Transkriptmenge unbekannt bleibt. Bei der Phänotypisierung der Keimlingsentwicklung auf Platte ließ sich kein einheitlicher Phänotyp für eine Gruppe von Überexprimierern feststellen. Die beiden *FAX1*-Überexpressionslinien verhielten sich gegensätzlich. So schien der starke *FAX1*-Überexprimierer *FAX1 ox #4.9* eine schnellere Keimlingsentwicklung zu durchlaufen im Vergleich zum Wildtyp Col-0, wohingegen die Linie *FAX1 ox #1.2* etwas langsamer war. Alle Linien, bis auf Linie *FAX1 ox #4.9* und Linie *A9/FAX1 dox #3.1*, durchliefen die Phasen der Keimlingsentwicklung etwas langsamer als Col-0. Dieser Versuch sollte in weiterführenden Versuchen auf Agar-Platten ohne Zucker-Supplementation wiederholt werden, um mögliche Defekte der Mutanten in der Bildung von TAG im Samen oder im Abbau von TAG während der Keimlingsentwicklung aufzeigen zu können (Li-Beisson et al., 2013).

### **Führt die Überexpression von *ABCA9* und *FAX1* in *Arabidopsis* zu mehr TAG?**

Durch die gleichzeitige Überexpression von *ABCA9* und *FAX1* sollte die TAG-Produktion in Samen erhöht werden, was indirekt über das Samengewicht gemessen werden kann (Jako et al., 2001; Kim et al., 2013; Tian et al., 2018, 2019). Die beiden Linien *A9/FAX1 dox #3.1* und *A9/FAX1 dox #3.2* zeigten uneinheitliche Phänotypen. Interessanterweise verhielt sich die Linie *A9/FAX1 dox #3.1* in Bezug zu allen gemessenen Parametern ähnlich wie der Wildtyp Col-0, obwohl in dieser Linie ein hohes *FAX1*- und *ABCA9*-Transkriptlevel im Vergleich zu den restlichen Linien detektiert werden konnten. Die Linie *A9/FAX1 dox #3.2* wies dagegen das größte Samengewicht aller untersuchten Linien auf, was der Erwartung einer verstärkten TAG-Produktion entsprechen würde. Eine Begründung für diesen Unterschied könnte die hohe *ABCA9*-Expression in der Linie *A9/FAX1 dox #3.1* sein, was einen inhibierenden Effekt auf die TAG-Produktion ausübt. Ein Hinweis für den Einfluss der Überexpression von *ABCA9* auf die Lipidhomöostase zeigte sich auch im verringerten *FAX1*-Transkriptlevel in der Linie *ABCA9 ox #10.3*. Man kann vermuten, dass durch die Überexpression von *ABCA9* auch andere Gene im Lipidstoffwechsel reguliert werden, sodass ab einem bestimmten *ABCA9*-Transkriptlevel der positive Effekt in Bezug zur TAG-Produktion verloren geht. Der genaue Mechanismus verbleibt dabei ungeklärt.

Einen Schritt in Richtung industrieller Anwendung konnten erst kürzlich Cai et al. (2021) machen. Hier wurden *AtFAX1* und *AtABCA9* heterolog in Leindotter (*Camelina sativa*) exprimiert, um eine gesteigerte Ölproduktion zu erreichen. Hier konnten sowohl in den Einzelüberexpressionslinien als auch in *AtFAX1/AtABCA9 dox* Linien ein höheres Samengewicht, ein höherer Samenertrag und eine gesteigerte TAG-Produktion nachgewiesen werden. Die Effekte der Expression von *AtFAX1* und *AtABCA9* waren additiv. Hierbei ist zu beachten, dass keine Aussagen in Bezug auf eine „echte“ Überexpression getroffen werden

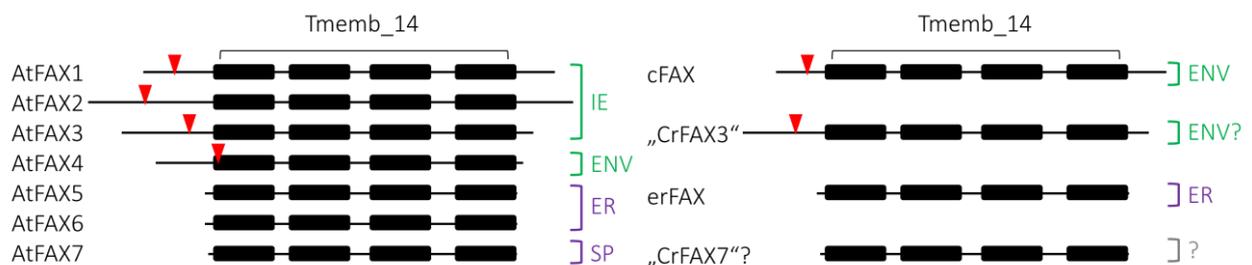
können, da nicht die FAX-Gene aus *C. sativa* zur Überexpression verwendet wurden, sondern die aus Arabidopsis. Des Weiteren ist anzumerken, dass *AtFAX1* orthologe Gene in *C. sativa* hauptsächlich im Samen und Keimlingen exprimiert werden (Cai et al., 2021), wohingegen *AtFAX1* in Arabidopsis im Vergleich zu anderen plastidären FAX-Proteinen nur gering im Samen exprimiert ist (Li et al., 2015).

Schlussfolgernd ist zu sagen, dass die Mechanismen zur Steigerung des Flusses von Fettsäuren in TAG in Pflanzen weitestgehend unverstanden sind. Studien wie die vorliegende zeigen nochmal klar auf, dass die Effekte der Überexpression bestimmter Gene dosisabhängig sind, aber nicht mit dem Transkriptlevel korrelieren müssen. Da der Proteingehalt von FAX1 und ABCA9 in der vorliegenden Studie nicht gemessen wurde, lässt sich der Einfluss des jeweiligen Proteingehalts auf den Phänotyp nicht bestimmen. Weitere Studien mit mehreren unabhängigen Linien sind erforderlich, um die genauen Mechanismen bei der Bildung von TAG aufklären zu können.

### 4.3 FAX-Proteine in *Chlamydomonas reinhardtii*

#### Die FAX-Proteinfamilie in *Chlamydomonas* – Wir sind zu viert!

Bis *dato* wurden FAX-Proteine in *Chlamydomonas* nur unzureichend untersucht. In dieser Studie konnten Mitglieder der FAX-Proteinfamilie vorgestellt und charakterisiert werden. Basierend auf Sequenzanalysen konnten in *Chlamydomonas* verwandte Proteine zu *AtFAX1*, *AtFAX3*, *AtFAX5/6* und *AtFAX7* identifiziert werden (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Mitglieder der FAX-Proteinfamilie in Arabidopsis und Chlamydomonas.** Die Proteinsequenzen mit Tmemb\_14-Domäne sind schematisch dargestellt. Schwarze Balken stellen  $\alpha$ -helikale Domänen dar. Die Schnittstellen für die stromale Peptidase (rote Dreiecke) wurden mit TargetP 2.0 (Armenteros et al., 2019) bestimmt. Die subzelluläre Lokalisation konnte für alle FAX-Proteine, mit Ausnahme von „CrFAX3“ und „CrFAX7“, experimentell bestimmt werden (Bugaeva et al., 2021; Könnel, 2021; Li et al., 2015, 2020, diese Studie). „CrFAX3“ stellt das zu *AtFAX3* verwandte Protein Cre08g383300 dar. „CrFAX7“ stellt das vermeintlich zu *AtFAX7* verwandte Protein Cre09g387838 dar. ENV: *chloroplast envelope*, ER: Endoplasmatisches Retikulum, IE: *inner envelope of chloroplast*, SP: *secretory pathway*.

FAX1-, FAX3- und FAX5/6-Proteine sind in Chlorophyta und Streptophyta konserviert, scheinen also eher eine fundamentale Rolle einzunehmen. AtFAX2 scheint spezifisch für Samenpflanzen zu sein und lässt sich in *Chlamydomonas* nicht vorfinden (Bugaeva et al., 2021). Ebenso scheint AtFAX4 eine samenspezifische Rolle zuzukommen (Li et al., 2020) und ist in *Chlamydomonas* nicht vorhanden. Ungewöhnlich erscheint das Vorhandensein von FAX7 in *Chlamydomonas*, da sich dieses Protein der FAX-Familie bisher nur in einigen wenigen Organismen identifizieren lässt (Bugaeva et al., 2021). Basierend auf phylogenetischen Analysen von Dr. Alexander Banguela-Castillo (Universität des Saarlandes, Lehrstuhl Pflanzenbiologie, AG Philippar, unveröffentlichte Daten) lassen sich cFAX und erFAX zwischen AtFAX1, AtFAX2 und AtFAX5/6 einordnen. Durch Sequenzanalysen ließen sich viele konservierte Domänen, die charakteristisch für FAX1- und FAX5/6-Proteine sind, in cFAX wiederfinden. Dies lässt vermuten, dass cFAX der Vorläufer von FAX1-, FAX2- und FAX5/6-Proteinen sein könnte und sich durch unterschiedliche subzelluläre Lokalisation sowie dem Vorhandensein eines verlängerten N-Terminus spezifische Funktionen im Laufe der Entwicklung von Landpflanzen ergeben haben. Sequenzanalysen der Tmemb\_14-Domäne (Bugaeva et al., 2021) sowie funktionelle Untersuchungen *in planta* (Könnel, 2021) belegen eindeutig, dass FAX1- und FAX5/6-Proteine eng verwandt sind und im gleichen Stoffwechselweg agieren. Damit bilden cFAX und erFAX in *Chlamydomonas* mit großer Wahrscheinlichkeit ein „Basis-Set“ der FAX-Proteine im Chloroplasten und ER/sekretorischen Weg ab. Ebenfalls konnte von Dr. Alexander Banguela-Castillo Cre08.g383300 („CrFAX3“) in eine Gruppe mit FAX3/FAX7-Proteinen eingeordnet werden, wohingegen Cre09.g387838 („CrFAX7“) zu einer heterogenen Gruppe von Proteinen aus recht verschiedenen Organismen (z.B. Ascomyceten, Oomyceten, Diatomeen), die nicht näher mit AtFAX1-AtFAX7 verwandt ist, zugeordnet wurde. Dies lässt darauf schließen, dass „CrFAX7“ keine fundamentale Rolle im Stoffwechsel von Pflanzen einnimmt und eine sehr spezifische Funktion aufweisen muss, die bis *dato* unbekannt ist. Auch in *Arabidopsis* zeigen *fax7 knockout* Mutanten keinen sichtbaren Phänotyp (Könnel, 2021), sodass die Funktion von FAX7- bzw. FAX7-verwandten Proteinen noch aufgeklärt werden muss. Dagegen scheinen FAX3-Proteine Basis- und/oder *Backup*-FAX-Proteine zu sein. In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass AtFAX3 partiell den Verlust von AtFAX1 in vegetativen Stadien ersetzen kann (Bugaeva et al., 2021; Li et al., 2015).

### **Die Proteine cFAX und erFAX können jeweils im Chloroplasten und ER lokalisiert werden**

Um die subzelluläre Lokalisation von cFAX und erFAX zu bestimmen, wurden eine Fraktionierung verschiedener Zellbestandteile mit anschließendem Western Blot sowie

indirekte Immunofluoreszenz durchgeführt. Laut Vorhersage (TargetP 2.0) befindet sich cFAX im Chloroplasten, wohingegen erFAX im ER/sekretorischen Weg vorhergesagt wird.

Für PsFAX1 konnte bereits eine Lokalisation in der inneren Hüllmembran mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Li et al., 2015), weshalb eine ähnliche Lokalisation für **cFAX** vermutet wurde. Das cFAX-Protein konnte nach Fraktionierung der Zellbestandteile in allen Fraktionen (Chloroplasten, Nuklei, Mitochondrien, Mikrosomen), mit Ausnahme des löslichen Überstandes, detektiert werden. Da alle Fraktionen, mit Ausnahme des Überstandes, eine grüne Farbe aufwiesen, scheinen Verunreinigungen durch Chloroplasten-Membranen in diesen Fraktionen vorhanden zu sein, was die Detektion von cFAX erklären würde. Beim Vergleich mit der Chloroplasten-Kontrolle LHC (*light harvesting complex*) wurde ein ähnliches Muster zu cFAX sichtbar. Dennoch scheint cFAX verstärkt auch in den Mitochondrien und der mikrosomalen Fraktion detektiert zu werden. Dies könnte auf die unterschiedliche Lokalisation von cFAX und LHC innerhalb des Chloroplasten zurückzuführen sein. cFAX wird, als orthologes Protein zu AtFAX1, in der inneren Hüllmembran vermutet, wohingegen LHC-Proteine in den Thylakoiden vorzufinden sind. Da die Chloroplasten-Hüllmembran in direktem Kontakt zu anderen Organellen steht (Andersson et al., 2007; Pérez-Sancho et al., 2016), ist eine Übertragung von Proteinen in Fraktionen anderer Organellen durch Ultraschallbehandlung deutlich wahrscheinlicher. Des Weiteren wird vermutet, dass FAX-Proteine membranbiegende Funktionen aufweisen können (Könnel et al., 2019), weshalb ein durch cFAX vermittelter Kontakt zwischen den Hüllmembranen der Chloroplasten und Mitochondrien oder Mikrosomen begünstigt werden könnte. Um das Detektionsmuster von cFAX über Western Blots genauer analysieren zu können, muss in weiterführenden Versuchen eine Proteinkontrolle in der Chloroplasten-Hüllmembran, vorzugsweise im IE, gewählt werden. Ein weiteres Indiz für die Lokalisation von cFAX im Chloroplasten lieferte die massenspektrometrische Bestimmung einer abspaltbaren N-terminalen Signalsequenz, die exakt mit der vorhergesagten Länge für ein Chloroplasten-Transitpeptid (TargetP 2.0) übereinstimmte. Durch indirekte Immunofluoreszenz konnte gezeigt werden, dass cFAX in den Chloroplasten-Hüllmembranen lokalisiert ist. Basierend auf diesen Erkenntnissen sowie dem Vergleich mit FAX1-Proteinen von Erbse und Arabidopsis ist cFAX mit großer Wahrscheinlichkeit in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten lokalisiert.

Die nur schwachen Signale des **erFAX**-Antiserums in der membranangereicherten Fraktion (Fraktionierung durch Gefrier-Auftau-Zyklen) war zu Beginn der Experimente überraschend, da erFAX ein integrales Membranprotein mit vier  $\alpha$ -helikalen Membrandomänen darstellt. Da die Membranfraktion in diesem Experiment aber nur mit einer geringen *g*-Kraft pelletiert wurde, befanden sich im Überstand die mikrosomalen Membranen, die aus Abschnürungen des ER beim Zellaufschluss entstehen (Eriksson et al., 1978). In diesem Überstand wurde erFAX angereichert, was ein Indiz für eine ER-Lokalisation darstellt. Nach einer differentiellen

Zentrifugation mit deutlich höheren  $g$ -Kräften konnte erFAX zusammen mit mikrosomalen Membranen pelletiert und im Western Blot detektiert werden. Als ER-Kontrollen wurden das Membranprotein CrABCA2 und das ER-Lumen Protein BiP (*binding immunoglobulin protein*) verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde CrABCA2 überraschenderweise hauptsächlich in der Fraktion der Mitochondrien detektiert. CrABCA2 ist ein ABC-Transporter, ortholog zu AtABCA9, und transportiert Substrate zur TAG-Synthese ins ER. Die Lokalisation von CrABCA2 im ER wurde durch Jang et al. (2020) in einer mikrosomalen Fraktion durch das Ablösen von Ribosomen des ER und einem darauffolgenden Protein-Shift in einem Saccharose-Dichtegradienten nachgewiesen. Zusätzlich konnte eine Immunogold-Markierung zeigen, dass CrABCA2 in einem spezifischen Bereich des ER, dem geschwollenen ER, lokalisiert ist (Jang et al., 2020). In der vorliegenden Studie wurde eine differentielle Zentrifugation nach Jang et al. (2020) durchgeführt, um mikrosomale Membranen und Zellorganellen aufzureinigen. Hier konnte CrABCA2 mit einer hohen Signalintensität in der Mitochondrien-Fraktion detektiert werden, aber auch in geringerer Intensität in Chloroplasten sowie der mikrosomalen Fraktion. In der Publikation von Jang et al. wird kein Western Blot aller zellulären Fraktionen gezeigt, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass CrABCA2 auch dort in der Mitochondrien-Fraktion angereichert wurde. Es wurden ebenfalls keine ER-unabhängigen Kontrollen nach Zentrifugation auf einem Saccharose-Dichtegradienten verwendet, weshalb der Protein-Shift auch durch anheftende mitochondriale Verunreinigungen am ER sichtbar sein könnte. Die Lokalisation von CrABCA2 im geschwollenen ER wirft ebenfalls Fragen auf, da dieses Subkompartiment in *Chlamydomonas* bis *dato* nicht charakterisiert ist. Dennoch könnte gerade diese spezielle Lokalisation dazu führen, dass CrABCA2 in der Mitochondrien-Fraktion angereichert wird. Da CrABCA2 weitergehend erforscht werden muss, ist dieses Protein als Kontrolle ungeeignet, um die Lokalisation von erFAX zu verifizieren. Als lumenale ER-Kontrolle wurde daher ein Antiserum gegen BiP-Proteine gewählt, die Teil der HSP70-Proteinfamilie sind (Schroda, 2004; Yu et al., 2015) und an der Proteinfaltung sowie Qualitätskontrolle von Proteinen im ER-Lumen beteiligt sind (Kleizen & Braakman, 2004). BiP konnte in der mikrosomalen Fraktion durch ein schwaches Signal detektiert werden. Es wurden zusätzlich vermeintliche Hintergrundbanden im Nukleus und Chloroplasten detektiert. Da die Identität der detektierten Banden nicht zweifelsfrei geklärt ist, liefert die Detektion von BiP nur Indizien für den Nachweis der mikrosomalen Fraktion. Da alle ER-Kontrollen uneindeutige Ergebnisse lieferten, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Antikörper getestet. Es wurden die Hefe-spezifischen Antikörper ScBIP, ScPDI, ScSec61 $\alpha$  und ScSec61 $\alpha$  getestet, die gegen verschiedene ER-Proteine gerichtet sind. Mit keinem der Antiseren konnten Proteine in *Chlamydomonas* nachgewiesen werden, was vermutlich auf einer zu geringen Sequenzähnlichkeit der orthologen Proteine beruht. Infolgedessen müssen

in weiterführenden Immunoblot-Versuchen ER-Kontrollen etabliert werden, um die mikrosomale Fraktion bzw. das ER-Subkompartiment für erFAX als solche zu verifizieren.

Um die Lokalisation von erFAX weiterhin näher zu bestimmen, wurde indirekte Immunofluoreszenz angewandt. Hier konnte erFAX im ER/Nukleus lokalisiert werden. Vergleicht man die Signalverteilung von erFAX mit den Signalen der im ER-Lumen lokalisierten mVenus-Kontrolle, lässt sich ein ähnliches Muster erkennen. Auch beim Vergleich mit GFP-*targeting* Studien von Mackinder et al. (2017) lässt sich eine klare Ähnlichkeit der Signalverteilung von erFAX zu ER-Proteinen feststellen. So zeigt beispielsweise BiP1-GFP als lumenales ER-Protein in *Chlamydomonas* ein Signal um den Nukleus sowie Ausstülpungen ins Zytosol (Mackinder et al., 2017).

Zusätzlich wurde erFAX mit einem C-terminalen HA-Tag in *Chlamydomonas* exprimiert. Immunofluoreszenz mit HA-Antikörpern zeigten vesikelförmige Signale um den Nukleus, die einer Signalverteilung von Proteinen des Golgi-Apparates und sekretorischen Wegs entsprechen (Mackinder et al., 2017). Von Könnel (2021) konnte für die zu erFAX orthologen Proteine AtFAX5 und AtFAX6 in *Arabidopsis* gezeigt werden, dass eine Markierung mit einem N-terminalen GFP-Tag zu einer Ko-Lokalisation mit einem ER-Marker führt, wohingegen ein C-terminaler GFP-Tag zu einer Lokalisation im Trans-Golgi-Netzwerk und frühen Endosomen führt. In FAX5/6-Proteinen ist das Motiv „KXE/D“ am C-Terminus konserviert und wurde als Golgi-Retensionssignal beschrieben (Gao et al., 2012, 2014; Könnel, 2021). Interessanterweise ist dieses Motiv in erFAX in Form von „KAH“ zu finden. Von Gao et al. (2012) konnte gezeigt werden, dass die Substitution von „E/D“ durch Alanin zu einem *mistargeting* in Post-Golgi-Kompartimente und damit zu einem Verlust des Golgi-Retensionssignals führt. Ebenfalls anzumerken ist das Vorhandensein des „KXE/D“-Motivs in cFAX, welches, auf Grundlage der vorliegenden Studie, im Chloroplasten lokalisiert ist. Basierend auf diesen Ergebnissen scheint das Motiv „KXE/D“ in FAX5/6-Proteinen kein Golgi-Retensionssignal darzustellen, da ein N-terminaler GFP-Tag in AtFAX5/6 und auch das modifizierte Motiv „KAH“ in erFAX in *Chlamydomonas* zu einer ER-Lokalisation führt. Es scheint, dass ein noch unbekanntes ER-Retensionssignal am C-Terminus von FAX5/6-Proteinen existiert, welches durch einen GFP- (Könnel, 2021) oder durch einen HA-Tag (diese Studie) maskiert wird und damit in diesen Studien zu einer Fehllokalisierung im Golgi-Apparat und Trans-Golgi-Netzwerk beziehungsweise frühen Endosomen führt. Da in der vorliegenden Studie indirekte Immunofluoreszenz mit unveränderten Proteinen in wildtypischen *Chlamydomonas*-Zellen durchgeführt wurde, sind die Ergebnisse der Lokalisationsbestimmung akkurat und aussagekräftig und werden nicht durch Protein-Tags beeinflusst. Basierend auf dem Nachweis von erFAX durch Western Blot-Analysen in der mikrosomalen Fraktion sowie der ER-typischen Signalverteilung durch Immunofluoreszenz lässt sich erFAX mit hoher Wahrscheinlichkeit im ER lokalisieren. Dennoch kann eine

zusätzliche Lokalisation im Golgi-Apparat oder frühen Endosomen nicht vollends ausgeschlossen werden. Die Lokalisationsbestimmung von erFAX im ER widerspricht somit der Annahme von Li et al. (2019), dass erFAX in der Chloroplasten-Hüllmembran lokalisiert sein soll.

### **In Chlamydomonas sind FAX-Proteine am Lipidmetabolismus beteiligt**

Um die Funktion von cFAX und erFAX in Chlamydomonas näher zu untersuchen, wurden Überexpressionslinien generiert und *knockdown*-Linien über artifizielle microRNA erzeugt. Zu Beginn wurde geprüft, ob das auf Transkriptebene basierende Ergebnis von Li et al. (2019), dass die Überexpression von *erFAX* zu einer gesteigerten Expression von *cFAX* führt, auch auf Proteinebene sichtbar ist. Es konnte herausgefunden werden, dass das Proteinlevel von erFAX durch die Überexpression von cFAX (und *vice versa*) nicht beeinflusst wird. Zur Generierung der *knockdown*-Linien wurde der *NIT1*-Promotor verwendet, welcher nach Wechsel der Stickstoffquelle von Ammonium zu Nitrat induziert wird (Fernandez et al., 1989; Loppes et al., 1999). Für cFAX konnten Linien identifiziert werden, die nach Induktion ein deutlich geringeres cFAX-Level aufwiesen als unter nicht-induzierenden Bedingungen. Des Weiteren wurden Linien identifiziert, die auch unter nicht-induzierenden Bedingungen ein geringes cFAX-Level aufwiesen. Es ist bekannt, dass der *NIT1*-Promotor, abhängig vom Insertionsort im Genom, eine konstitutive Expression aufweisen kann (Rücksprache mit Prof. Dr. Michael Schroda, TU Kaiserslautern), was das Auftreten dieser konstitutiven cFAX-*knockdown*-Linien erklärt. Bei Betrachtung der erFAX-*knockdown*-Linien konnten keine Linien identifiziert werden, die einen typischen Abfall der Proteinmenge nach Induktion zeigten. Es wurden Linien identifiziert, die unter nicht-induzierenden Bedingungen ein deutlich geringeres erFAX-Proteinlevel aufwiesen als die Elternkontrolle. Überraschenderweise stieg das erFAX-Level nach Induktion im Verlauf von zwei Tagen an und erreichte in manchen Linien das Niveau der Elternkontrolle. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass unter einem bestimmten erFAX-Level die Expression von erFAX drastisch induziert wird, was zu einem Anstieg der erFAX-Proteinmenge führt. In der Elternlinie cw15-325 konnte keine Änderung der erFAX-Proteinmenge nach Inkubation in Induktionsmedium nachgewiesen werden, weshalb ein genereller Einfluss des verwendeten Mediums auf das erFAX-Proteinlevel ausgeschlossen werden kann. In weiterführenden Studien könnten Chlamydomonas-Zellen für mehrere Tage in Induktionsmedium inkubiert und anschließend das Medium zu nicht-induzierenden Bedingungen gewechselt werden, um Rückschlüsse auf die Dynamik der Expressionsregulation zu erhalten. Dennoch konnten die konstitutiven *knockdown*-Linien für cFAX und erFAX unter nicht-induzierenden Bedingungen für weitere Versuche verwendet werden.

Die Überexpressions- und *knockdown*-Linien zeigten sowohl unter Normalbedingungen als auch unter Stickstoffmangel kein Wachstumsdefizit (Daten in dieser Arbeit und teilweise belegt durch Versuche der AG Li-Beisson, CEA Cadarache, Frankreich). *Chlamydomonas* bildet unter Nährstoffmangel vermehrt TAG als Kohlenstoff- und Energiespeicher, um unwirtliche Umweltbedingungen zu überstehen (Goncalves et al., 2016; Merchant et al., 2012). Der ausbleibende Wachstumsphänotyp der cFAX- und erFAX-Linien deutet darauf hin, dass den beiden FAX-Proteinen keine fundamentale Rolle bei den getesteten Bedingungen zukommt. Dennoch konnten Hinweise gefunden werden, dass nach Überführung von *Chlamydomonas*-Zellen in stickstoffarmes Medium das Proteinlevel von cFAX ansteigt, wohingegen das Proteinlevel von erFAX abnimmt. Dies könnte darauf hindeuten, dass cFAX maßgeblich an der längerfristigen Bildung von TAG beteiligt ist, wohingegen erFAX nur zu Beginn der TAG-Produktion beteiligt sein könnte. Es sind weiterführende Studien notwendig, in denen die Proteinmenge quantifiziert werden muss, um Rückschlüsse auf das Ausmaß der Regulation von cFAX und erFAX unter Stickstoffmangel zu ziehen.

Durch eine Anfärbung mit Nilrot konnte indirekt der Einfluss durch Überexpression oder *knockdown* der FAX-Proteine auf die TAG-Produktion gemessen werden. Der Verlauf der Nilrot-Fluoreszenz beim Wachstum unter Stickstoffmangel zeigte, dass alle Überexpressionslinien nach sechs Tagen eine deutlich stärkere Fluoreszenz aufwiesen als die Elternlinie, was auf eine verstärkte Bildung von TAG zurückzuführen ist. Auch ein schnellerer Abbau von Chlorophyll ist in den Überexpressionslinien im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen, was einen Hinweis auf eine schnellere Reaktion auf Stickstoffmangelbedingungen liefern könnte. Die Nilrot-Fluoreszenz konnte in den *knockdown*-Linien nur unter Normalbedingungen gemessen werden. Hier zeigte sich in allen Linien eine tendenziell niedrigere Fluoreszenz im Vergleich zur Elternlinie, was auf einen geringeren TAG-Gehalt hindeutet. Hier sollte angemerkt werden, dass für Nilrot-Messungen alle Proben auf die gleiche OD750 eingestellt wurden, um sie miteinander vergleichen zu können. Änderungen der Zellzahl oder Zellgröße konnten mit dieser Messmethode nicht miteingeschlossen werden.

Um den eigentlichen TAG-Gehalt der Proben zu bestimmen, wurden Lipide aus den Überexpressions- sowie *knockdown*-Linien in der Arbeitsgruppe von Dr. Yonghua Li-Beisson (CEA Cadarache/Aix-Marseille Universität, Frankreich) extrahiert und deren Gehalt über Dünnschichtchromatographie bestimmt. In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich der TAG-Gehalt in stickstoffhaltigem Medium zwischen den Linien unterscheidet (Daten nicht gezeigt). So konnten für die cFAX-Überexpressionslinien ein deutlicher Anstieg des TAG-Gehalts gemessen werden, wohingegen der TAG-Gehalt in den erFAX-Überexpressionslinien vergleichbar mit der Elternlinie war. In allen *knockdown*-Linien für cFAX und erFAX konnten deutlich weniger TAG im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden.

In den vermeintlichen FAX-Überexpressionslinien von Li et al. (2019), in denen die „Überexpression“ auf Transkriptebene für *cFAX* ca. 1,5fach und für *erFAX* ca. 1,3fach im Vergleich zur Elternlinie betrug, konnte ein erhöhter TAG-Gehalt der Chlamydomonas-Zellen in stickstoffhaltigem Medium gemessen werden. Im Vergleich dazu wurde in der vorliegenden Arbeit kein erhöhter TAG-Gehalt in den *erFAX*-Überexpressionslinien, die *erFAX* auf Proteinebene 2,5 bis 2,7fach im Vergleich zur Elternlinie überexprimierten, gemessen. Des Weiteren wurde in der Studie von Li et al. ein beeinträchtigt Wachstum der *cFAX*- und *erFAX*-Überexpressionslinien beobachtet, was in der vorliegenden Arbeit sowie in Experimenten der AG Li-Beisson (Daten nicht gezeigt) nicht bestätigt werden konnte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in der Studie von Li et al. andere Ursachen als die „Überexpression“ der FAX-Gene für die sichtbaren Phänotypen der vermeintlichen Überexpressionslinien in Chlamydomonas verantwortlich sein könnten. So könnte beispielsweise die Insertion der DNA-Konstrukte zur Überexpression der FAX-Gene in ein anderes, bedeutsames Gen in Chlamydomonas zu einem Wachstumsphänotyp führen und/oder eine Stressreaktion auslösen, die zur Bildung von TAG führt.

Basierend auf den Erkenntnissen der vorliegenden Studie sowie den Messungen der AG Li-Beisson lässt sich schlussfolgern, dass sowohl *cFAX* als auch *erFAX* an der Bildung von TAG in Chlamydomonas beteiligt sind. Man kann vermuten, dass *cFAX* hierbei eine größere Rolle zu spielen scheint, da das Proteinlevel unter Stickstoffmangel ansteigt und in den Überexpressionslinien mehr TAG unter Standardbedingungen gemessen werden konnte.

### **FAX-knockdown-Linien zeigen einen *green-in-the-dark*-Phänotyp**

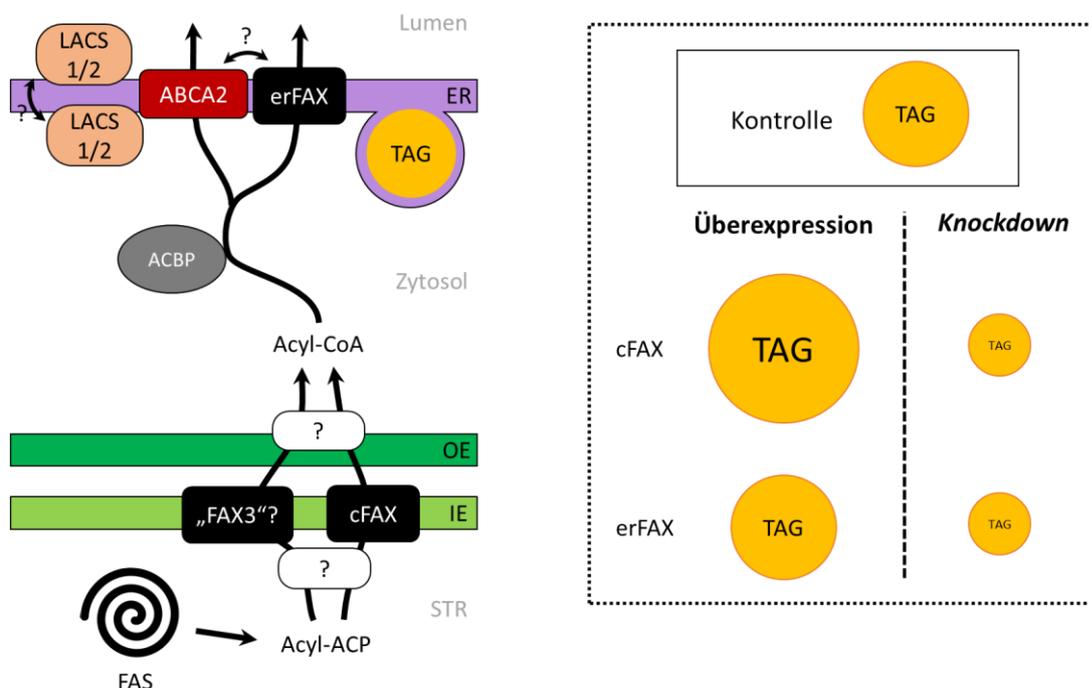
Bei Betrachtung der Chlamydomonas-Zellen nach zwei Wochen Inkubation in Dunkelheit, konnte in den Überexpressionslinien sowie der Elternkontrolle eine gelbliche Färbung beobachtet werden. Dies ist untypisch für Chlamydomonas-Zellen, da diese auch in Dunkelheit grün bleiben sollten (Rücksprache mit Prof. Dr. Michael Schroda, TU Kaiserslautern). Der *yellow-in-the-dark*-Phänotyp scheint hier auf einer Hintergrundmutation in der Elternlinie UVM4 zu basieren. Chlamydomonas ist im Gegensatz zu Samenpflanzen, außer während einer kurzen Zygoten-Phase im Zuge der sexuellen Fortpflanzung, haploid und kann sich auch in diesem Zustand asexuell vermehren. Das heißt, es können sich über die Zeit Mutationen ansammeln, die eine direkte Auswirkung auf die Chlamydomonas-Zellen haben können. Der *yellow-in-the-dark*-Phänotyp konnte auch für die Kontrolle der Elternlinie cw15-325 gezeigt werden, was ebenfalls auf Hintergrundmutationen zurückzuführen sein könnte. Interessanterweise zeigten die *knockdown*-Linien einen *green-in-the-dark*-Phänotyp, konnten also den *yellow-in-the-dark*-Phänotyp überwinden. Chlamydomonas-Mutanten, die einen *yellow-in-the-dark*-Phänotyp aufweisen, sind in der Literatur bereits beschrieben. So konnten bereits Ohad et al. (1967) die *y-1* Mutante charakterisieren, die nur einen partiell differenzierten

Chloroplasten in Dunkelheit aufweist. Der *yellow-in-the-dark*-Phänotyp basiert nach heutigem Stand auf einem Defekt in der lichtunabhängigen Protochlorophyllid-Reduktion. Der genaue Wirkmechanismus von Mutanten, die einen *yellow-in-the-dark*-Phänotyp aufweisen, ist bis *dato* ungeklärt (Cahoon & Timko, 2000). Da nicht bekannt ist, worauf die Gelbfärbung in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen beruht, können keine klaren Aussagen über den Einfluss des *knockdowns* der FAX-Gene auf den *green-in-the-dark*-Phänotyp getroffen werden. Allerdings ist dieser Phänotyp spezifisch für die Linien, die einen *knockdown* von cFAX und erFAX zeigen und sollte daher weiterführend untersucht werden. Hier sollte weiterhin angemerkt werden, dass der *NIT1*-Promotor (genutzt für die *knockdown*-Linien) durch Licht beeinflusst werden kann. In Dunkelheit wurde eine geringe Expression des nachfolgenden Gens durch den *NIT1*-Promotor nachgewiesen (Koblenz & Lechtreck, 2005; Loppes et al., 1999). Da konstitutive Mutanten verwendet wurden, muss in weiterführenden Studien getestet werden, ob der Proteingehalt von cFAX und erFAX in den *knockdown*-Linien durch Lichtverhältnisse beeinflusst wird. Der Einfluss von Dunkelheit auf die Expression durch den *PSAD*-Promotor, der für die Überexpression verwendet wurde, muss ebenfalls untersucht werden.

### **FAX-Proteine in Chlamydomonas – Ein Modell für den Transport von Fettsäuren**

Ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Studie scheinen cFAX und erFAX im Lipidmetabolismus eine wichtige Rolle zu spielen. Von Takemura et al. (2019) wurde bereits das AtFAX1-verwandte Protein CmFAX1 in der Rotalge *C. merolae* untersucht. Hier konnte durch Immunofluoreszenz eine Lokalisation von CmFAX1 in der Chloroplasten-Hüllmembran und eine Beteiligung an der TAG-Produktion nachgewiesen sowie durch heterologe Expression in Hefe eine Funktion im Fettsäuretransport belegt werden. Aufgrund von Sequenzähnlichkeit von cFAX zu AtFAX1, der Lokalisation von cFAX in der Chloroplasten-Hüllmembran sowie einer Beteiligung in der TAG-Produktion kann davon ausgegangen werden, dass cFAX einen *missing link* im Fettsäureexport aus dem Chloroplasten in Chlamydomonas darstellt. Es kann vermutet werden, dass cFAX, ebenso wie AtFAX1, an der Membranbiegung und an der Vermittlung von Membrankontaktstellen beteiligt sein könnte. Interessanterweise zeigen cFAX-*knockdown*-Linien einen deutlich verringerten TAG-Gehalt, was dafürspricht, dass „CrFAX3“ (ortholog zu AtFAX3) die Funktion von cFAX nicht komplett ersetzen kann. In Arabidopsis scheint AtFAX3 auch nur partiell den Verlust von AtFAX1 in vegetativen Stadien ersetzen zu können (Bugaeva et al., 2021; Li et al., 2015), was auf eine besondere Rolle von FAX1-Proteinen hindeutet. Ebenso zeigen erFAX-*knockdown*-Linien einen verringerten TAG-Gehalt. Ähnlich zu AtFAX1 und AtFAX5/6 scheinen cFAX und erFAX daher im selben Stoffwechselweg beteiligt zu sein.

Wenn man die Hypothese aufstellt, dass cFAX am Fettsäureexport aus dem Chloroplasten und erFAX am Fettsäureimport in das ER beteiligt sind sowie TAG im ER von *Chlamydomonas* gebildet wird, lassen sich die gemessenen TAG-Gehalte der Überexpressions- und *knockdown*-Linien nach folgendem Modell erklären (Abbildung 30). So führt die Überexpression von cFAX zu einem verstärkten Export von Fettsäuren, die durch Inkorporation in TAG im ER gespeichert werden, ähnlich zur Überexpression von AtFAX1 in Arabidopsis (Li et al., 2015; Tian et al., 2018). Die Überexpression von erFAX zeigt hier keinen starken Effekt, da nicht mehr Fettsäuren für den Import zur Verfügung stehen, die in TAG eingebaut werden können. Unter Stickstoffmangel zeigen alle Überexpressionslinien einen Effekt, da hier ein großer Fettsäuren-Pool aus der induzierten *de novo* Fettsäuresynthese aufgebaut wird, der in die Produktion von TAG fließt (Yang et al., 2018). In *knockdown*-Linien ist sowohl der Export von Fettsäuren aus dem Chloroplasten als auch der Import von Fettsäuren ins ER gestört, weshalb weniger Fettsäuren in TAG eingebaut werden können.



**Abbildung 30: Modell für den intrazellulären Transport von Fettsäuren in *Chlamydomonas reinhardtii* sowie deren Inkorporation in TAG.** Dargestellt sind Proteine, die am Fettsäuretransport beteiligt sind, sowie noch unbekannte Transporter (Fragezeichen). Das zu AtFAX3 orthologe Protein Cre08.g383300 wird hier mit „FAX3“ abgekürzt. In *Chlamydomonas* wurden LACS1 und LACS2 nur funktionell charakterisiert (Bai et al., 2021; Li et al., 2016b) und werden am ER vermutet. Eine mögliche Interaktion von ABCA2 und erFAX, um Fettsäuren in das ER zu transportieren, wäre vorstellbar. Zusätzlich wurde die veränderte TAG-Produktion in stickstoffhaltigem Medium in FAX-Mutanten im Vergleich zur Kontrolle dargestellt (rechts). ABCA: ATP-binde Kasette Unterfamilie A, ACBP: Acyl-CoA-Bindeprotein, ACP: Acyl-Carrier-Protein, CoA: Coenzym A, ER: Endoplasmatisches Retikulum, FAS: *fatty acid synthase*, FAX: *fatty acid export*, IE: *inner envelope of chloroplast*, LACS: *long-chain acyl-CoA synthetase*, OE: *outer envelope of chloroplast*, STR: Stroma, TAG: Triacylglycerol.

## 5. Fazit und Ausblick

In dieser Studie konnten die Membrantopologie sowie Orientierung von FAX1-, FAX2- und FAX3-Proteinen in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten weitestgehend aufgeklärt werden. FAX2 scheint im Gegensatz zu FAX1 und FAX3 eine invertierte Membrantopologie aufzuweisen, was auf eine spezifische Funktion von FAX2 und der Apolipoprotein-Domäne in Samenpflanzen hindeutet. Um die Membrantopologie der FAX-Proteine unabhängig zu bestätigen, könnte zukünftig ein Split-GFP basiertes System angewandt werden (Xie et al., 2017). In Kombination mit FAX-Mutanten, die einen verkürzten N-Terminus oder eine Mutation in konservierten Domänen/Motiven (zum Beispiel im „PPPKK“-Motiv von FAX1) aufweisen, könnte deren Einfluss auf die Membrantopologie eruiert werden.

Mit Hilfe eines GFP-*pull down*-Assays konnten mögliche Interaktionspartner von FAX1 identifiziert und vermeintliche Wirkmechanismen diskutiert werden. Um direkte Protein-Protein-Interaktionen zu bestätigen, sollte in Zukunft ein Split-Ubiquitin basiertes Membran-*yeast two-hybrid* (MYTH) System verwendet (Petschnigg et al., 2012; Snider et al., 2010) oder ein *bimolecular fluorescence complementation* (BiFC)-Assay angewandt werden (Kudla & Bock, 2016). Hierzu wurde erst kürzlich ein *Modular Cloning*-basiertes BiFC (MoBiFC)-System veröffentlicht, welches für chloroplastidäre Proteine etabliert wurde (Velay et al., 2021). Da im Rahmen dieser Studie der GFP-*pull down*-Assay etabliert wurde, könnten auch Interaktionspartner der anderen FAX-Proteine durch Expression GFP-getaggtter Proteinversionen in nachfolgenden Versuchen identifiziert werden. Hier sollte eine membranverankerte GFP-Kontrolle etabliert werden, die keine Interaktion mit anderen Proteinen eingehen sollte, um die Aussagekraft der ermittelten Daten zu erhöhen.

Eine weitere Methode, um Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* nachzuweisen, stellt das *Proximity labeling* dar (Übersicht in Mair et al., 2019 und Yang et al., 2021). Durch kovalente Markierung aller sich in der Nähe des zu untersuchenden Proteins befindlichen Proteine und nachfolgender massenspektrometrischer Analyse können so Proteine identifiziert werden, die mit dem zu untersuchenden Protein in Interaktion getreten sind. Das *Proximity labeling* kann auch zur Aufklärung der Membrantopologie von Proteinen genutzt werden (Kwak et al., 2020). Ein Variante des *Proximity labeling* stellt das *Split-Proximity labeling* dar, welches zum Nachweis von Interaktionspartnern transienter Proteinkomplexe oder zur Untersuchung von Membrankontaktstellen herangezogen werden kann (Hung et al., 2017; Jing et al., 2015). Aufgrund der vielen Anwendungsmöglichkeiten des *Proximity labeling* könnte eine Etablierung dieser Methode in Arabidopsis mit FAX1 viele bis *dato* gewonnene Ergebnisse untermauern und neue Erkenntnisse in Bezug zum Fettsäuretransport über die Chloroplasten-Hüllmembranen liefern.

Zur Steigerung der TAG-Produktion in Samen wurde *FAX1* zusammen mit *ABCA9* überexprimiert. Hier konnte gezeigt werden, dass die gemeinsame Überexpression in Arabidopsis keine signifikanten additiven Effekte in Bezug auf das Wachstum, das Samengewicht oder die Samenmenge zur Folge hatte. Von Cai et al. (2021) wurden AtFAX1 und AtABCA9 in *C. sativa* exprimiert. Hier zeigten Doppelüberexprimierer additive Effekte bezüglich der TAG-Produktion und der Samenmenge. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ergebnisse aus Studien zu Arabidopsis nicht ohne Weiteres auf andere Organismen übertragen werden können und viele Mechanismen, welche zur Regulation der TAG-Produktion beitragen, weitestgehend unverstanden sind. Dennoch scheinen FAX-Proteine ein nutzbares Werkzeug zu sein, um die Ölproduktion in Nutzpflanzen zu erhöhen. Insbesondere Ölsamenpflanzen aus der Familie der Brassicaceae werden als potenzielle Nutzpflanzen zur Biokraftstoffgewinnung untersucht (Hossain et al., 2019). So wird beispielsweise *Brassica carinata* (Äthiopischer Senf) als wichtiger Kandidat für die Biokraftstoffherstellung angesehen, da diese Nutzpflanze gegen verschiedene Umweltbedingungen tolerant ist und deren Öl ein nutzbares Fettsäureprofil aufweist (Seepaul et al., 2021). Basierend auf den Erkenntnissen der vorliegenden Studie könnte durch die Regulation von FAX1 oder ABCA9 mithilfe intelligenter Züchtungsverfahren oder gentechnischer Methoden gezielt die Ölproduktion in *B. carinata* gesteigert werden, um diese Nutzpflanze industriell nutzbar einsetzen zu können.

Eine ganz zentrale Fragestellung dieser Arbeit war die Untersuchung von Mitgliedern der **FAX-Proteinfamilie in Chlamydomonas**. Es konnten FAX1-, FAX3-, und FAX5/6-Proteine in Chlamydomonas identifiziert werden. Die Zuordnung eines vermeintlichen FAX7-Proteins konnte nicht eindeutig geklärt werden und bedarf weiterer phylogenetischer Analysen. Die zu AtFAX1 und AtFAX5/6 orthologen Proteine in Chlamydomonas wurden mit cFAX und erFAX benannt, basierend auf der jeweiligen Lokalisation im Chloroplasten und ER. Die Lokalisation konnte durch Aufreinigung verschiedener Zellkompartimente sowie indirekter Immunofluoreszenz eindeutig belegt werden. Weiterhin konnte durch Nilrot-Experimente gezeigt werden, dass cFAX und erFAX am Lipidmetabolismus beteiligt sind. In Zusammenarbeit mit der AG Li-Beisson konnte unter Standardbedingungen ein höherer TAG-Gehalt in cFAX-Überexpressionslinien, und ein geringerer TAG-Gehalt in cFAX- und erFAX-*knockdown*-Linien im Vergleich zu den Kontrollen gemessen werden. Das cFAX-Protein stellt damit einen *missing link* im Fettsäureexport aus dem Chloroplasten in Chlamydomonas dar. Basierend auf den Ergebnissen der beiden FAX-Proteine, scheint erFAX am Fettsäureimport ins ER und damit im gleichen Stoffwechselweg zur TAG-Produktion wie cFAX beteiligt zu sein. Ausstehend ist hier der direkte Nachweis einer Fettsäuretransportfunktion, wie es von Li et al. (2015) und Könnel (2021) bereits für mehrere FAX-Proteine aus Arabidopsis durch heterologe Expression in Hefe gezeigt wurde. Um die Ölproduktion in Chlamydomonas weiter zu erhöhen, könnten FAX-Proteine in Mutanten überexprimiert werden, die bereits TAG vermehrt bilden.

So könnten die Mutanten *std1* (*starch degradation 1*), die einen Verlust in der Ermittlung der Kohlenstoff-Speicherkapazität aufweist (Schulz-Raffelt et al., 2016), oder *mdh2* (*malate dehydrogenase 2*), welche in der Kommunikation zwischen Chloroplast und Peroxisom gestört ist (Kong et al., 2018), verwendet werden, um TAG-hyperakkumulierende Chlamydomonas-Linien zu generieren. Ebenso könnten Linien verwendet werden, die in ihrer Stärkebiosynthese blockiert sind (*sta6*, *starchless mutant*; Wang et al., 2009; Zabawinski et al., 2001). Hierbei ist anzumerken, dass diese Linien nur unter Stickstoffmangel TAG akkumulieren. Dass cFAX-Überexpressionslinien auch unter Normalbedingungen mehr TAG aufweisen, könnte auf eine zentrale Rolle von cFAX im Lipidmetabolismus hindeuten. Die Erkenntnisse in der Hyperakkumulation von Öl in Algen könnte in der Herstellung von Nahrungsergänzungsmitteln oder gesundheitsfördernder Substanzen („Nutraceuticals“) genutzt werden sowie Anwendung in der Biokraftstoffproduktion finden. Die Anzucht von Algen ist nicht von landwirtschaftlicher Nutzfläche abhängig und konkurriert daher nicht mit Nutzpflanzen für die Nahrungs- und Futtermittelproduktion, wie es bei Nutzpflanzen zur Biokraftstoffgewinnung der Fall ist (Übersicht in Ganesan et al., 2020 und Li-Beisson et al., 2019).

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate bieten erstmals ein umfassendes *proof-of-principle* der Funktion der FAX1/cFAX- und FAX5/6/erFAX-Proteine im Fettsäuretransport und Lipidmetabolismus in *Chlamydomonas reinhardtii*. Ergebnisse aus Arabidopsis konnten somit auch in der Modellgrünalge bestätigt werden. Ähnlich zu Arabidopsis scheinen cFAX und erFAX im gleichen Stoffwechselweg involviert zu sein. Da die zu erFAX orthologen Proteine in Arabidopsis, AtFAX5 und AtFAX6, bis dato nur unzureichend untersucht wurden, können die Ergebnisse in Chlamydomonas Hinweise dafür liefern, dass AtFAX5 und AtFAX6 am Fettsäureimport ins ER beteiligt sind. Generell scheinen FAX1- und FAX5/6-Proteine eine zentrale Rolle im Lipidmetabolismus zu spielen, deren Funktion nicht komplett durch andere FAX-Proteine ersetzt werden kann. Vergleichende Sequenzanalysen konnten konservierte Sequenzmotive aufzeigen, die für die Funktion des jeweiligen Proteins eine fundamentale Rolle spielen könnten. Die vorliegenden Ergebnisse zu den Chlamydomonas FAX-Proteinen gestatten damit erstmals den direkten Vergleich zwischen FAX-Proteinen einer Unterfamilie in den Modellorganismen Arabidopsis und Chlamydomonas. Daher werden in Zukunft zentrale Aussagen über die Evolution, Struktur, Lokalisation und Funktion dieser Proteine in dem Reich der Viridiplantae/Chlorobionta ermöglicht. Die Aufklärung von möglichen Interaktionspartnern sowie dem Wirkmechanismus des Fettsäuretransports können somit wesentlich zum Verständnis des Lipidstoffwechsels in Pflanzen beitragen und den Weg zur biotechnologisch relevanten Nutzbarmachung der Erkenntnisse ebnen.

## 6. Literatur

- Andersson, M. X., & Dörmann, P. (2008). *Chloroplast Membrane Lipid Biosynthesis and Transport*. [https://doi.org/10.1007/7089\\_2008\\_18](https://doi.org/10.1007/7089_2008_18)
- Andersson, M. X., Goksör, M., & Sandelius, A. S. (2007). Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(2), 1170–1174. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608124200>
- Arai, M., Mitsuke, H., Ikeda, M., Xia, J. X., Kikuchi, T., Satake, M., & Shimizu, T. (2004). ConPred II: A consensus prediction method for obtaining transmembrane topology models with high reliability. *Nucleic Acids Research*, *32*(WEB SERVER ISS.). <https://doi.org/10.1093/nar/gkh380>
- Armenteros, J. J. A., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., von Heijne, G., Elofsson, A., & Nielsen, H. (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Science Alliance*, *2*(5). <https://doi.org/10.26508/lsa.201900429>
- Aronsson, H., & Jarvis, P. (2002). A simple method for isolating import-competent *Arabidopsis* chloroplasts. *FEBS Letters*, *529*(2–3). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03342-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03342-2)
- Aseeva, E., Ossenbühl, F., Eichacker, L. A., Wanner, G., Soll, J., & Vothknecht, U. C. (2004). Complex formation of Vipp1 depends on its  $\alpha$ -helical PspA-like domain. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(34), 35535–35541. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401750200>
- Avila, J. R., Lee, J. S., & Toriia, K. U. (2015). Co-Immunoprecipitation of Membrane-Bound Receptors. *The Arabidopsis Book*, *13*, e0180. <https://doi.org/10.1199/tab.0180>
- Bai, F., Yu, L., Shi, J., Li-Beisson, Y., & Liu, J. (2021). Long-chain acyl-CoA synthetases activate fatty acids for lipid synthesis, remodeling and energy production in *Chlamydomonas*. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.17813>
- Barajas, D., Xu, K., de Castro Martín, I. F., Sasvari, Z., Brandizzi, F., Risco, C., & Nagy, P. D. (2014). Co-opted Oxysterol-Binding ORP and VAP Proteins Channel Sterols to RNA Virus Replication Sites via Membrane Contact Sites. *PLoS Pathogens*, *10*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004388>
- Barbot, M., Jans, D. C., Schulz, C., Denkert, N., Kroppen, B., Hoppert, M., Jakobs, S., & Meinecke, M. (2015). Mic10 Oligomerizes to Bend Mitochondrial Inner Membranes at Cristae Junctions. *Cell Metabolism*, *21*(5). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.006>
- Barnes, A. C., Benning, C., & Roston, R. L. (2016). Chloroplast membrane remodeling during freezing stress is accompanied by cytoplasmic acidification activating SENSITIVE TO FREEZING2. *Plant Physiology*, *171*(3), 2140–2149. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00286>
- Barnes, A. C., Elowsky, C. G., & Roston, R. L. (2019). An Arabidopsis protoplast isolation method reduces cytosolic acidification and activation of the chloroplast stress sensor SENSITIVE TO FREEZING 2. *Plant Signaling and Behavior*, *14*(9). <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1629270>
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T., & Schmölling, T. (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, *23*(1), 69–80. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.079079>

- Bates, P. D., Ohlrogge, J. B., & Pollard, M. (2007). Incorporation of newly synthesized fatty acids into cytosolic glycerolipids in pea leaves occurs via acyl editing. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31206–31216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705447200>
- Berendzen, K. W., Böhmer, M., Wallmeroth, N., Peter, S., Vesić, M., Zhou, Y., Katharina, F., Tiesler, E., Schleifenbaum, F., & Harter, K. (2012). Screening for in planta protein-protein interactions combining bimolecular fluorescence complementation with flow cytometry. *Plant Methods*, 8(25). <http://www.plantmethods.com/content/8/1/25>
- Bhanot, V., Fadanavis, S. V., & Panwar, J. (2021). Revisiting the architecture, biosynthesis and functional aspects of the plant cuticle: There is more scope. *Environmental and Experimental Botany*, 183. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104364>
- Blume, C., Behrens, C., Eubel, H., Braun, H. P., & Peterhansel, C. (2013). A possible role for the chloroplast pyruvate dehydrogenase complex in plant glycolate and glyoxylate metabolism. *Phytochemistry*, 95, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.07.009>
- Bouvier, F., Linka, N., Isner, J. C., Mutterer, J., Weber, A. P. M., & Camara, B. (2006). Arabidopsis SAMT1 defines a plastid transporter regulating plastid biogenesis and plant development. *Plant Cell*, 18(11), 3088–3105. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040741>
- Brooks, J., & Shaw, G. (1968). Chemical Structure of the Exine of Pollen Walls and a New Function for Carotenoids in Nature. *Nature*, 219(5153). <https://doi.org/10.1038/219532a0>
- Brown, A. P., Affleck, V., Fawcett, T., & Slabas, A. R. (2006). Tandem affinity purification tagging of fatty acid biosynthetic enzymes in *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 57(7), 1563–1571. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj150>
- Browse, J., Warwick, N., Somerville, C. R., & Slack, C. R. (1986). Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the “16:3” plant *Arabidopsis thaliana*. In *Biochem. J* (Vol. 235).
- Bryant, N., Lloyd, J., Sweeney, C., Myouga, F., & Meinke, D. (2011). Identification of nuclear genes encoding chloroplast-localized proteins required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 155(4), 1678–1689. <https://doi.org/10.1104/pp.110.168120>
- Bugaeva, W., Könnel, A., Peter, J., Mees, J., Hankofer, V., Schick, C., Schmidt, A., Banguela-Castillo, A., & Philippar, K. (2021). FAX proteins in the inner envelope of chloroplasts can complement each other for fatty acid transport. *Journal of Experimental Botany (Eingereicht)*.
- Cahoon, A. B., & Timko, M. P. (2000). yellow-in-the-dark Mutants of *Chlamydomonas* Lack the CHLL Subunit of Light-Independent Protochlorophyllide Reductase. In *The Plant Cell* (Vol. 12). <https://academic.oup.com/plcell/article/12/4/559/6008806>
- Cai, G., Wang, G., Kim, S. C., Li, J., Zhou, Y., & Wang, X. (2021). Increased expression of fatty acid and ABC transporters enhances seed oil production in camelina. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01899-w>
- Craxton, M. (2007). Evolutionary genomics of plant genes encoding N-terminal-TM-C2 domain proteins and the similar FAM62 genes and synaptotagmin genes of metazoans. *BMC Genomics*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-259>

- Cremers, F. F. M., Voorhout, W. F., van der Krift, T. P., Leunissen-Bijvelt, J. M., & Verkleij, A. J. (1988). *Visualization of contact sites between outer and inner envelope membranes in isolated chloroplasts*.
- Crozet, P., Navarro, F. J., Willmund, F., Mehrshahi, P., Bakowski, K., Lauersen, K. J., Pérez-Pérez, M. E., Auroy, P., Gorchs Rovira, A., Sauret-Gueto, S., Niemeyer, J., Spaniol, B., Theis, J., Trösch, R., Westrich, L. D., Vavitsas, K., Baier, T., Hübner, W., de Carpentier, F., ... Lemaire, S. D. (2018). Birth of a Photosynthetic Chassis: A MoClo Toolkit Enabling Synthetic Biology in the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synthetic Biology*, 7(9), 2074–2086. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00251>
- Cutolo, E., Parvin, N., Ruge, H., Pirayesh, N., Roustan, V., Weckwerth, W., Teige, M., Grieco, M., Larosa, V., & Vothknecht, U. C. (2019). The High Light Response in Arabidopsis Requires the Calcium Sensor Protein CAS, a Target of STN7- and STN8-Mediated Phosphorylation. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00974>
- Daxinger, L., Hunter, B., Sheikh, M., Jauvion, V., Gascioli, V., Vaucheret, H., Matzke, M., & Furner, I. (2008). Unexpected silencing effects from T-DNA tags in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 13(1). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.007>
- de Vylder, J., Vandenbussche, F., Hu, Y., Philips, W., & van der Straeten, D. (2012). Rosette Tracker: An open source image analysis tool for automatic quantification of genotype effects. *Plant Physiology*, 160(3), 1149–1159. <https://doi.org/10.1104/pp.112.202762>
- Drea, S. C., Mould, R. M., Hibberd, J. M., Gray, J. C., & Kavanagh, T. A. (2001). Tissue-specific and developmental-specific expression of an Arabidopsis thaliana gene encoding the lipoamide dehydrogenase component of the plastid pyruvate dehydrogenase complex. In *Plant Molecular Biology* (Vol. 46).
- Du, Z. Y., Arias, T., Meng, W., & Chye, M. L. (2016). Plant acyl-CoA-binding proteins: An emerging family involved in plant development and stress responses. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 63, pp. 165–181). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.06.002>
- Duquesne, K., & Sturgis, J. N. (2010). Membrane protein solubilization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 601, 205–217. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-344-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-344-2_13)
- Duran, A. M., & Meiler, J. (2013). Inverted topologies in membrane proteins: A mini-review. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 8, Issue 11, p. e201308004). Research Network of Computational and Structural Biotechnology. <https://doi.org/10.5936/csbj.201308004>
- Eastmond, P. J. (2006). Sugar-dependent1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell*, 18(3), 665–675. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040543>
- Eichenberger, W., Schaffner, J.-C., & Boschetti, A. (1977). *CHARACTERIZATION OF PROTEINS AND LIPIDS OF PHOTOSYSTEM I AND II PARTICLES FROM CHLAMYDOMONA S REINHARDI* (Vol. 84, Issue 1).
- Eriksson, L. C., DePierre, J. W., & Dallner, G. (1978). Preparation and properties of microsomal fractions. *Pharmacology and Therapeutics, Part A: Chemotherapy, Toxicology And*, 2(2), 281–317. [https://doi.org/10.1016/0362-5478\(78\)90019-0](https://doi.org/10.1016/0362-5478(78)90019-0)

- Fan, J., Andre, C., & Xu, C. (2011). A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, *585*(12), 1985–1991. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.018>
- Fan, J., Yan, C., & Xu, C. (2013). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase-mediated triacylglycerol biosynthesis is crucial for protection against fatty acid-induced cell death in growing tissues of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, *76*(6), 930–942. <https://doi.org/10.1111/tpj.12343>
- Fan, J., Zhai, Z., Yan, C., & Xu, C. (2015). *Arabidopsis* TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL5 interacts with TGD1, TGD2, and TGD4 to facilitate lipid transfer from the endoplasmic reticulum to plastids. *Plant Cell*, *27*(10), 2941–2955. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00394>
- Ferguson, A. C., Pearce, S., Band, L. R., Yang, C., Ferjentsikova, I., King, J., Yuan, Z., Zhang, D., & Wilson, Z. A. (2017). Biphasic regulation of the transcription factor ABORTED MICROSPORES (AMS) is essential for tapetum and pollen development in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, *213*(2), 778–790. <https://doi.org/10.1111/nph.14200>
- Fernandez, E., Schnell, R., Ranum, L. P. W., Hussey, S. C., Silflow, C. D., & Lefebvret, P. A. (1989). Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii* (restriction fragment length polymorphisms/regulatory mutant/transformation). In *Biochemistry* (Vol. 86).
- Fischer, N., & Rochaix, J. D. (2001). The flanking regions of PsaD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics and Genomics*, *265*(5), 888–894. <https://doi.org/10.1007/s004380100485>
- Fourrier, N., Bédard, J., Lopez-Juez, E., Barbrook, A., Bowyer, J., Jarvis, P., Warren, G., & Thorlby, G. (2008). A role for SENSITIVE to FREEZING2 in protecting chloroplasts against freeze-induced damage in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, *55*(5), 734–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03549.x>
- Gan, Y., Li, H., Xie, Y., Wu, W., Li, M., Wang, X., & Huang, J. (2014). THF1 mutations lead to increased basal and wound-induced levels of oxylipins that stimulate anthocyanin biosynthesis via COI1 signaling in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, *56*(9), 916–927. <https://doi.org/10.1111/jipb.12177>
- Ganesan, R., Manigandan, S., Samuel, M. S., Shanmuganathan, R., Brindhadevi, K., Lan Chi, N. T., Duc, P. A., & Pugazhendhi, A. (2020). A review on prospective production of biofuel from microalgae. In *Biotechnology Reports* (Vol. 27). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00509>
- Gao, C., Cai, Y., Wang, Y., Kang, B. H., Aniento, F., Robinson, D. G., & Jiang, L. (2014). Retention mechanisms for ER and Golgi membrane proteins. In *Trends in Plant Science* (Vol. 19, Issue 8, pp. 508–515). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.04.004>
- Gao, C., Yu, C. K. Y., Qu, S., Yan San, M. W., Li, K. Y., Lo, S. W., & Jiang, L. (2012). The Golgi-Localized *Arabidopsis* endomembrane protein12 contains both endoplasmic reticulum export and golgi retention signals at its C terminus. *Plant Cell*, *24*(5), 2086–2104. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096057>
- Gaurav, N., Sivasankari, S., Kiran, G. S., Ninawe, A., & Selvin, J. (2017). Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *73*, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.070>

- Giroud, C., Gerber, A., & Eichenberger, W. (1988). Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of Molecular Species and Intracellular Site(s) of Biosynthesis. In *Plant Cell Physiol* (Vol. 29, Issue 4).
- Goncalves, E. C., Wilkie, A. C., Kirst, M., & Rathinasabapathi, B. (2016). Metabolic regulation of triacylglycerol accumulation in the green algae: identification of potential targets for engineering to improve oil yield. In *Plant Biotechnology Journal* (Vol. 14, Issue 8, pp. 1649–1660). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/pbi.12523>
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*, 100(3). <https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>
- Guan, X., Okazaki, Y., Zhang, R., Saito, K., & Nikolau, B. J. (2020). Dual-localized enzymatic components constitute the fatty acid synthase systems in mitochondria and plastids. *Plant Physiology*, 183(2), 517–529. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01564>
- Guo, L., Mishra, G., Markham, J. E., Li, M., Tawfall, A., Welti, R., & Wang, X. (2012). Connections between sphingosine kinase and phospholipase D in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8286–8296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274274>
- Guo, L., Mishra, G., Taylor, K., & Wang, X. (2011). Phosphatidic acid binds and stimulates *Arabidopsis* sphingosine kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13336–13345. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.190892>
- Harris EH. (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use: Volume 1* (Vol. 1). Academic press.
- Hauser, P. S., Narayanaswami, V., & Ryan, R. O. (2011). Apolipoprotein E: From lipid transport to neurobiology. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 50, Issue 1, pp. 62–74). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.09.001>
- Hossain, Z., Johnson, E. N., Wang, L., Blackshaw, R. E., Cutforth, H., & Gan, Y. (2019). Plant establishment, yield and yield components of Brassicaceae oilseeds as potential biofuel feedstock. *Industrial Crops and Products*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111800>
- Hsieh, K., & Huang, A. H. C. (2004). Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells. In *Plant Physiology* (Vol. 136, Issue 3, pp. 3427–3434). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.104.051060>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. In *Plant Journal* (Vol. 54, Issue 4, pp. 621–639). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Huang, A. (1992). OIL BODIES AND OLEOSINS IN SEEDS. In *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* (Vol. 43). [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- Huang, J., Taylor, J. P., Chen, J. G., Uhrig, J. F., Schnell, D. J., Nakagawa, T., Korth, K. L., & Jones, A. M. (2006). The plastid protein THYLAKOID FORMATION1 and the plasma membrane G-protein GPA1 interact in a novel sugar-signaling mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18(5), 1226–1238. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037259>

- Huang, K., Tian, J., Wang, H., Fu, Y. F., Li, Y., Zheng, Y., & Li, X. B. (2021). Fatty acid export protein BnFAX6 functions in lipid synthesis and axillary bud growth in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 186(4), 2064–2077. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab229>
- Huang, R., Zhao, J., Liu, J., Wang, Y., Han, S., & Zhao, H. (2017). Genome-wide analysis and expression profiles of NTMC2 family genes in *Oryza sativa*. *Gene*, 637, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.09.046>
- Huang, W., Chen, Q., Zhu, Y., Hu, F., Zhang, L., Ma, Z., He, Z., & Huang, J. (2013). Arabidopsis thylakoid formation 1 is a critical regulator for dynamics of PSII-LHCII complexes in leaf senescence and excess light. *Molecular Plant*, 6(5), 1673–1691. <https://doi.org/10.1093/mp/sst069>
- Hung, V., Lam, S. S., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Guzman, G., Mootha, V. K., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2017). Proteomic mapping of cytosol-facing outer mitochondrial and ER membranes in living human cells by proximity biotinylation. *ELIFE*. <https://doi.org/10.7554/eLife.24463.001>
- Inoue, K. (2011). Emerging roles of the chloroplast outer envelope membrane. In *Trends in Plant Science* (Vol. 16, Issue 10, pp. 550–557). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.005>
- Ischebeck, T. (2016). Lipids in pollen — They are different. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9), 1315–1328. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.03.023>
- Jako, C., Kumar, A., Wei, Y., Zou, J., Barton, D. L., Giblin, E. M., Covello, P. S., & Taylor, D. C. (2001). *Seed-Specific Over-Expression of an Arabidopsis cDNA Encoding a Diacylglycerol Acyltransferase Enhances Seed Oil Content and Seed Weight 1*. <https://academic.oup.com/plphys/article/126/2/861/6102736>
- Jang, S., Kong, F., Lee, J., Choi, B. Y., Wang, P., Gao, P., Yamano, T., Fukuzawa, H., Kang, B. H., & Lee, Y. (2020). CrABCA2 Facilitates Triacylglycerol Accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* under Nitrogen Starvation. *Molecules and Cells*, 43(1), 48–57. <https://doi.org/10.14348/molcells.2019.0262>
- Jessen, D., Olbrich, A., Knüfer, J., Krüger, A., Hoppert, M., Polle, A., & Fulda, M. (2011). Combined activity of LACS1 and LACS4 is required for proper pollen coat formation in Arabidopsis. *Plant Journal*, 68(4), 715–726. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.04722.x>
- Jing, J., He, L., Sun, A., Quintana, A., Ding, Y., Ma, G., Tan, P., Liang, X., Zheng, X., Chen, L., Shi, X., Zhang, S. L., Zhong, L., Huang, Y., Dong, M. Q., Walker, C. L., Hogan, P. G., Wang, Y., & Zhou, Y. (2015). Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca<sup>2+</sup> influx. *Nature Cell Biology*, 17(10), 1339–1347. <https://doi.org/10.1038/ncb3234>
- Johnston, M. L., Luethy, M. H., Miernyk, J. A., & Randall, D. D. (1997). Cloning and molecular analyses of the Arabidopsis thaliana plastid pyruvate dehydrogenase subunits 1 The nucleotide sequence data in this article have been entered into the GenBank database under the accession numbers U80185 and U80186.1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1321(3). [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00059-5)
- Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J. D., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A., & Zipfel, C. (2014). Direct Regulation of the NADPH

- Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity. *Molecular Cell*, 54(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.021>
- Kar, M., Posey, A. E., Dar, F., Hyman, A. A., & Pappu, R. v. (2021). Glycine-Rich Peptides from FUS Have an Intrinsic Ability to Self-Assemble into Fibers and Networked Fibrils. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00501>
- Keegstra, K., & Yousif, A. E. (1986). *Isolation and characterization of chloroplast envelope membranes*. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)18082-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)18082-7)
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H., Kim, H., Shim, D., Maeshima, M., Martinoia, E., Cahoon, E. B., Nishid, I., & Lee, Y. (2013). AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2), 773–778. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214159110>
- Kim, Y., Terng, E. L., Riekhof, W. R., Cahoon, E. B., & Cerutti, H. (2018). Endoplasmic reticulum acyltransferase with prokaryotic substrate preference contributes to triacylglycerol assembly in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(7), 1652–1657. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715922115>
- Kiselev, K. v., Aleynova, O. A., Ogneva, Z. v., Suprun, A. R., & Dubrovina, A. S. (2021). 35S promoter-driven transgenes are variably expressed in different organs of *Arabidopsis thaliana* and in response to abiotic stress. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2235–2241. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06235-x>
- Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölander, K., Gruissem, W., & Baginsky, S. (2004). The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current Biology*, 14(5), 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.039>
- Kleizen, B., & Braakman, I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 16, Issue 4, pp. 343–349). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.012>
- Koblenz, B., & Lechtreck, K. F. (2005). The NIT1 promoter allows inducible and reversible silencing of centrin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 4(11), 1959–1962. <https://doi.org/10.1128/EC.4.11.1959-1962.2005>
- Kohli, A., Miro, B., & Twyman, R. M. (2010). Transgene integration, Expression and stability in plants: Strategies for improvements. In *Transgenic Crop Plants* (Vol. 1, pp. 201–237). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-04809-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04809-8_7)
- Kong, F., Burlacot, A., Liang, Y., Légeret, B., Alseekh, S., Brotman, Y., Fernie, A. R., Krieger-Liszkay, A., Beisson, F., Peltier, G., & Li-Beisson, Y. (2018). Interorganelle communication: Peroxisomal MALATE DEHYDROGENASE2 connects lipid catabolism to photosynthesis through redox coupling in *chlamydomonas*. *Plant Cell*, 30(8), 1824–1847. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00361>
- Könnel, A. (2021). *FAX-Proteine in Arabidopsis thaliana – Struktur, Lokalisation und Funktion im Fettsäuretransport*.

- Könnel, A., Bugaeva, W., Gügel, I. L., & Philippar, K. (2019). BANFF: B ending of bilayer membranes by amphiphilic  $\alpha$ -helices is necessary for form and function of organelles. *Biochemistry and Cell Biology*, *97*(3), 243–256. <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0150>
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, *305*(3), 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U. C., Soll, J., & Westhoff, P. (2001). VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.061500998>
- Kropat, J., Hong-Hermesdorf, A., Casero, D., Ent, P., Castruita, M., Pellegrini, M., Merchant, S. S., & Malasarn, D. (2011). A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, *66*(5), 770–780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04537.x>
- Kudla, J., & Bock, R. (2016). Lighting the way to protein-protein interactions: Recommendations on best practices for bimolecular fluorescence complementation analyses. In *Plant Cell* (Vol. 28, Issue 5, pp. 1002–1008). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00043>
- Kwak, C., Shin, S., Park, J. S., Jung, M., My Nhung, T. T., Kang, M. G., Lee, C., Kwon, T. H., Park, S. K., Mun, J. Y., Kim, J. S., & Rhee, H. W. (2020). Contact-ID, a tool for profiling organelle contact sites, reveals regulatory proteins of mitochondrial-associated membrane formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.1916584117>
- Lai, S.-H., & Chye, M.-L. (2021). Plant Acyl-CoA-Binding Proteins—Their Lipid and Protein Interactors in Abiotic and Biotic Stresses. *Cells*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051064>
- Lenaerts, B., Collard, B. C. Y., & Demont, M. (2019). Review: Improving global food security through accelerated plant breeding. *Plant Science*, *287*. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110207>
- Li, N., Gügel, I. L., Giavalisco, P., Zeisler, V., Schreiber, L., Soll, J., & Philippar, K. (2015). FAX1, a Novel Membrane Protein Mediating Plastid Fatty Acid Export. *PLoS Biology*, *13*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002053>
- Li, N., Meng, H., Li, S., Zhang, Z., Zhao, X., Wang, S., Liu, A., Li, Q., Song, Q., Li, X., Guo, L., Li, H., Zuo, J., & Luo, K. (2020). Two plastid fatty acid exporters contribute to seed oil accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *182*(4), 1910–1919. <https://doi.org/10.1104/PP.19.01344>
- Li, N., Xu, C., Li-Beisson, Y., & Philippar, K. (2016a). Fatty Acid and Lipid Transport in Plant Cells. *Trends in Plant Science*, *21*(2). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.011>
- Li, N., Zhang, Y., Meng, H., Li, S., Wang, S., Xiao, Z., Chang, P., Zhang, X., Li, Q., Guo, L., Igarashi, Y., & Luo, F. (2019). Characterization of Fatty Acid Exporters involved in fatty acid transport for oil accumulation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1332-4>

- Li, X., Zhang, R., Patena, W., Gang, S. S., Blum, S. R., Ivanova, N., Yue, R., Robertson, J. M., Lefebvre, P. A., Fitz-Gibbon, S. T., Grossman, A. R., & Jonikas, M. C. (2016b). An Indexed, Mapped Mutant Library Enables Reverse Genetics Studies of Biological Processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 28(2). <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00465>
- Li-Beisson, Y., Beisson, F., & Riekhof, W. (2015). Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 82(3). <https://doi.org/10.1111/tpj.12787>
- Li-Beisson, Y., Kong, F., Wang, P., Lee, Y., & Kang, B. H. (2021). The disassembly of lipid droplets in *Chlamydomonas*. In *New Phytologist* (Vol. 231, Issue 4, pp. 1359–1364). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/nph.17505>
- Li-Beisson, Y., Neunzig, J., Lee, Y., & Philippar, K. (2017). Plant membrane-protein mediated intracellular traffic of fatty acids and acyl lipids. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 40, pp. 138–146). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.09.006>
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., Baud, S., Bird, D., DeBono, A., Durrett, T. P., Franke, R. B., Graham, I. A., Katayama, K., Kelly, A. A., Larson, T., Markham, J. E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., ... Ohlrogge, J. (2013). Acyl-Lipid Metabolism. *The Arabidopsis Book*, 11, e0161. <https://doi.org/10.1199/tab.0161>
- Li-Beisson, Y., Thelen, J. J., Fedosejevs, E., & Harwood, J. L. (2019). The lipid biochemistry of eukaryotic algae. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 74, pp. 31–68). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.003>
- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1). <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- Lin, M., & Oliver, D. J. (2008). The role of acetyl-coenzyme A synthetase in arabidopsis. *Plant Physiology*, 147(4), 1822–1829. <https://doi.org/10.1104/pp.108.121269>
- Linke, D., Frank, J., Pope, M. S., Soll, J., Ilkavets, I., Fromme, P., Burstein, E. A., Reshetnyak, Y. K., & Emelyanenko, V. I. (2004). Folding Kinetics and Structure of OEP16. *Biophysical Journal*, 86(3), 1479–1487. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74216-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74216-2)
- Liu, B., & Benning, C. (2013). Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 24, Issue 2, pp. 300–309). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.008>
- Loppes, R., Radoux, M., Ohresser, M. C. P., & Matagne, R. F. (1999). Transcriptional regulation of the Nia1 gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the Nia1 promoter. In *Plant Molecular Biology* (Vol. 41).
- Lutziger, I., & Oliver, D. J. (2000). Molecular evidence of a unique lipoamide dehydrogenase in plastids: analysis of plastidic lipoamide dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*<sup>1</sup>. *FEBS Letters*, 484(1). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02116-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02116-5)
- Mackinder, L. C. M., Chen, C., Leib, R. D., Patena, W., Blum, S. R., Rodman, M., Ramundo, S., Adams, C. M., & Jonikas, M. C. (2017). A Spatial Interactome Reveals the Protein Organization of the Algal CO<sub>2</sub>-Concentrating Mechanism. *Cell*, 171(1), 133-147.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.044>

- Mair, A., Xu, S. L., Branon, T. C., Ting, A. Y., & Bergmann, D. C. (2019). Proximity labeling of protein complexes and cell type specific organellar proteomes in Arabidopsis enabled by TurboID. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.47864>
- Mckown, R., Kuroki, G., & Warren, G. (1996). Cold responses of Arabidopsis mutants impaired in freezing tolerance. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 47, Issue 305). <https://academic.oup.com/jxb/article/47/12/1919/545643>
- Merchant, S. S., Kropat, J., Liu, B., Shaw, J., & Warakanont, J. (2012). TAG, You're it! Chlamydomonas as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 23, Issue 3, pp. 352–363). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.12.001>
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L. H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. v., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., ... Zhou, K. (2007). The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318(5848), 245–251. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
- Mi, H., Ebert, D., Muruganujan, A., Mills, C., Albu, L.-P., Mushayamaha, T., & Thomas, P. D. (2021). PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. *Nucleic Acids Research*, 49(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1106>
- Michaud, M., & Jouhet, J. (2019). Lipid trafficking at membrane contact sites during plant development and stress response. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00002>
- Millar, A. H., Heazlewood, J. L., Giglione, C., Holdsworth, M. J., Bachmair, A., & Schulze, W. X. (2019). The Scope, Functions, and Dynamics of Posttranslational Protein Modifications. *Annual Review of Plant Biology*, 70. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718>
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>
- Mitra, S., Ghose, A., Gujre, N., Senthilkumar, S., Borah, P., Paul, A., & Rangan, L. (2021). A review on environmental and socioeconomic perspectives of three promising biofuel plants *Jatropha curcas*, *Pongamia pinnata* and *Mesua ferrea*. In *Biomass and Bioenergy* (Vol. 151). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106173>
- Moellering, E. R., Muthan, B., & Benning, C. (2010). Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science*, 330(6001), 226–228. <https://doi.org/10.1126/science.1191803>
- Molnar, A., Bassett, A., Thuenemann, E., Schwach, F., Karkare, S., Ossowski, S., Weigel, D., & Baulcombe, D. (2009). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*, 58(1), 165–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03767.x>
- Neupert, J., Karcher, D., & Bock, R. (2009). Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *Plant Journal*, 57(6), 1140–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03746.x>

- Nguyen, H. M., Cui n , S., Beyly-Adriano, A., L geret, B., Billon, E., Auroy, P., Beisson, F., Peltier, G., & Li-Beisson, Y. (2013). The green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* has a single  $\omega$ -3 fatty acid desaturase that localizes to the chloroplast and impacts both plastidic and extraplastidic membrane lipids. *Plant Physiology*, *163*(2), 914–928. <https://doi.org/10.1104/pp.113.223941>
- Ni, D. Q., Zook, J., Klewer, D. A., Nieman, R. A., Soll, J., & Fromme, P. (2011). Isolation, folding and structural investigations of the amino acid transporter OEP16. *Protein Expression and Purification*, *80*(2), 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.004>
- Nordhues, A., Sch ttler, M. A., Unger, A. K., Geimer, S., Sch nfelder, S., Schmollinger, S., R tgers, M., Finazzi, G., Soppa, B., Sommer, F., M hlhaus, T., Roach, T., Krieger-Liszkay, A., Lokstein, H., Crespo, J. L., & Schroda, M. (2012). Evidence for a role of VIPP1 in the structural organization of the photosynthetic apparatus in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, *24*(2), 637–659. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.092692>
- Ohad, I., Siekevitz, P., & Palade, G. E. (1967). BIOGENESIS OF CHLOROPLAST MEMBRANES. *Journal of Cell Biology*, *35*(3). <https://doi.org/10.1083/jcb.35.3.521>
- Otters, S., Braun, P., Hubner, J., Wanner, G., Vothknecht, U. C., & Chigri, F. (2013). The first  $\alpha$ -helical domain of the vesicle-inducing protein in plastids 1 promotes oligomerization and lipid binding. *Planta*, *237*(2), 529–540. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1772-1>
- Palmieri, L., Arrigoni, R., Blanco, E., Carrari, F., Zanor, M. I., Studart-Guimaraes, C., Fernie, A. R., & Palmieri, F. (2006). Molecular identification of an Arabidopsis S-adenosylmethionine transporter. analysis of organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes, and functional characterization. *Plant Physiology*, *142*(3), 855–865. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086975>
- Patron, N. J., Orzaez, D., Marillonnet, S., Warzecha, H., Matthewman, C., Youles, M., Raitskin, O., Leveau, A., Farr , G., Rogers, C., Smith, A., Hibberd, J., Webb, A. A. R., Locke, J., Schornack, S., Ajioka, J., Baulcombe, D. C., Zipfel, C., Kamoun, S., ... Haseloff, J. (2015). Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts. *New Phytologist*, *208*(1). <https://doi.org/10.1111/nph.13532>
- Penfield, S., Pinfield-Wells, H. M., & Graham, I. A. (2006). Storage Reserve Mobilisation and Seedling Establishment in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, *4*, e0100. <https://doi.org/10.1199/tab.0100>
- Percifull, L. (2020). *Bachelor's thesis: Identification of putative interaction partners of the plastid fatty acid exporter 1 (FAX1)*.
- Pérez-Pérez, J. M., Esteve-Bruna, D., González-Bay n, R., Kangasj rvi, S., Caldana, C., Hannah, M. A., Willmitzer, L., Ponce, M. R., & Micol, J. L. (2013). Functional redundancy and divergence within the arabidopsis RETICULATA-RELATED gene family. *Plant Physiology*, *162*(2), 589–603. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217323>
- Pérez-Sancho, J., Tilsner, J., Samuels, A. L., Botella, M. A., Bayer, E. M., & Rosado, A. (2016). Stitching Organelles: Organization and Function of Specialized Membrane Contact Sites in Plants. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 26, Issue 9, pp. 705–717). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.007>
- Petschnigg, J., Wong, V., Snider, J., & Stagljjar, I. (2012). Investigation of membrane protein interactions using the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system. *Methods in Molecular Biology*, *812*, 225–244. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-455-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-455-1_13)

- Philippar, K., Geis, T., Ilkavets, I., Oster, U., Schwenkert, S., Rg Meurer, J., & Rgen Soll, J. (2007). *Chloroplast biogenesis: The use of mutants to study the etioplast-chloroplast transition*. [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/)
- Pohlmeyer, K., Soll, J. J., Steinkamp, T., Hinnah, S., & Wagner, R. (1997). Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. In *Plant Biology* (Vol. 94). [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
- Pracharoenwattana, I., Cornah, J. E., & Smith, S. M. (2007). Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in  $\beta$ -oxidation but not in the glyoxylate cycle. *Plant Journal*, 50(3), 381–390. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03055.x>
- Preininger, É., Kósa, A., Lőrincz, Z. S., Nyitrai, P., Simon, J., Böddi, B., Keresztes, Á., & Gyurján, I. (2015). Structural and functional changes in the photosynthetic apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii* during nitrogen deprivation and replenishment. *Photosynthetica*, 369–377.
- Pritchard, S. L., Charlton, W. L., Baker, A., & Graham, I. A. (2002). Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 31(5). <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01376.x>
- Pudelski, B., Schock, A., Hoth, S., Radchuk, R., Weber, H., Hofmann, J., Sonnewald, U., Soll, J., & Philippar, K. (2012). The plastid outer envelope protein OEP16 affects metabolic fluxes during ABA-controlled seed development and germination. *Journal of Experimental Botany*, 63(5), 1919–1936. <https://doi.org/10.1093/jxb/err375>
- Rajeevkumar, S., Anunanthini, P., & Sathishkumar, R. (2015). Epigenetic silencing in transgenic plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 6, Issue September). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00693>
- Ranathunge, K., Schreiber, L., & Franke, R. (2011). Suberin research in the genomics era—New interest for an old polymer. In *Plant Science* (Vol. 180, Issue 3, pp. 399–413). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.003>
- Rassow, J., Dekker, P. J. T., van Wilpe, S., Meijer, M., & Soll, J. (1999). The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *Journal of Molecular Biology*, 286(1). <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2455>
- Rath, A., Cunningham, F., & Deber, C. M. (2013). Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(39), 15668–15673. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311305110>
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>
- Rath, A., Nadeau, V. G., Poulsen, B. E., Ng, D. P., & Deber, C. M. (2010). Novel hydrophobic standards for membrane protein molecular weight determinations via sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, 49(50), 10589–10591. <https://doi.org/10.1021/bi101840j>
- Reid, E. E., Thompson, P., Lytrle, C. R., & Dennis, D. T. (1977). Pyruvate Dehydrogenase Complex from Higher Plant Mitochondria and Proplastids1 Acetyl-CoA + dihydrolipoyl-E2 Sum: Pyruvate + NAD<sup>+</sup> + CoA-<sup>\*</sup> Acetyl-CoA + CO<sub>2</sub> + NADH + H<sup>+</sup> (3) (4) (5). In *Plant Physiol* (Vol. 59). [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)

- Richardson, L. G. L., & Schnell, D. J. (2020). Origins, function, and regulation of the TOC-TIC general protein import machinery of plastids. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 71, Issue 4, pp. 1226–1238). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz517>
- Roston, R. L., Gao, J., Murcha, M. W., Whelan, J., & Benning, C. (2012). TGD1, -2, and -3 proteins involved in lipid trafficking form ATP-binding cassette (ABC) transporter with multiple substrate-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 287(25), 21406–21415. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.370213>
- Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J. P., & Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. In *Biotechnology for Biofuels* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0220-4>
- Saravanan, R. S., Slabaugh, E., Singh, V. R., Lapidus, L. J., Haas, T., & Brandizzi, F. (2009). The targeting of the oxysterol-binding protein ORP3a to the endoplasmic reticulum relies on the plant VAP33 homolog PVA12. *Plant Journal*, 58(5), 817–830. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03815.x>
- Schmollinger, S., Strenkert, D., & Schroda, M. (2010). An inducible artificial microRNA system for *Chlamydomonas reinhardtii* confirms a key role for heat shock factor 1 in regulating thermotolerance. *Current Genetics*, 56(4), 383–389. <https://doi.org/10.1007/s00294-010-0304-4>
- Schroda, M. (2004). The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. *Photosynthesis Research*, 82(3). <https://doi.org/10.1007/s11120-004-2216-y>
- Schroda, M., Blocker, D., & Beck, C. F. (2000). The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal*, 21(2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00652.x>
- Schröder, F., Lisso, J., Lange, P., & Müssig, C. (2009). The extracellular EXO protein mediates cell expansion in *Arabidopsis* leaves. *BMC Plant Biology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-20>
- Schröder, F., Lisso, J., & Müssig, C. (2012). Expression pattern and putative function of EXL1 and homologous genes in *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior*, 7(1). <https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18369>
- Schulz-Raffelt, M., Chochois, V., Auroy, P., Cuiné, S., Billon, E., Dauvillée, D., Li-Beisson, Y., & Peltier, G. (2016). Hyper-accumulation of starch and oil in a *Chlamydomonas* mutant affected in a plant-specific DYRK kinase. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0469-2>
- Schwacke, R., Fischer, K., Ketelsen, B., Krupinska, K., & Krause, K. (2007). Comparative survey of plastid and mitochondrial targeting properties of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 277(6). <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0214-4>
- Schwacke, R., & Flügge, U. I. (2018). Identification and characterization of plant membrane proteins using ARAMEMNON. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1696, pp. 249–259). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7411-5\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7411-5_17)
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügge, U.-I., & Kunze, R. (2003). ARAMEMNON, a Novel Database for

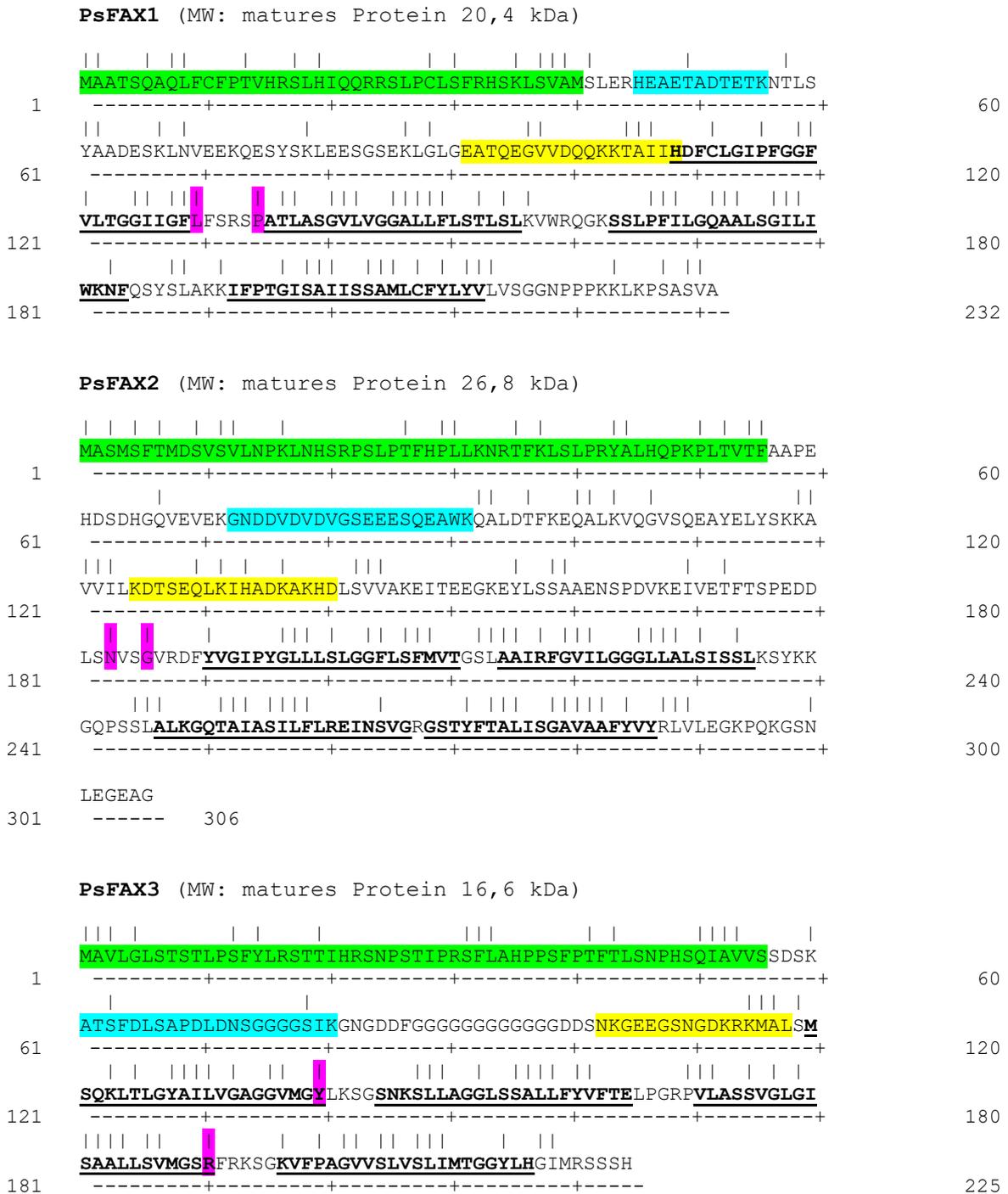
- Arabidopsis Integral Membrane Proteins. *Plant Physiology*, 131(1). <https://doi.org/10.1104/pp.011577>
- Seddon, A. M., Curnow, P., & Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1666, Issues 1–2, pp. 105–117). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.04.011>
- Seepaul, R., Kumar, S., Iboyi, J. E., Bashyal, M., Stansly, T. L., Bennett, R., Boote, K. J., Mulvaney, M. J., Small, I. M., George, S., & Wright, D. L. (2021). Brassica carinata: Biology and agronomy as a biofuel crop. In *GCB Bioenergy* (Vol. 13, Issue 4, pp. 582–599). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12804>
- Shi, J., Cui, M., Yang, L., Kim, Y. J., & Zhang, D. (2015). Genetic and Biochemical Mechanisms of Pollen Wall Development. In *Trends in Plant Science* (Vol. 20, Issue 11, pp. 741–753). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.07.010>
- Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y., & Peltier, G. (2011). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-7>
- Simm, S., Papatotiriou, D. G., Ibrahim, M., Leisegang, M. S., Müller, B., Schorge, T., Karas, M., Mirus, O., Sommer, M. S., & Schleiff, E. (2013). Defining the core proteome of the chloroplast envelope membranes. *Frontiers in Plant Science*, 4(FEB). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00011>
- Skirpan, A. L., Dowd, P. E., Sijacic, P., Jaworski, C. J., Gilroy, S., & Kao, T. (2006). Identification and characterization of PiORP1, a Petunia oxysterol-binding-protein related protein involved in receptor-kinase mediated signaling in pollen, and analysis of the ORP gene family in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 61(4–5). <https://doi.org/10.1007/s11103-006-0030-y>
- Snider, J., Kittanakom, S., Curak, J., & Stagljar, I. (2010). Split-ubiquitin based membrane yeast two-hybrid (MYTH) system: A powerful tool for identifying protein-protein interactions. *Journal of Visualized Experiments*, 36. <https://doi.org/10.3791/1698>
- Sonnhammer, E. L. L., von Heijne, G., & Krogh, A. (1998). *A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences* (Issue 1). AAAI Press. [www.aaai.org](http://www.aaai.org)
- Stael, S., Rocha, A. G., Wimberger, T., Anrather, D., Voithknecht, U. C., & Teige, M. (2012). Cross-talk between calcium signalling and protein phosphorylation at the thylakoid. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1725–1733. <https://doi.org/10.1093/jxb/err403>
- Tadini, L., Pesaresi, P., Kleine, T., Rossi, F., Guljamow, A., Sommer, F., Mühlhaus, T., Schroda, M., Masiero, S., Pribil, M., Rothbart, M., Hedtke, B., Grimm, B., & Leister, D. (2016). Gun1 controls accumulation of the plastid ribosomal protein S1 at the protein level and interacts with proteins involved in plastid protein homeostasis. *Plant Physiology*, 170(3), 1817–1830. <https://doi.org/10.1104/pp.15.02033>
- Takabayashi, A., Kadoya, R., Kuwano, M., Kurihara, K., Ito, H., Tanaka, R., & Tanaka, A. (2013). Protein co-migration database (PCoM -DB) for Arabidopsis thylakoids and Synechocystis cells. *SpringerPlus*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-148>

- Takabayashi, A., Niwata, A., & Tanaka, A. (2016). Direct interaction with ACR11 is necessary for post-transcriptional control of GLU1-encoded ferredoxin-dependent glutamate synthase in leaves. *Scientific Reports*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/srep29668>
- Takabayashi, A., Takabayashi, S., Takahashi, K., Watanabe, M., Uchida, H., Murakami, A., Fujita, T., Ikeuchi, M., & Tanaka, A. (2017). PCoM-DB update: A protein co-migration database for photosynthetic organisms. *Plant and Cell Physiology*, *58*(1), e10. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw219>
- Takemura, T., Imamura, S., & Tanaka, K. (2019). Identification of a chloroplast fatty acid exporter protein, CmFAX1, and triacylglycerol accumulation by its overexpression in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Algal Research*, *38*. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101396>
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, *408*(6814). <https://doi.org/10.1038/35048692>
- Theis, J., Niemeyer, J., Schmollinger, S., Ries, F., Rütgers, M., Gupta, T. K., Sommer, F., Muranaka, L. S., Venn, B., Schulz-Raffelt, M., Willmund, F., Engel, B. D., & Schroda, M. (2020). VIPP2 interacts with VIPP1 and HSP22E/F at chloroplast membranes and modulates a retrograde signal for HSP22E/F gene expression. *Plant Cell and Environment*, *43*(5), 1212–1229. <https://doi.org/10.1111/pce.13732>
- Theodoulou, F. L., & Eastmond, P. J. (2012). Seed storage oil catabolism: A story of give and take. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 322–328). <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.017>
- Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., & Narechania, A. (2003). PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Research*, *13*(9), 2129–2141. <https://doi.org/10.1101/gr.772403>
- Tian, Y., Lv, X., Xie, G., Wang, L., Dai, T., Qin, X., Chen, F., & Xu, Y. (2019). FAX2 Mediates Fatty Acid Export from Plastids in Developing Arabidopsis Seeds. *Plant and Cell Physiology*, *60*(10), 2231–2242. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz117>
- Tian, Y., Lv, X., Xie, G., Zhang, J., Xu, Y., & Chen, F. (2018). Seed-specific overexpression of AtFAX1 increases seed oil content in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *500*(2), 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.081>
- Umate, P. (2011). Oxysterol binding proteins (OSBPs) and their encoding genes in Arabidopsis and rice. *Steroids*, *76*(5), 524–529. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.01.007>
- Vainonen, J. P., Sakuragi, Y., Stael, S., Tikkanen, M., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Aro, E., Suorsa, M., Scheller, H. v., Vener, A. v., & Aro, E. M. (2008). Light regulation of CaS, a novel phosphoprotein in the thylakoid membrane of Arabidopsis thaliana. *FEBS Journal*, *275*(8), 1767–1777. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06335.x>
- Velay, F., Soula, M., Mehrez, M., D'Alessandro, S., Laloi, C., Crete, P., & Field, B. (2021). MoBiFC: development of a modular bimolecular fluorescence complementation toolkit for the analysis of chloroplast protein-protein interactions. *BioRxiv*.
- Wang, H., Han, S., Siao, W., Song, C., Xiang, Y., Wu, X., Cheng, P., Li, H., Jásik, J., Mičičeta, K., Turňa, J., Voigt, B., Baluška, F., Liu, J., Wang, Y., & Zhao, H. (2015). Arabidopsis Synaptotagmin 2 Participates in Pollen Germination and Tube Growth and Is Delivered

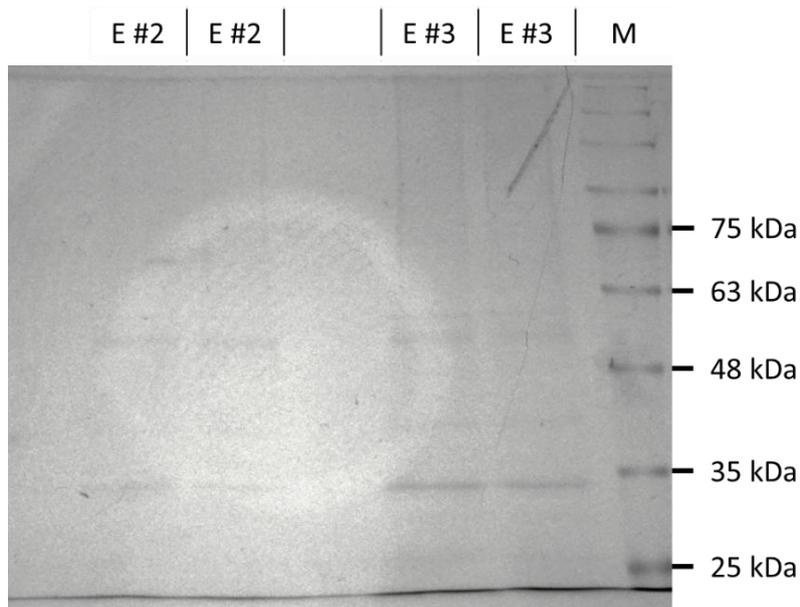
- to Plasma Membrane via Conventional Secretion. *Molecular Plant*, 8(12), 1737–1750. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.003>
- Wang, Q., Sullivan, R. W., Kight, A., Henry, R. L., Huang, J., Jones, A. M., & Korth, K. L. (2004). Deletion of the chloroplast-localized Thylakoid Formation1 gene product in arabidopsis leads to deficient thylakoid formation and variegated leaves. *Plant Physiology*, 136(3), 3594–3604. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049841>
- Wang, Y., Zhang, W. Z., Song, L. F., Zou, J. J., Su, Z., & Wu, W. H. (2008). Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in arabidopsis. *Plant Physiology*, 148(3), 1201–1211. <https://doi.org/10.1104/pp.108.126375>
- Wang, Z. T., Ullrich, N., Joo, S., Waffenschmidt, S., & Goodenough, U. (2009). Algal lipid bodies: Stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless chlamydomonas reinhardtii. *Eukaryotic Cell*, 8(12), 1856–1868. <https://doi.org/10.1128/EC.00272-09>
- Wang, Z., Xu, C., & Benning, C. (2012). TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. *Plant Journal*, 70(4), 614–623. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04900.x>
- Warakanont, J., Tsai, C. H., Michel, E. J. S., Murphy, G. R., Hsueh, P. Y., Roston, R. L., Sears, B. B., & Benning, C. (2015). Chloroplast lipid transfer processes in Chlamydomonas reinhardtii involving a TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL 2 (TGD2) orthologue. *Plant Journal*, 84(5), 1005–1020. <https://doi.org/10.1111/tpj.13060>
- Weers, P. M. M., & Ryan, R. O. (2006). Apolipoprotein III: Role model apolipoprotein. In *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 36, Issue 4 SPEC. ISS., pp. 231–240). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.01.001>
- Wetterau, J. R., Aggerbeck, L. P., Rall, S. C., & Weisgraber, K. H. (1988). Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. 1. Evidence for two structural domains. *Journal of Biological Chemistry*, 263(13), 6240–6248. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)68778-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)68778-2)
- Wilson, C., Bellen, H. J., & Gehring, W. J. (1990). POSITION EFFECTS ON EUKARYOTIC GENE EXPRESSION. In *Annu. Rev. Cell Bioi* (Vol. 6). [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- Wu, S. S. H., Platt, K. A., Ratnayake, C., Wang, T.-W., Ting, J. T. L., & Huang, A. H. C. (1997). Isolation and characterization of neutral-lipid-containing organelles and globuli-filled plastids from Brassica napus tapetum. In *Plant Biology* (Vol. 94). [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
- Xiao, Z., Tang, F., Zhang, L., Li, S., Wang, S., Huo, Q., Yang, B., Zhang, C., Wang, D., Li, Q., Wei, L., Guo, T., Qu, C., Lu, K., Zhang, Y., & Guo, L. (2021). The Brassica Napus Fatty Acid Exporter FAX1-1 Contributes to Biological Yield, Seed Oil Production, and Oil Quality. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 1–17. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-601433/v1>
- Xie, W., Nielsen, M. E., Pedersen, C., & Thordal-Christensen, H. (2017). A split-GFP gateway cloning system for topology analyses of membrane proteins in plants. *PLoS ONE*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170118>
- Xu, C., & Shanklin, J. (2016). Triacylglycerol Metabolism, Function, and Accumulation in Plant Vegetative Tissues\*. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 67, pp. 179–206). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111641>

- Yang, L., Chen, J., Qin, S., Zeng, M., Jiang, Y., Hu, L., Xiao, P., Hao, W., Hu, Z., Lei, A., & Wang, J. (2018). Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1041-z>
- Yang, X., Wen, Z., Zhang, D., Li, Z., Li, D., Nagalakshmi, U., Dinesh-Kumar, S. P., & Zhang, Y. (2021). Proximity labeling: an emerging tool for probing in planta molecular interactions. In *Plant Communications* (Vol. 2, Issue 2). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100137>
- Ye, H., Ji, C., Guo, R., & Jiang, L. (2020). Membrane Contact Sites and Organelles Interaction in Plant Autophagy. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00477>
- Yu, A., Li, P., Tang, T., Wang, J., Chen, Y., & Liu, L. (2015). Roles of Hsp70s in Stress Responses of Microorganisms, Plants, and Animals. In *BioMed Research International* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/510319>
- Zabawinski, C., van den Koornhuise, N., D'Hulst, C., Schlichting, R., Giersch, C., Delrue, B., Lacroix, J. M., Preiss, J., & Ball, S. (2001). Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase. *Journal of Bacteriology*, 183(3), 1069–1077. <https://doi.org/10.1128/JB.183.3.1069-1077.2001>
- Zäuner, S., Jochum, W., Bigorowski, T., & Benning, C. (2012). A Cytochrome b5-Containing Plastid-Located Fatty Acid Desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 11(7), 856–863. <https://doi.org/10.1128/EC.00079-12>
- Zeisler-Diehl, V. V., Barthlott, W., & Schreiber, L. (2018). Plant Cuticular Waxes: Composition, Function, and Interactions with Microorganisms. In *Hydrocarbons, Oils and Lipids: Diversity, Origin, Chemistry and Fate* (pp. 1–16). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54529-5\\_7-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54529-5_7-1)
- Zhang, L., Kato, Y., Otters, S., Vothknecht, U. C., & Sakamoto, W. (2012). Essential role of VIPP1 in chloroplast envelope maintenance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24(9), 3695–3707. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103606>
- Zhang, L., Kondo, H., Kamikubo, H., Kataoka, M., & Sakamoto, W. (2016). VIPP1 has a disordered C-terminal tail necessary for protecting photosynthetic membranes against stress. *Plant Physiology*, 171(3), 1983–1995. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00532>
- Zhang, L., & Sakamoto, W. (2015). Possible function of VIPP1 in maintaining chloroplast membranes. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1847, Issue 9, pp. 831–837). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.013>
- Zhang, M., Fan, J., Taylor, D. C., & Ohlrogge, J. B. (2009). DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *Plant Cell*, 21(12), 3885–3901. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071795>
- Zhu, L., He, S., Liu, Y. Y., Shi, J., & Xu, J. (2020). *Arabidopsis* FAX1 mediated fatty acid export is required for the transcriptional regulation of anther development and pollen wall formation. *Plant Molecular Biology*, 104(1–2), 187–201. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01036-5>

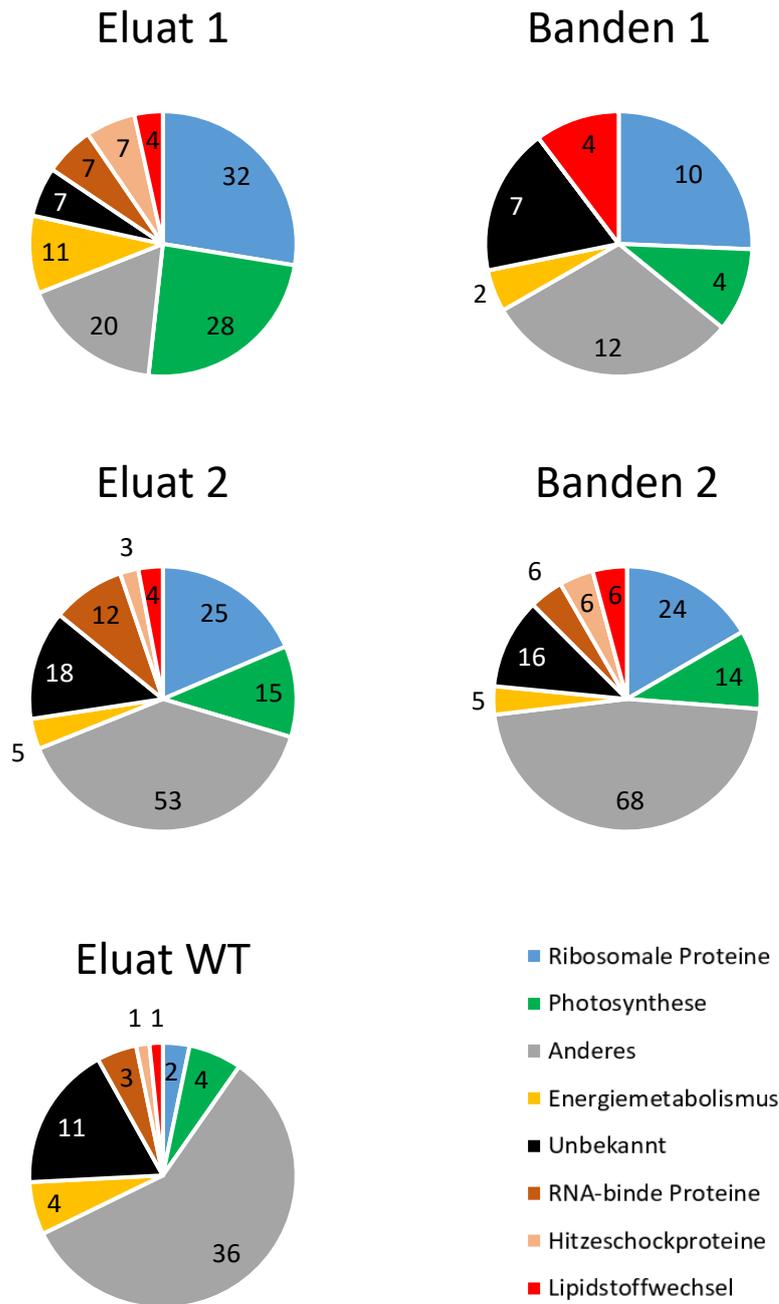
## 7. Anhang



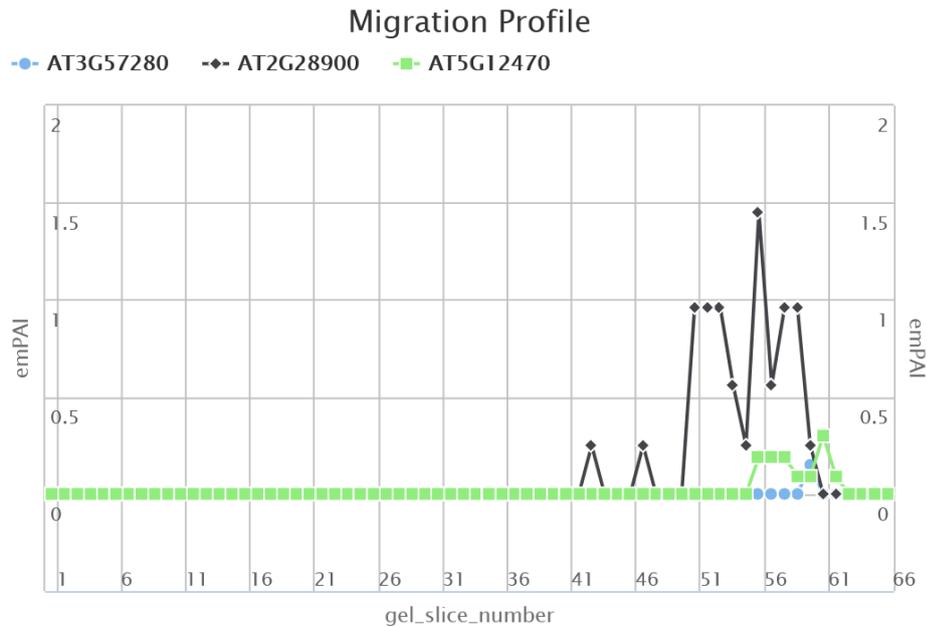
**Abbildung S1: Sequenzen von FAX-Proteinen aus Erbse mit Thermolysin-Schnittstellen.** Das Chloroplasten-Transitpeptid wurde mit TargetP 2.0 (Armenteros et al., 2019) bestimmt und ist grün markiert. Die Bindestelle des jeweiligen Peptid-Antikörpers ist gelb markiert. Membrandomänen (nach Bugaeva et al., 2021) sind fett und unterstrichen hervorgehoben. Thermolysin-Schnittstellen sind mit vertikalen Strichen über den entsprechenden Aminosäuren dargestellt. In rosa sind Schnittstellen hervorgehoben, die zu den Fragmenten in Abbildung 4 führen könnten. Das N-terminalste Peptid, welches bei der Sequenzierung des jeweiligen FAX-Proteins detektiert wurde, ist türkis markiert. MW: Molekulargewicht.



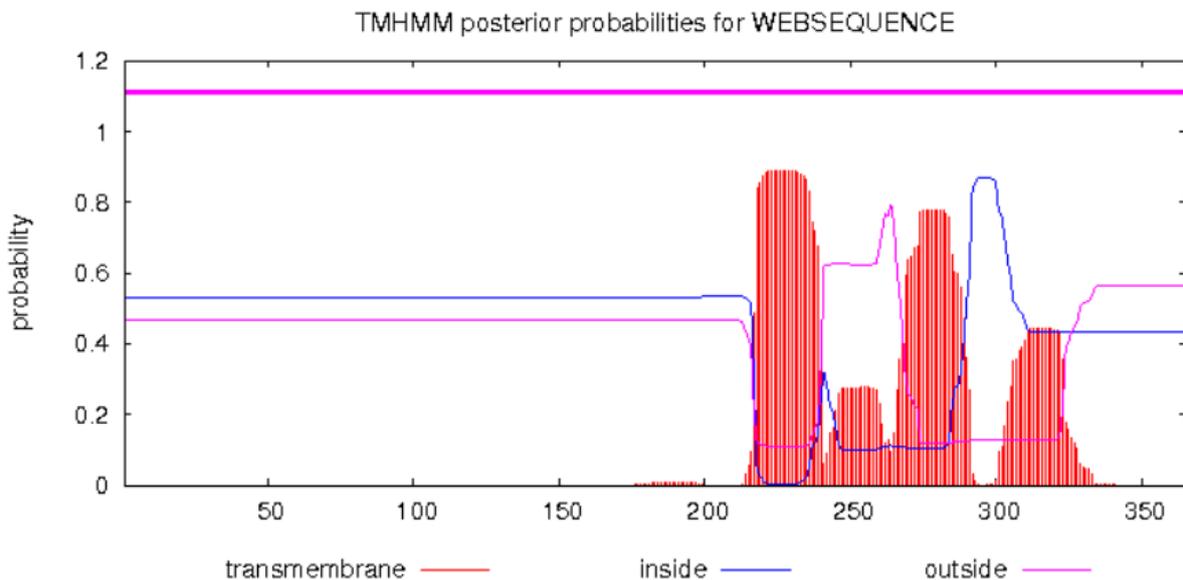
**Abbildung S2: Coomassie-Gel verschiedener Eluate nach einem GFP-pull down.** Aufgetragen wurden je 15  $\mu$ L Eluate (Probe E #2 und E #3) sowie der Marker (M). In Probe E #2 wurden Chloroplasten entsprechend 45  $\mu$ g Chlorophyll als Ausgangsmaterial eingesetzt. Proteinbanden auf Höhe von 35 und 55 kDa wurden ausgeschnitten und sequenziert. In Probe E #3 wurden Chloroplasten entsprechend 60  $\mu$ g Chlorophyll als Ausgangsmaterial eingesetzt. Proteinbanden auf Höhe von 25, 35, 40 und 48-63 kDa wurden ausgeschnitten und sequenziert. Es wurde ein 9% Polyacrylamid-Gel verwendet. Ein heller Kreis als Artefakt der Kameraaufnahme ist zu sehen.



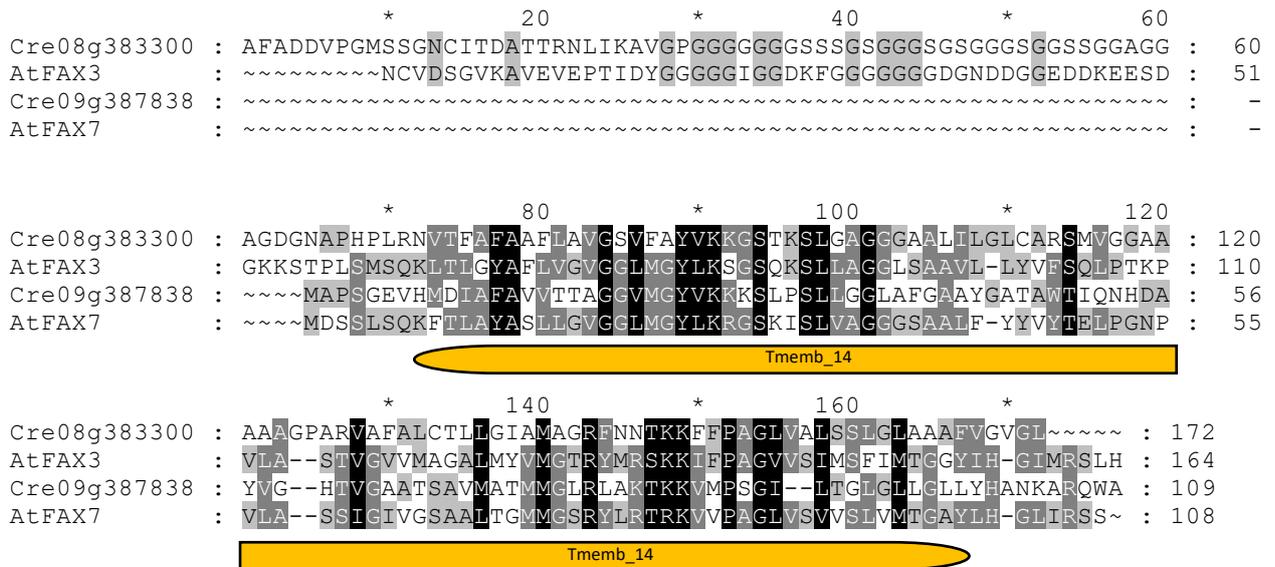
**Abbildung S3: Verteilung detektierter Proteinklassen nach einem GFP-pull down.** Dargestellt ist die absolute Anzahl an Proteinen sortiert in Proteinklassen. In den Proben „Eluat 1“ (116 Proteine) und „Eluat 2“ (135 Proteine) wurde das komplette Eluat nach einem GFP-pull down mit FAX1-GFP für die massenspektrometrische Detektion der Proteine verwendet. In Probe „Banden 1“ (39 Proteine) wurden drei Gel-Banden auf Höhe von 10, 30 und 55 kDa verwendet. In Probe „Banden 2“ (145 Proteine) wurden 14 Gel-Banden verschiedener Ansätze auf Höhe von 15 bis 100 kDa verwendet. In Probe „Eluat WT“ (62 Proteine) wurde zweimal das komplette Eluat nach einem GFP-pull down mit der Wildtyp-Kontrolle Col-0 verwendet.



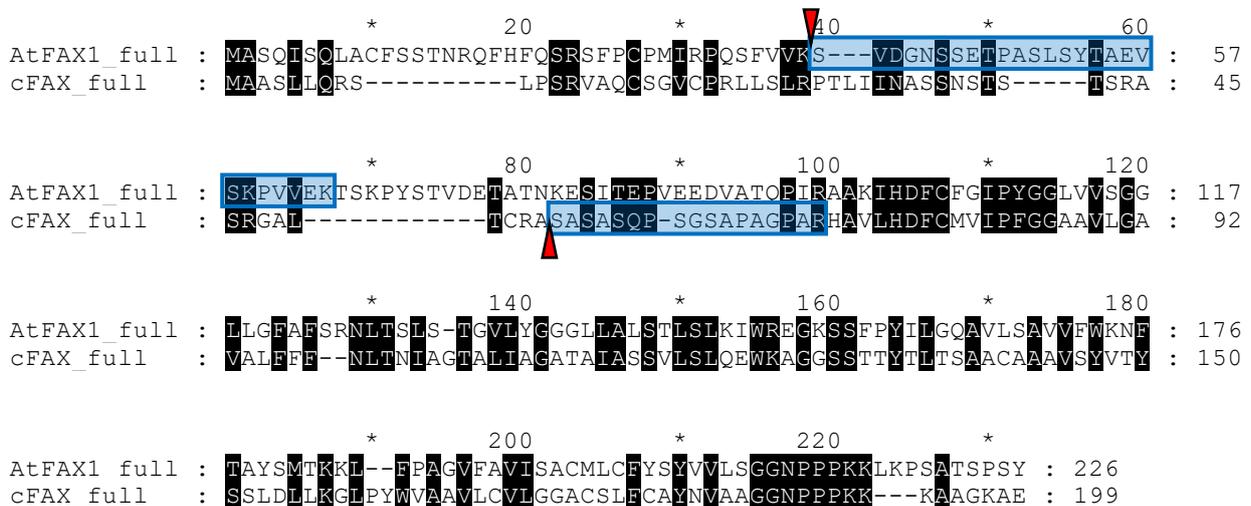
**Abbildung S4: Migrationsprofile von FAX1, OEP16.1 und RER4.** Dargestellt sind die emPAI (*exponentially modified protein abundance index*) Werte für FAX1 (At3g57380, blau), OEP16.1 (At2g28900, schwarz) und RER4 (At5g12470, grün). Es wurden 66 Gelbanden einer BN-PAGE mit aufgereinigter Hüllmembranfraktion von *Arabidopsis thaliana* analysiert. FAX1 wurde nur in Gelbande 60 detektiert (siehe Takabayashi et al., 2017).



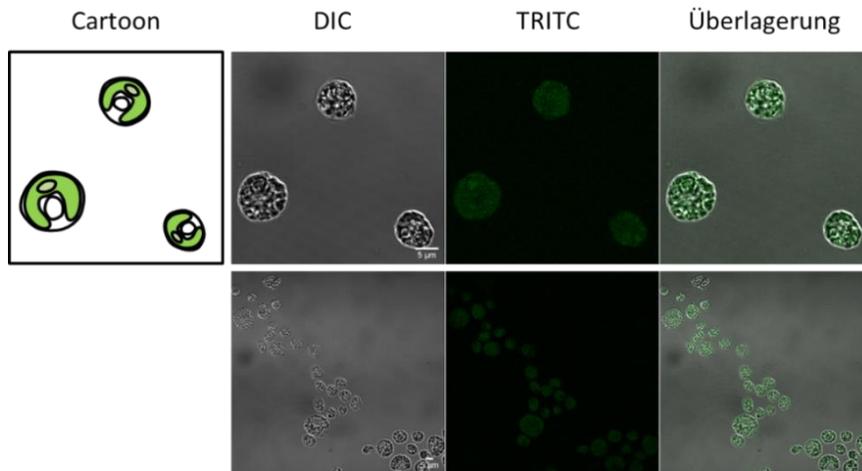
**Abbildung S5: Hydrophobizitätsprofil von Cre06.g254350.** Hydrophobe Bereiche sind in Rot dargestellt und umfassen die vermeintliche Tmemb<sub>14</sub>-Domäne. Zur Generierung des Profils wurde TMHMM Server v.2.0 verwendet. Es können keine Transmembrandomänen vorhergesagt werden.



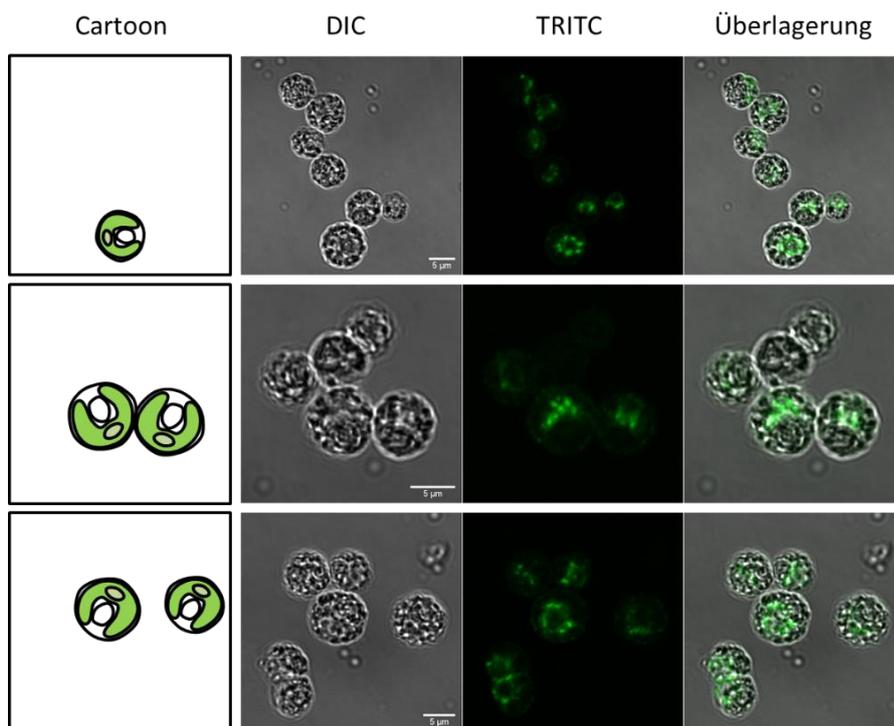
**Abbildung S6: FAX3- und FAX7-Proteine in *Arabidopsis thaliana* und *Chlamydomonas reinhardtii*.** Die murenen FAX3-Sequenzen wurden nach der Vorhersage von TargetP 2.0 (Armenteros et al., 2019) ausgewählt. Die Tmemb\_14-Domäne ist als oranger Balken unter den Sequenzvergleichen dargestellt. Verschiedene Graustufen geben Sequenzübereinstimmungen an (Schwarz: 100%; dunkelgrau: 75%; hellgrau: 50%, weiß: <50%).



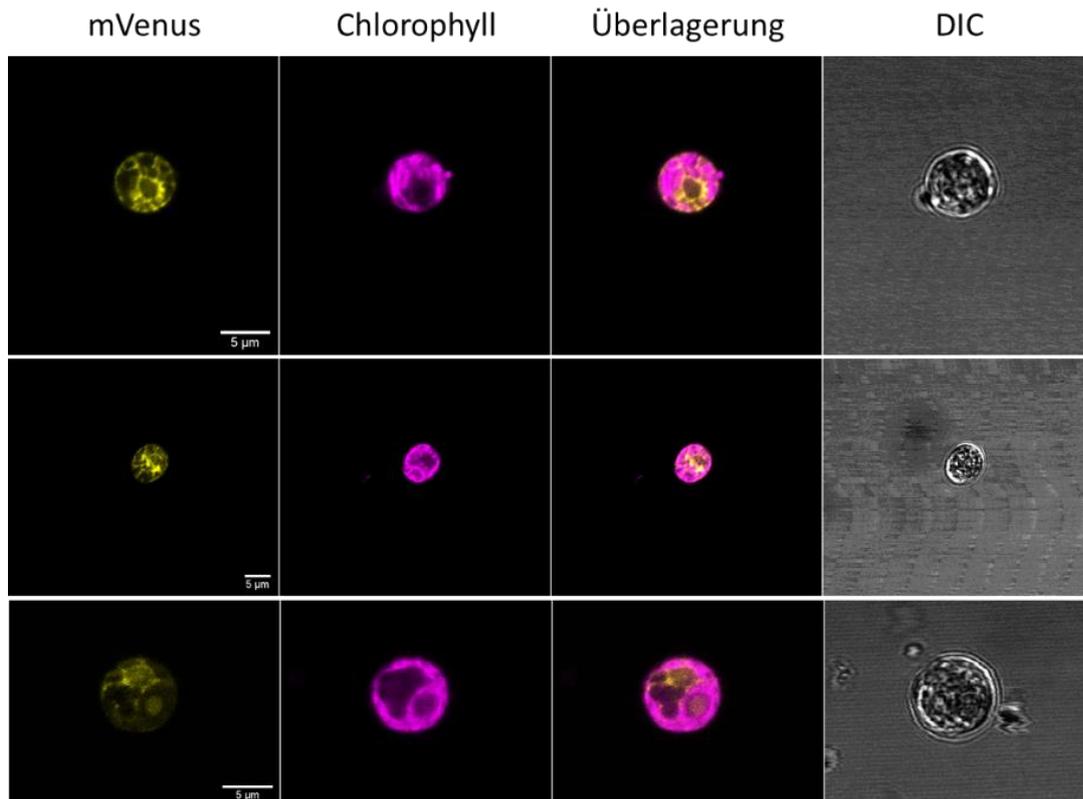
**Abbildung S7: Sequenzvergleich von AtFAX1 und cFAX.** Die Sequenzen von AtFAX1 und cFAX sind dargestellt. Die Schnittstelle der stromalen Peptidase ist nach der Vorhersage von TargetP 2.0 (Armenteros et al., 2019) mit einem roten Dreieck angegeben. Mit einem blauen Kasten ist das N-terminalste Peptid, welches bei einer Sequenzierung durch Massenspektrometrie gefunden wurde, markiert. In Schwarz sind Sequenzübereinstimmungen hervorgehoben.



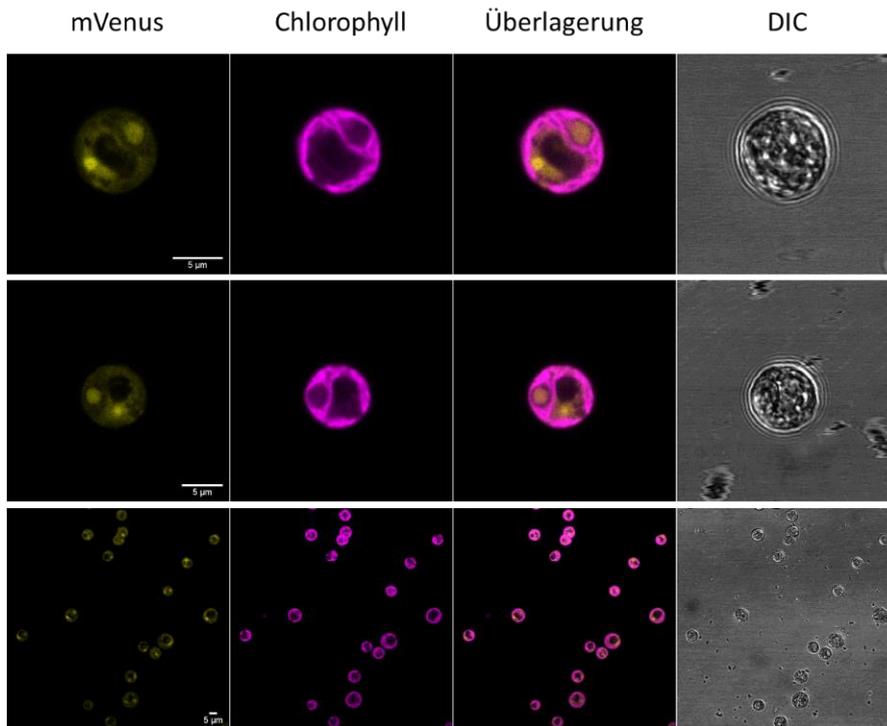
**Abbildung S8: Immunofluoreszenz-Aufnahmen mit HA-Antikörpern.** Chlamydomonas-Zellen wurden auf einem Objektträger fixiert und mit HA-Antikörpern behandelt. Als Fluorophor des sekundären Antikörpers wurde TRITC (Tetramethylrhodamine-isothiocyanate) gewählt. Dargestellt sind eine DIC (*differential interference contrast*)-Aufnahme, TRITC-Fluoreszenz sowie eine Überlagerung beider Bilder. Ein Cartoon ist zur Verdeutlichung der Orientierung der Chlamydomonas-Zellen dargestellt. Der Maßstab entspricht 5 µm. Die Fluoreszenz wurde bei 561 nm angeregt und die Emission von 565 bis 583 nm aufgenommen (Laser-Scanning-Mikroskop: LEICA LSM480).



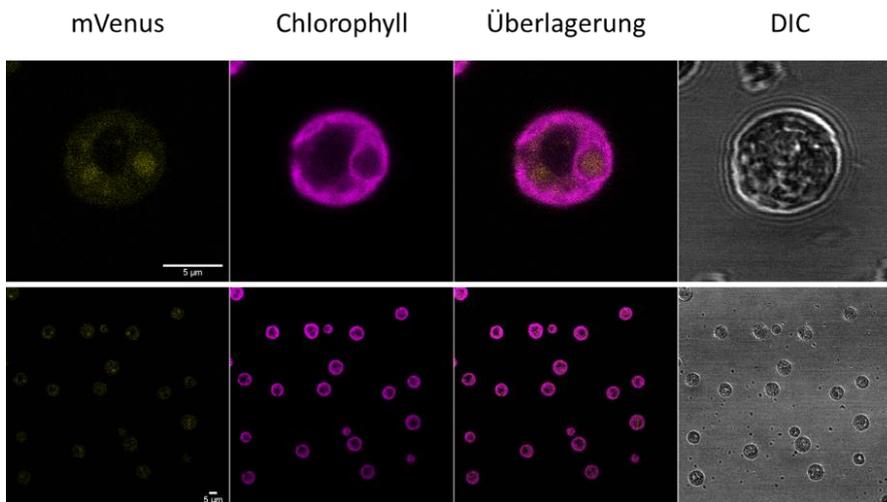
**Abbildung S9: Immunofluoreszenz-Aufnahmen von erFAX-3xHA.** Chlamydomonas-Zellen, die erFAX-3xHA exprimieren, wurden auf einem Objektträger fixiert und mit HA-Antikörpern behandelt. Als Fluorophor des sekundären Antikörpers wurde TRITC (Tetramethylrhodamine-isothiocyanate) gewählt. Dargestellt sind eine DIC (*differential interference contrast*)-Aufnahme, TRITC-Fluoreszenz sowie eine Überlagerung beider Bilder. Ein Cartoon ist zur Verdeutlichung der Orientierung der Chlamydomonas-Zellen dargestellt. Der Maßstab entspricht 5 µm. Die Fluoreszenz wurde bei 561 nm angeregt und die Emission von 565 bis 583 nm aufgenommen (Laser-Scanning-Mikroskop: LEICA LSM480).



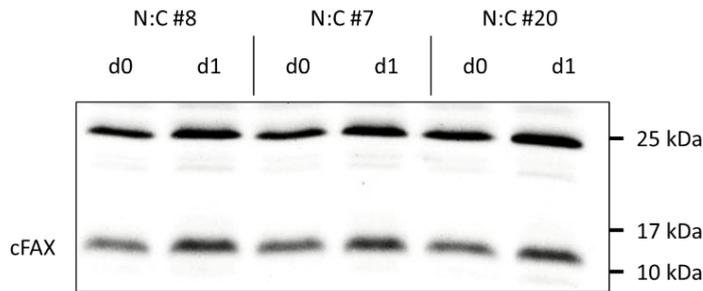
**Abbildung S10: Fluoreszenzsignal eines ER-lokalisierendes mVenus in Chlamydomonas.** Chlamydomonas-Zellen, die mVenus mit einem Signalpeptid sowie einem ER-Retentions-Signal (siehe Abbildung 3) exprimieren, wurden mit 2,5% Glutardialdehyd immobilisiert. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen von mVenus und Chlorophyll sowie eine DIC (*differential interference contrast*)-Aufnahme. Eine Überlagerung der mVenus- und Chlorophyll-Aufnahme ist ebenfalls dargestellt. Der Maßstab entspricht 5 µm. mVenus: Anregung bei 514 nm, Emission bei 520 bis 564 nm; Chlorophyll: Anregung bei 458 nm, Emission bei 626 bis 735 nm (Laser-Scanning-Mikroskop: LEICA LSM480).



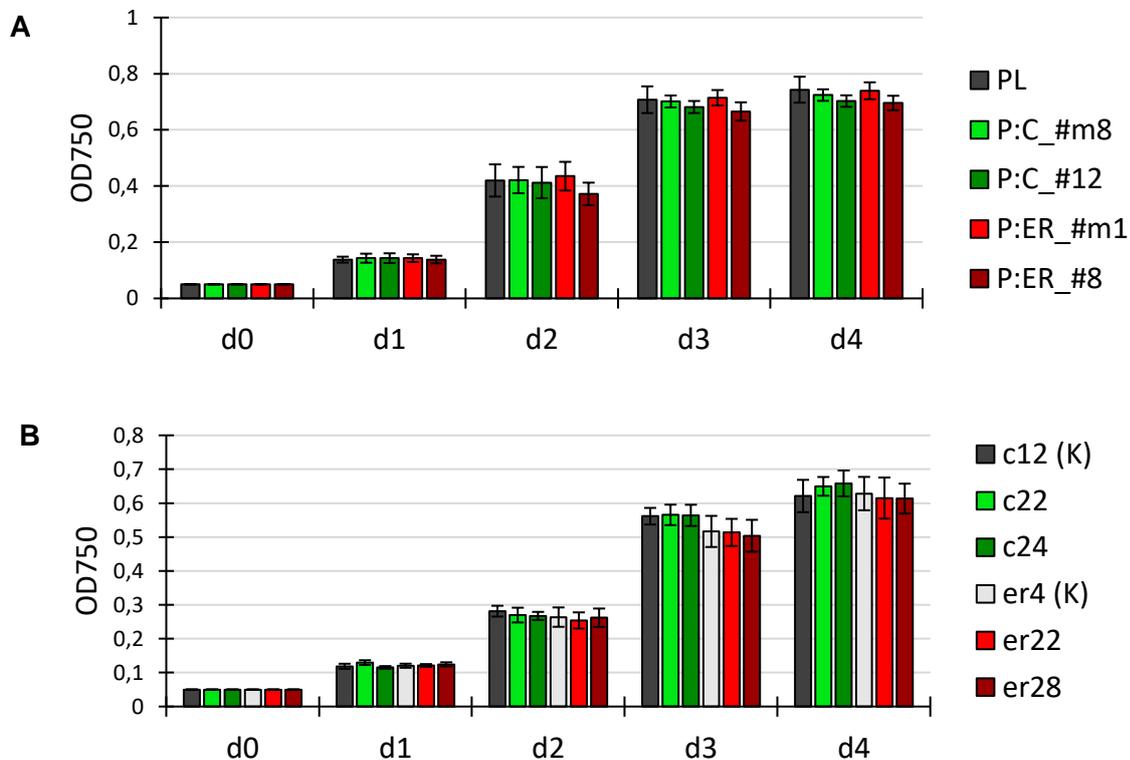
**Abbildung S11: Fluoreszenzsignal eines chloroplastidären mVenus in Chlamydomonas.** Chlamydomonas-Zellen, die mVenus mit einem Chloroplasten-Transitpeptid (siehe Abbildung 3) exprimieren, wurden mit 2,5% Glutardialdehyd immobilisiert. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen von mVenus und Chlorophyll sowie eine DIC (*differential interference contrast*)-Aufnahme. Eine Überlagerung der mVenus- und Chlorophyll-Aufnahme ist ebenfalls dargestellt. Der Maßstab entspricht 5 µm. mVenus: Anregung bei 514 nm, Emission bei 520 bis 564 nm; Chlorophyll: Anregung bei 458 nm, Emission bei 626 bis 735 nm (Laser-Scanning-Mikroskop: LEICA LSM480).



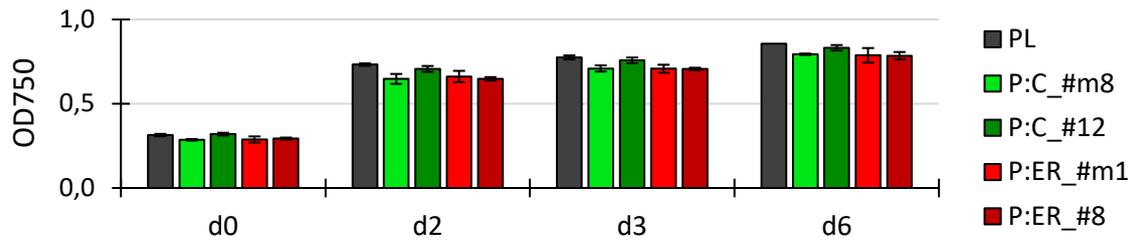
**Abbildung S12: mVenus-Signal von wildtypischen Chlamydomonas-Zellen.** Chlamydomonas-Zellen wurden mit 2,5% Glutardialdehyd immobilisiert. Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen von mVenus und Chlorophyll sowie eine DIC (*differential interference contrast*)-Aufnahme. Eine Überlagerung der mVenus- und Chlorophyll-Aufnahme ist ebenfalls dargestellt. Der Maßstab entspricht 5 µm. mVenus: Anregung bei 514 nm, Emission bei 520 bis 564 nm; Chlorophyll: Anregung bei 458 nm, Emission bei 626 bis 735 nm (Laser-Scanning-Mikroskop: LEICA LSM480).



**Abbildung S13: Induzierbare cFAX-Überexpressionslinien in Chlamydomonas.** Dargestellt sind Western Blots ausgewählter induzierbarer Überexpressionslinien. Die Elternlinie ist cw15-325 (nicht dargestellt). Es wurden Proteine entsprechend 2 µg Chlorophyll verwendet. Als induzierbare cFAX-Überexpressionslinien wurden N:C #8, N:C #7 und N:C #20 aufgetragen. „N“ steht für den *NIT1*-Promotor. „C“ gibt cFAX an. Es wurden Proben von Tag 0 (d0; nicht induziert) oder nach einem Tag in Induktionsmedium (d1) aufgetragen. Es wurden spezifische Antikörper gegen cFAX verwendet. Die Detektion erfolgte via Chemilumineszenz. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.



**Abbildung S14: Wachstumskurven ausgewählter FAX-Überexpressions- und knockdown-Linien in Chlamydomonas.** Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der OD750 im zeitlichen Verlauf von Tag 0 (d0) bis Tag 4 (d4). **(A)** Die Überexpressionslinien P:C\_#m8, P:C\_#12, P:ER\_#m1 und P:ER\_#8 sowie die Elternlinie (PL, *parental line*) UVM4 sind dargestellt. „P“ steht für den *PSAD*-Promotor. „C“ und „ER“ geben cFAX oder erFAX an. Ein zusätzliches „m“ gibt eine Linie eines unabhängigen Transformationsansatzes an. N = 6. **(B)** Die *knockdown*-Linien c22, c24, er22 und er28 sowie die Kontrollen c12 (K) und er4 (K) sind dargestellt. „c“ und „er“ geben das artifizielle microRNA-Konstrukt für cFAX oder erFAX an. N = 5 (für c24: N = 4). Es wurde eine einfaktorische ANOVA durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverlauf in **(A)** oder **(B)** festgestellt werden.



**Abbildung S15: Wachstum der Überexpressionslinien unter Stickstoffmangel.** Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der OD750 im zeitlichen Verlauf von Tag 0 (d0), Tag 2 (d2), Tag 3 (d3) und Tag 6 (d6). Die Überexpressionslinien P:C\_#m8, P:C\_#12, P:ER\_#m1 und P:ER\_#8 sowie die Elternlinie (PL, *parental line*) UVM4 sind dargestellt. „P“ steht für den *PSAD*-Promotor. „C“ und „ER“ geben cFAX oder erFAX an. Ein zusätzliches „m“ gibt eine Linie eines unabhängigen Transformationsansatzes an. N = 3 (PL, d6: N = 2).

**Tabelle S1: Kombierter Datensatz des FAX1-GFP-pull downs aus den Eluaten.** Der *Arabidopsis Genome Identifier* (AGI)-Code, die Protein-ID (UniProt), die Beschreibung, Lokalisation, Anzahl an Transmembrandomänen (TMs) sowie das Molekulargewicht (MW) in kDa nach ARAMEMNON (Schwacke et al., 2003) sind dargestellt. Die Lokalisation basiert auf der *consensus prediction AramLocCon* nach (Schwacke et al., 2007). Chloroplasten-codierte Proteine finden sich am Ende der Liste. Die Vorhersage der Transmembrandomänen wurde durch *ConPred\_v2* (Arai et al., 2004) bestimmt oder, falls nicht verfügbar, mit *AramTmMulticon* (Schwacke & Flügge, 2018). Es werden Proteine aufgeführt, die sowohl in Eluat 1 als auch in Eluat 2 gefunden wurden, abzüglich aller Proteine, die auch in Col-0 detektiert wurden. FAX1 und GFP sind hervorgehoben. C: Chloroplast, M: Mitochondrium, SP: sekretorischer Weg.

AGI-Code	Protein-ID	Beschreibung	Lokalisation	TM	MW [kDa]
At1g01080	A0A1P8APK3;Q8W592;F4HQH8	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP28B)	C	0	32,6
At1g05190	O23049	putative component uL6C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL6)	C	0	24,7
At1g07320	Q2V4Q4;Q3EDH2;O50061	putative component uL4C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL4)	C	0	30,6
At1g20020	Q8W493	chloroplast-targeted ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase (AtFNR2/AtLFNR2)	C	1	41,2
At1g32060	P25697	phosphoribulokinase (AtPRK)	C	0	44,5
At1g35680	P51412	putative component bL21C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL21)	C	0	24
At1g54780	Q9ZVL6	putative (cyanobacterium PSB32)-like protein, involved in photosystem II repair (AtTLP18.3)	C	2	31,1
At1g65260	A0A1P8ATS2;O80796	putative chloroplast membrane fusion chaperone (AtVIPP1/AtIM30/AtPTAC4)	C	0	36,4
At2g28900	Q9ZV24	putative plastid outer envelope protein (AtOep16-1)	C	2	15,5
At2g33800	P93014	putative component uS5C of small subunit of plastidial ribosome, SCABRA (AtcpRPS5/AtSCA1)	C	0	32,6
At2g35410	O82299	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP33B)	C	0	33,8
At2g37220	Q9ZUU4	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP29B)	C	0	30,7
At2g43030	Q9SKX4	putative component uL3C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL3)	C	0	29,4
At3g25920	P25873	putative component uL15C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL15)	C	0	29,7
At3g27850	P36212;P36210	putative component bL12C of large subunit of plastidial ribosome	C	0	19,7
At3g52150	Q8VYM4	putative component cS22 of small subunit of plastidial ribosome (AtPSRP2/AtCP29C)	C	0	27,7
At3g52380	Q39061	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP33A)	C	0	35,7
At3g53460	F4JAF3;Q43349	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP29A)	C	0	36
At3g57280	Q93V66	putative plastid fatty acid exporter (AtFAX1)	C	4	24,3
At3g63490	Q9LY66;F4J296	putative component uL1C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL1)	C	0	37,6

At4g01310	O04603	putative component uL5C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL5)	C	0	28,3
At4g04640	Q01908	gamma subunit of plastidial ATP synthase peripheral CF1 subcomplex (AtcpATP-gamma1)	C	0	40,9
At4g09040	A8MS54;Q6NPL0	protein of unknown function, contains RNA binding domain	C	0	34
At4g16155	F4JLP5	plastidic dihydrolipoamide dehydrogenase (AtptLPD2)	M	0	67,1
At4g24770	Q04836	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP31A)	C	0	35,8
At4g39460	Q94AG6	S-adenosylmethionine transporter (AtSAMC1/AtSAMT1)	C	5	34,9
At5g01530	Q07473	light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (AtLHCb4.1/AtCP29)	C	3	31,1
At5g01920	Q9LZV4	putative PSII core component kinase, STATE TRANSITION (AtSTN8)	C	1	55
At5g09660	F4KDZ4;A8MRP1;A0A1P8 BBQ0;B3H560;Q9ZP05	putative peroxisomal NAD-dependent malate dehydrogenase (AtpMDH2)	M	1	37,4
At5g13510	Q9FY50	putative component uL10C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL10)	C	0	24,7
At5g24490	Q94K97	putative chlororibosome hibernation-promoting factor (AtPSRP1)	C	0	34,9
At5g47190	Q8RXX5	putative component bL19C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL19)	C	0	25,5
At5g49910	Q9STW6;Q9LTX9	putative HSP70/DnaK-type molecular chaperone (AtHsp70-7/AtcpHsp70-2)	C	0	77
At5g66190	Q9FKW6;F4JZ46	chloroplast-targeted ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase (AtFNR1/AtLFNR1)	C	1	40,3
AtCg00020	P83755	putative component D1 of photosystem II complex (AtPsbA)	C	6	38,9
AtCg00270	P56761	putative component D2 of photosystem II complex (AtPsbD)	C	6	39,5
AtCg00280	P56778	putative component of photosystem II complex (AtPsbC/AtCP43)	C	6	51,9
AtCg00540	P56771	putative apocytochrome f component of cytochrome b6-f electron transfer complex (AtPetA)	C	2	35,4
AtCg00800	P56798	putative component uS3C of small subunit of plastidial ribosome (AtcpRPS3)	C	1	25,2
AtCg00900	P61841	putative component uS7C of small subunit of plastidial ribosome (AtcpRPS7a)	C	0	17,4
-	CON_Q9U6Y5	GFP			

**Tabelle S2: Proteine, die in ausgeschnittenen Banden des ersten Versuchs eines FAX1-GFP-pull downs detektiert wurden.** Der *Arabidopsis Genome Identifier* (AGI)-Code, die Protein-ID (UniProt), die Beschreibung, Lokalisation, Anzahl an Transmembrandomänen (TMs) sowie das Molekulargewicht (MW) in kDa nach ARAMEMNON (Schwacke et al., 2003) sind dargestellt. Die Lokalisation basiert auf der *consensus prediction AramLocCon* nach (Schwacke et al., 2007). Chloroplasten-codierte Proteine finden sich am Ende der Liste. Die Vorhersage der Transmembrandomänen wurde durch *ConPred\_v2* (Arai et al., 2004) bestimmt oder, falls nicht verfügbar, mit *AramTmMulticon* (Schwacke & Flügge, 2018). Es werden Proteine aufgeführt, die aus SDS-Gelbanden auf Höhe von 55, 30 und 10 kDa ausgeschnitten und sequenziert wurden. FAX1 und GFP sind hervorgehoben. C: Chloroplast, M: Mitochondrium, N: Nukleus, SP: sekretorischer Weg.

AGI-Code	Protein-ID	Beschreibung	Lokalisation	TM	MW [kDa]
At1g06190	A0A1P8AM09;A0A1P8AM12;Q94K75;F4IPY0	putative plastidial DNA:RNA hybrid helicase (AtRHON1)	C	0	44,5
At1g07320	Q2V4Q4;Q3EDH2;O50061	putative component uL4C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL4)	C	0	30,6
At1g20020	Q8W493	chloroplast-targeted ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase (AtFNR2/AtLFNR2)	C	1	41,2
At1g34430	Q9C8P0;Q9SQI8	putative E2 dihydrolipoyl acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (AtcpPDC-E2.5)	C	1	48,3
At1g45000	B3H533;Q9MAK9	putative ATPase component of 26S proteasome complex (AtRPT4b)	N	0	44,8
At1g48350	Q9SX68	putative component uL18C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL18)	C	0	18,7
At1g54150	A0A1P8AN81;Q9SYH3	putative SP1-like E3 ubiquitin ligase (AtSPL2/AtNERF)	SP	2	42,7
At1g65260	A0A1P8ATS2;O80796	putative chloroplast membrane fusion chaperone (AtVIPP1/AtIM30/AtPTAC4)	C	0	36,4
At2g01210	Q9ZU46	putative RLK-LRR-III receptor-like kinase, ZYGOTIC ARREST (AtZAR1)	SP	2	78,3
At2g21800	A0A1P8AYE0;Q84M98	putative component of MUS81-EME1 endonuclease complex (AtEME1a)	N	0	61,2
At2g28900	Q9ZV24	putative plastid outer envelope protein (AtOep16-1)	C	2	15,5
At2g31820	Q9SKB8	putative membrane protein of unknown function	N	4	73,1
At2g33800	P93014	putative component uS5C of small subunit of plastidial ribosome, SCABRA (AtcpRPS5/AtSCA1)	C	0	32,6
At2g43680	B3H4F6;Q8LPG9	putative scaffold protein for cellular signalling and trafficking (AtIQD14)	N	0	74,4
At3g01610	A0A1I9LNC6;Q9SS94	putative CDC48 ATP-dependent chaperone (AtCDC48c)	N	0	90
At3g02970	Q9M8T8	putative Phi-1-like protein of unknown function (AtEXL6)	SP	0	36,6
At3g14590	A0A1I9LPP2;A0A1I9LPP1;Q67XP8;F4IW75;B3H411	putative (animal synaptotagmin)-like protein of unknown function (AtNTMC2T6.2)	M	0	78,1
At3g15351	F4IYP9;Q9LJR1	protein of unknown function	N	0	18,3
At3g48050	Q9SU69;A0A1I9LTA1;F4JCS8	putative regulator of miRNA-mediated translational repression (AtSUO)	M	0	171,9

At3g50820	Q9S841;P23321	membrane-extrinsic subunit of photosystem II complex (AtPsbO2)	C	1	35
At3g53460	F4JAF3;Q43349	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP29A)	C	0	36
At3g57280	Q93V66	putative plastid fatty acid exporter (AtFAX1)	C	4	24,3
At3g62060	A0A1I9LQL7	putative pectin acetylerase (AtPAE6)	SP	1	46,5
At3g63490	F4J296;Q9LY66;F4HYQ5	putative component uL1C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL1)	C	0	37,6
At4g20810	Q9SVG6	putative alpha subunit of TFIIIE basal transcription factor complex	N	0	47,8
At4g21534	F2Y4A3	putative sphingosine kinase (AtSPHK2)	SP	0	53,9
At4g24390	Q8RWQ8	putative substrate adaptor of auxin co-receptor SCF ubiquitin ligase (AtAFB4)	C	0	69,5
At4g24770	Q04836	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP31A)	C	0	35,8
At4g24860	A0A1P8B505;A0A1P8B504; A0A1P8B512;F4JRR2	putative AAA-type ATPase associated with unknown cellular activities	C	0	124,2
At5g05560	A0A1P8BDT7;A0A1P8BDT3	putative APC1-like component of APC/C E3 ubiquitin ligase complex (AtAPC1)	SP	5	186,3
At5g14320	B3H631;P42732	putative component uS13C of small subunit of plastidial ribosome (AtcpRPS13)	C	0	19,1
At5g23060	A0A1P8BCX7;Q9FN48	putative calcium-sensing receptor (AtCaS/AtSTR3)	C	1	41,3
At5g24490	Q94K97	putative chlororibosome hibernation-promoting factor (AtPSRP1)	C	0	34,9
At5g50500	Q9FGP5	protein of unknown function	M	0	15,9
At5g66190	Q9FKW6;F4JZ46	chloroplast-targeted ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase (AtFNR1/AtLFNR1)	C	1	40,3
AtCg00540	P56771	putative apocytochrome f component of cytochrome b6-f electron transfer complex (AtPetA)	-	2	35,4
AtCg00770	P56801	putative component uS8C of small subunit of plastidial ribosome (AtcpRPS8)	-	1	15,5
AtCg00780	P56792	putative component uL14C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL14)	-	0	13,6
AtCg01280	P56786	putative YCF2 component of YCF2-FtsHi protein translocation ATPase motor complex (AtYCF2b)	-	2	269,6
-	CON_Q9U6Y5	GFP			

**Tabelle S3: Proteine, die in ausgeschnittenen Banden des zweiten Versuchs eines FAX1-GFP-pull downs detektiert wurden.** Der *Arabidopsis Genome Identifier* (AGI)-Code, die Protein-ID (UniProt), die Beschreibung, Lokalisation, Anzahl an Transmembrandomänen (TMs) sowie das Molekulargewicht (MW) in kDa nach ARAMEMNON (Schwacke et al., 2003) sind dargestellt. Die Lokalisation basiert auf der *consensus prediction AramLocCon* nach (Schwacke et al., 2007). Nur Lokalisationswerte über „1“ werden aufgelistet. Chloroplasten-codierte Proteine wurden nach ARAMEMNON nicht zugeordnet. Die Vorhersage der Transmembrandomänen wurde durch *ConPred\_v2* (Arai et al., 2004) bestimmt oder, falls nicht verfügbar, mit *AramTmMulticon* (Schwacke & Flügge, 2018). Es werden Proteine aufgeführt, die aus SDS-Gelbanden auf Höhe von 15 bis 100 kDa ausgeschnitten und sequenziert wurden. FAX1 und GFP sind hervorgehoben. C: Chloroplast, M: Mitochondrium, N: Nukleus, SP: sekretorischer Weg. \*Beschreibung nach TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>).

AGI-Code	Protein-ID	Beschreibung	Lokalisation	TM	MW [kDa]
At1g01080	A0A1P8APK3;Q8W592	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP28B)	C	0	32,6
At1g02150	Q8LPS6	putative plastidial ndhA-mRNA splicing factor (AtCRR16)	M	0	59,9
At1g02280	O23680	GTPase component of chloroplast protein import machinery (AtToc33)	C	0	32,9
At1g03630	F4I2F8;O48741	NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (AtPorC)	C	0	43,9
At1g06190	A0A1P8AM12;Q94K75;A0A1P8AM09;F4IPY0	putative plastidial DNA:RNA hybrid helicase (AtRHON1)	C	0	44,5
At1g07320	Q2V4Q4;Q3EDH2;O50061	putative component uL4C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL4)	C	0	30,6
At1g07660	P59259;A8MRV1	putative H4-type histone	N	0	11,4
At1g07910	Q0WL81;A0A2H1ZEA2	putative tRNA ligase involved in pre-tRNA splicing (AtRLG1/AtRNL)	C	0	123,2
At1g07930	F4HUA0;Q8W4H7;Q8GTY0;Q0WL56;P0DH99	putative eukaryotic translation elongation/termination factor	-	0	49,5
At1g09080	Q8H1B3	putative BiP endoplasmic reticulum molecular chaperone (AtBiP3/AtBP3/AtHsp70-13)	SP	1	75,2
At1g09340	A0A1P8ATL2;Q9SA52	putative regulatory protein of plastidial transcription/translation , CHLOROPLAST RNA BINDING (AtCSP41b/AtCRB/AtHIP1.3)	C	0	42,6
At1g10180	Q9SY60	putative Exo84-like component of Exocyst complex (AtEXO84c)	N	0	86,7
At1g11860	A0A2H1ZEA9;O65396	putative aminomethyltransferase component of glycine decarboxylase complex (AtGDT1/AtGDC-T1)	M	0	44,4
At1g12150	Q9FWW5	protein of unknown function	C	0	62,7
At1g12900	F4HNZ6;A0A1P8APR6;P25856;Q9LPW0	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (AtGAPa-2)	C	0	42,8
At1g13800	Q9LMH5	putative PPR-type organelle RNA processing factor	M	0	100,5
At1g16030	Q9S9N1	putative Hsp70 cytosolic molecular chaperone (AtHsp70-5)	-	0	70,9
At1g16300	Q5E924;Q9SAJ6	plastidial glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (AtGAPcp-2)	C	0	44,8

At1g16720	Q8W4D6;A0A1P8AWU9;A0A1P8AWY1	putative PS-II biogenesis factor, activates psbA translation (AtHCF173)	C	0	65,7
At1g17110	F4I642;Q9FPS9	ubiquitin-specific protease (AtUBP15/AtSOD2)	SP	1	103,7
At1g20020	Q8W493	chloroplast-targeted ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase (AtFNR2/AtLFNR2)	C	1	41,2
At1g22300	F4I1C1;P48347;F4IP53;F4IP55;Q9S9Z8;Q96299	putative regulatory 14-3-3 phosphoprotein-binding protein (AtGRF10/AtGF14-epsilon)	-	0	28,9
At1g24360	P33207	putative dual-localized ketoacyl-ACP reductase (AtKAR1)	C	2	33,5
At1g32060	P25697	phosphoribulokinase (AtPRK)	C	0	44,5
At1g34430	Q9C8P0	putative E2 dihydrolipoyl acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (AtcpPDC-E2.5)	C	1	48,3
At1g42970	P25857	plastidial glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (AtGAPb)	C	0	47,7
At1g44575	Q9XF91;F4IEG8	putative 22kDa component of photosystem II (AtPsbS/AtNPQ4)	C	4	28
At1g48350	Q9SX68	putative component uL18C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL18)	C	0	18,7
At1g52740	Q9C944;F4JT33;Q9T0H7;Q9LD28;O81826;Q9LHQ5	putative H2A.Z-type histone (AtHTA9)	N	0	14,3
At1g56410	Q9C7X7;P22954;O65719;Q9LHA8;P22953;F4KCE5	putative Hsp70 cytosolic molecular chaperone (AtHsp70-18)	-	0	68,4
At1g57570	F4I837	putative Jacalin-type lectin (AtJAL14)	M	0	68,9
At1g63680	F4I3P9	putative UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase (AtMURE/AtPDE316)	C	1	85,6
At1g65260	A0A178W0D3;O80796	putative chloroplast membrane fusion chaperone (AtVIPP1/AtIM30/AtPTAC4)	C	0	36,4
At1g67170	Q84TD8	putative component of FRI transcription activator complex (AtFLXL2/AtFLL2)	C	0	39,7
At1g68830	Q9S713	putative LHCII component kinase, STATE TRANSITION (AtSTN7)	C	2	63,3
At1g75350	Q9FWS4	putative component bL31C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL31)	C	0	16
At2g20890	Q9SKT0	chloroplast outer envelope membrane thylakoid formation protein (AtTHF1/AtPsb29)	C	0	33,8
At2g21870	F4III4;Q9SJ12	putative 24kD subunit of mitochondrion MF0-ATP synthase complex	M	0	27,6
At2g28900	Q9ZV24	putative plastid outer envelope protein (AtOep16-1)	C	2	15,5
At2g31660	F4IRR2	putative KAP/IMP-beta nucleocytoplasmic transport cargo receptor, ENHANCED MI-RNA ACTIVITY (AtSAD2/AtEMA1)	SP	0	119,3
At2g33370	F4J3P1;P49690	putative component uL14 of large subunit of cytosolic ribosome (AtRPL23b)	M	0	15
At2g33800	P93014	putative component uS5C of small subunit of plastidial ribosome, SCABRA (AtcpRPS5/AtSCA1)	C	0	32,6
At2g34420	Q39141;Q8VZ87;P0CJ48;P04778;Q9SHR7;Q9S7J7	light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (AtLHCb1.5)	C	2	28,1

At2g35410	O82299	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP33B)	C	0	33,8
At2g36160	Q9SIH0;Q9CAX6;P42036	putative component uS11 of small subunit of cytosolic ribosome (AtRPS14a)	-	0	16,3
At2g36460	Q9SJK9;Q9LF98;O65581;F4KGG0	putative fructose-bisphosphate aldolase (AtFBA6)	C	0	38,4
At2g37220	Q9ZUU4	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP29B)	C	0	30,7
At2g39230	O80958	putative PPR-type organelle RNA processing factor	M	0	97,7
At2g42725	A0A1P8AZ37	transcription factor*	-	-	-
At2g43030	Q9SKX4	putative component uL3C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL3)	C	0	29,4
At3g01500	A0A1I9LQB3;A8MQY4;F4K875;F4K873;P42737	beta carbonic anhydrase (AtBCA1/AtCA1)	SP	0	29,5
At3g03710	Q8GZQ3	putative polyribonucleotide nucleotidyltransferase (AtPNP1/AtRIF10)	C	0	99,6
At3g06510	Q93Y07	putative glycosyl hydrolase-like galactosyl transferase, SENSITIVE TO FREEZING (AtSFR2)	SP	2	70,8
At3g08940	Q9XF88	light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (AtLHCb4.2)	C	1	25
At3g09480	Q9SF55;Q9LZ45;Q9ZUS0;Q9LFF6;Q9LZT0;Q9FFC0	putative H2B-type histone (AtH2B5)	N	0	14
At3g09840	P54609;Q9LZF6;Q9SCN8	putative CDC48 ATP-dependent chaperone (AtCDC48a)	C	0	89,4
At3g12110	P53496;F4J8V9;Q96293;Q96292	putative actin (AtACT11)	-	0	41,7
At3g12390	Q9LHG9;Q6ICZ8	putative subunit of nascent polypeptide-associated complex (AtNACA1)	N	0	22
At3g12915	F4JB06;Q9ASR1	putative type 2 translation elongation factor	SP	0	91
At3g13120	Q9LK61	putative component uS10C of small subunit of plastidial ribosome (AtcpRPS10)	C	0	20,8
At3g13920	A8MRZ7;F4JEL4;A0A1I9LSZ7;P41377;P41376;Q9CAI7	putative translation initiation factor (AtTIF4A-1/AtRH4)	N	0	46,7
At3g14110	F4JFR2;F4JFR1;Q940U6	putative negative regulator of 5-aminolevulinic acid biosynthesis, FLUORESCENCE-IN-BLUE-LIGHT (AtFLU)	C	1	34,6
At3g14590	A0A1I9LPP2;A0A1I9LPP1;Q67XP8;F4IW75;B3H4I1	putative (animal synaptotagmin)-like protein of unknown function (AtNTMC2T6.2)	M	0	78,1
At3g15190	Q9ASV6	putative component bS20C of small subunit of plastidial ribosome (AtcpRPS20)	C	0	21,8
At3g18890	Q8H0U5	putative ferredoxin NADP-oxidoreductase membrane-tethering protein (AtTic62)	C	1	68,3
At3g21200	Q9LU39	putative regulatory protein of glutamyl-tRNA-reductase activity (AtGluTRBP/AtPGR7)	C	0	35,5
At3g22942	Q93V47	putative G-gamma component of canonical heterotrimeric G-protein complex (AtAGG2)	N	0	11,1
At3g25860	Q9SQI8	putative E2 dihydrolipoyl acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (AtcpPDC-E2.4/AtLTA2)	C	1	50,1

At3g25920	P25873	putative component uL15C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL15)	C	0	29,7
At3g46520	P53497;P53494;P53492;P0CJ47;P0CJ46;Q8RYC2	putative actin (AtACT12)	-	0	41,8
At3g46780	Q9STF2	putative component of plastidial RNA polymerase PEP complex (AtPTAC16)	C	0	54,4
At3g46820	P48485;P48482;P30366	PP1-type phosphoprotein phosphatase (AtTOPP5)	-	0	35,5
At3g50820	Q9S841;P23321	membrane-extrinsic subunit of photosystem II complex (AtPsbO2)	C	1	35
At3g52150	Q8VYM4	putative component cS22 of small subunit of plastidial ribosome (AtPSRP2/AtCP29C)	C	0	27,7
At3g52380	Q39061	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP33A)	C	0	35,7
At3g53240	A0A1I9LLM1;F4J9A8	putative cell surface receptor (AtRLP45)	SP	1	100,6
At3g53460	F4JAF3;Q43349	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP29A)	C	0	36
At3g54090	Q9M394	putative carbohydrate kinase involved in plastid transcriptional activity regulation (AtFLN1/AtPAP6)	C	0	53,8
At3g55440	P48491;Q9SKP6	triosephosphate isomerase (AtTPI)	-	0	27,2
At3g56940	Q9M591;F4J0U9	putative catalytic component of Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclase complex (AtCHL27)	C	1	47,6
At3g57280	Q93V66	putative plastid fatty acid exporter (AtFAX1)	C	4	24,3
At3g57560	Q9SCL7	putative N-acetylglutamate kinase (AtNAGK)	C	0	36,6
At3g62290	Q9M1P5;Q6ID97;A0A1P8BDK6;Q9LYJ3;Q9LQC8	putative ARF1 small GTPase (AtARFA1e)	M	0	20,6
At3g63140	Q9LYA9	putative regulatory protein of plastidial transcription/translation (AtCSP41a)	C	0	43,9
At3g63410	Q9LY74	putative tocopherol/plastoquinone biosynthesis methyl-phytyl-hydroquinone/-solanylbenzoquinone methyltransferase (AtVTE3/AtAPG1)	C	2	37,9
At3g63490	Q9LY66;F4J296;F4HYQ5	putative component uL1C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL1)	C	0	37,6
At4g01310	O04603	putative component uL5C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL5)	C	0	28,3
At4g05050	F4JGM3	putative Ubiquitin-type ubiquitin-fold polyubiquitin precursor protein (AtUBQ11)	N	0	25,7
At4g10340	Q9XF89	light-harvesting chlorophyll a/b binding protein of minor antenna complex (AtLHCb5/AtCP26)	C	3	30,2
At4g10750	O82487	putative aldolase/citrate lyase	C	0	38,4
At4g10930	A0A1P8B7Y2;A0A2H1ZEM1;Q8L7I1	protein of unknown function	N	0	108,1
At4g16155	F4JLP5;A8MS68	plastidic dihydrolipoamide dehydrogenase (AtptLPD2)	M	0	67,1
At4g19440	Q940A6	putative PPR-type organelle RNA processing factor	C	0	93,2
At4g20360	P17745	putative EF-Tu plastid translation elongation factor (AtTufA/AtRAB8D*/AtSVR11)	C	0	51,6
At4g20890	P29517;P24636;P12411;P29516;P29515;P29514	beta tubulin (AtTUB9)	N	0	49,7

At4g22540	Q940Y1	putative oxysterol-binding protein (AtORP2A)	N	0	82
At4g23260	F4JNH2;A0A1P8B8L9;A0A1P8B8K3;Q8RX80;Q8L710	putative CRK/DUF26 receptor-like protein kinase (AtCRK18/AtDUF26.20)	SP	2	72,8
At4g23895	F4JPD8;Q8LAH8;O49203	putative nucleoside diphosphate kinase	N	0	28
At4g24770	Q04836	putative chloroplast ribonucleoprotein (AtCP31A)	C	0	35,8
At4g27440	P21218;Q42536	NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (AtPorB)	C	0	43,4
At4g34900	A0A1P8B6H2;A0A1P8B6H0;F4JLI5;Q8GUQ8	xanthine dehydrogenase (AtXDH2)	SP	1	148,8
At4g39960	Q940V1;Q9SJZ7	putative Hsp40/DnaJ molecular co-chaperone (AtDjA5)	C	0	48
At4g40030	A8MRL0;P59226;P59169;Q9LR02;Q9FX60;Q9FXI7	putative H3.3-type histone (AtHTR4)	M	0	15,4
At5g01530	Q07473	light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (AtLHCb4.1/AtCP29)	C	3	31,1
At5g03940	P37107	component of SRP54-SRP43 complex of plastidic SRP protein translocase system (AtcpSRP54/AtFFC)	C	0	61,2
At5g08690	P83484;P83483;Q9C5A9	beta subunit of mitochondrial ATP synthase peripheral MF1 subcomplex (AtmtATP-beta2)	M	1	59,7
At5g09660	F4KDZ4;A8MRP1;A0A1P8BBQ0;B3H560;Q9ZP05	putative peroxisomal NAD-dependent malate dehydrogenase (AtpMDH2)	M	1	37,4
At5g10450	F4KGV2	putative regulatory 14-3-3 phosphoprotein-binding protein (AtGRF6/AtGF14-lambda)	-	0	28
At5g12470	Q94CJ5	putative RETICULATA-RELATED protein of unknown function (AtRER4)	C	4	41,3
At5g17270	A0A1P8BER5;Q9FFI4	protein of unknown function	N	1	101
At5g18410	B3H6L9;Q5S2C3	putative component of WAVE actin filament nucleation regulator complex, PIROGI (AtPIR/AtSRA1)	SP	3	145,5
At5g19770	Q56WH1;B9D HQ0;Q0WV25;P29511;B9DGT7;P11139	alpha tubulin (AtTUA3)	-	0	49,7
At5g23060	Q9FN48;A0A1P8BCX7	putative calcium-sensing receptor (AtCaS/AtSTR3)	C	1	41,3
At5g24260	A0A1R7T3L2	putative (mammal DPP)-like dipeptidyl peptidase	N	1	83,9
At5g24490	Q94K97	putative chlororibosome hibernation-promoting factor (AtPSRP1)	C	0	34,9
At5g24655	Q8L8S2	protein of unknown function, responsive to sulfur deficiency (AtLSU4)	C	0	10,6
At5g30510	Q93VC7	putative component bS1C of small subunit of plastidial ribosome (AtcpRPS1)	C	0	45,1
At5g35530	Q9FJA6;Q9M339;Q9SIP7	putative component uS3 of small subunit of cytosolic ribosome (AtRPS3c)	-	0	27,5
At5g40770	O04331;Q9LK25	putative type-I (yeast Prohibitin)-like chaperone protein (AtPHB3)	SP	1	30,4

At5g49030	Q8RXK8	putative isoleucyl-tRNA synthetase (AtIleRS1/AtOVA2)	C	0	123
At5g50920	Q9FI56;F4JF64;Q9SXJ7;P42762;Q8VYJ7	chaperone component of Clp-type protease complex (AtClpC1/AtHSP93-V)	C	0	103,5
At5g52640	P27323;P55737;P51818	putative Hsp90-type molecular chaperone (AtHSP90.1/AtHSP81.1)	N	0	81,2
At5g53840	Q9FGQ3	putative F-BOX substrate adaptor of SCF ubiquitin protein ligase (AtFBL13)	C	0	50,9
At5g55190	Q8H156;P41917;P41916	Ran-type small GTPase (AtRAN3)	N	1	25,1
At5g57345	Q8LAD4	protein of unknown function, involved in abiotic stress tolerance (AtOxR)	C	2	20,2
At5g59840	Q9FJF1;Q9SEH3;Q9FPJ4;P28188;Q9LZD4;P28186	putative RAB-E-class small GTPase (AtRAB-E1b/AtRAB8d)	SP	0	23,8
At5g61560	F4K3J6;A0A1P8BBM2	putative kinase, contains U-box domain (AtPUB51)	C	0	90,2
At5g64050	Q9FEA2	putative glutamyl-tRNA synthetase (AtGluRS/AtERS)	M	0	63,5
At5g64990	Q9LV79;Q9SID8;Q9LFT9;O80501;Q9SMR4	putative RAB-H-class small GTPase (AtRAB-H1a)	SP	0	23,1
At5g66190	Q9FKW6;F4JZ46	chloroplast-targeted ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase (AtFNR1/AtLFNR1)	C	1	40,3
At5g67510	Q9FJX2	putative component uL24 of large subunit of cytosolic ribosome (AtRPL26b)	M	0	16,8
AtCg00020	P83755	putative component D1 of photosystem II complex (AtPsbA)	-	6	38,9
AtCg00120	P56757	alpha subunit of plastidial ATP synthase peripheral CF1 subcomplex (AtcpATP-alpha)	-	0	55,3
AtCg00160	P56797	putative component uS2C of small subunit of plastidial ribosome (AtcpRPS2)	-	1	26,9
AtCg00270	P56761	putative component D2 of photosystem II complex (AtPsbD)	-	6	39,5
AtCg00280	P56778	putative component of photosystem II complex (AtPsbC/AtCP43)	-	6	51,9
AtCg00340	P56767	putative component of photosystem I complex (AtPsaB)	-	10	82,5
AtCg00480	P19366	beta subunit of plastidial ATP synthase peripheral CF1 subcomplex (AtcpATP-beta)	-	0	53,9
AtCg00490	O03042;F4INE2;P93292	putative large subunit of ribulose biphosphate carboxylase complex	-	0	53
AtCg00500	P56765	putative beta subunit of carboxyltransferase subcomplex of acetyl-CoA carboxylase complex (AtACCD)	-	0	55,6
AtCg00540	P56771	putative apocytochrome f component of cytochrome b6-f electron transfer complex (AtPetA)	-	2	35,4
AtCg00740	P56762	putative component of plastidial RNA polymerase PEP complex (AtRpoA)	-	0	38,1
AtCg00780	P56792	putative component uL14C of large subunit of plastidial ribosome (AtcpRPL14)	-	0	13,6
AtCg00800	P56798	putative component uS3C of small subunit of plastidial ribosome (AtcpRPS3)	-	1	25,2
AtMg01190	A0A2P2CLF9;F4IMB5	alpha subunit of mitochondrial ATP synthase peripheral MF1 subcomplex (AtmtATP-alpha)	-	0	55
-	CON_Q9U6Y5	GFP			

## Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

### Persönliche Daten

---

Vor- und Zuname	Janick Peter
Geburtsdatum	03.05.1993
Familienstand	ledig

### Ausbildung

---

09/2017 bis 10/2021	<b>Universität des Saarlandes</b> Doktorand am Lehrstuhl Pflanzenbiologie, AG Philippar Titel der Thesis: <i>Fatty acid export (FAX)-Proteine in Arabidopsis thaliana und Chlamydomonas reinhardtii</i>
04/2015 bis 08/2017	<b>Universität Bayreuth</b> Masterstudiengang Molekulare Ökologie Titel der Masterarbeit: Quantification of Drug Compounds in Tissue by Mass Spectrometry Imaging
04/2012 bis 03/2015	<b>Technische Universität Kaiserslautern</b> Bachelorstudiengang Biowissenschaften Titel der Bachelorarbeit: Phenotypic plasticity in the crustose lichen <i>Psora decipiens</i> : Investigation of desiccation-related parameters between ecotypes
08/2003 bis 03/2012	<b>Helmholtz-Gymnasium Zweibrücken</b> Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

### Publikationen

---

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

**Peter J.**, et al. (in Vorbereitung) Fatty acid export proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*.

## Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei Prof. Dr. Katrin Philippar bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Vielen Dank für die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses spannenden Projekts. Ebenso danke für die vielen Herausforderungen auf dem Weg zur Promotion, an denen ich wachsen konnte und die mich für die Zukunft geprägt haben.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Michael Schroda, der mir während der Promotion hilfreich zur Seite stand und die Rolle als Zweitgutachter dieser Dissertation angenommen hat.

Danke an die komplette AG Philippar, die mir die Arbeit am Lehrstuhl erleichtert hat. Besonderer Dank geht hier an Lina Bugaeva und Anne Könnel. Ohne euch wäre es nur halb so schön gewesen! Danke auch an Angelika Anna, die mir hilfreich im Labor zur Seite stand und immer ein offenes Ohr hatte. Ebenfalls danke an Nathalie Sebening, die mir bei bürokratischen Fragen helfend unter die Arme griff. Ich bedanke mich auch bei Dr. Jens Neunzig und Dr. Alexander Banguela-Castillo, die mir bei schwierigen Fragen weiterhelfen konnten und mit denen ich interessante Diskussionen führen konnte.

Auch meiner Bachelorstudentin Melanie Walz danke ich sehr für das Vertrauen in mich und die gute Zusammenarbeit bei der Bearbeitung ihrer Bachelorarbeit. Ebenso bedanke ich mich bei Maja Zeller für die Unterstützung bei diversen Projekten sowie die entstandene Freundschaft. Hannah Bau ist für die Hilfe bei verschiedenen Projekten in der Pflanzenanzucht zu danken. Ein genereller Dank geht an alle Hiwis, die unsere Arbeit im Labor erleichtert haben.

Danke auch an Prof. Dr. Uli Müller für die Unterstützung in der Funktion als wissenschaftlicher Begleiter und für die Hilfe bei Fluoreszenzmessungen sowie die Möglichkeit, bei ihm im Labor Experimente durchführen zu können.

Vielen Dank an die AG Schroda, dass ich verschiedene Projekte an der TU Kaiserslautern bearbeiten konnte. Ein großes Dankeschön geht an Benjamin Spaniol, der mich in der Arbeit mit Chlamydomonas betreut und unterstützt hat. Großer Dank gilt auch Dr. Frederik Sommer, der die massenspektrometrische Analyse aufgereinigter Proteine durchgeführt hat und immer ein offenes Ohr für Fragen hatte. Auch nochmals danke an Prof. Dr. Michael Schroda, der mich in meinem Tun unterstützt hat.

Weiterer Dank gilt Dr. Yonghua Li-Beisson für die Möglichkeit, einen Auslandsaufenthalt in ihrer Arbeitsgruppe in Frankreich verwirklichen zu können. Danke auch für die konstruktiven Gespräche und hilfreichen Vorschläge für meine Dissertation. Ich möchte mich bei Dr. Adrien Burlacot und Dr. Solène Moulin für die Unterbringung in ihrem Zuhause bedanken. Ihr habt die

Zeit in Frankreich zu einem großartigen Erlebnis gemacht! Generell bedanke ich mich bei der AG Li-Beisson für die herzliche Unterstützung bei meinen Projekten. Vielen Dank an Pascaline Auroy für die Hilfe in der Chlamydomonas-Anzucht sowie an Marie Huleux für die tatkräftige Unterstützung bei den Immunofluoreszenz-Analysen.

Danke an meinen früheren Kommilitonen Fabian Hollmann für die abwechslungsreichen Besuche während meiner Promotion und die unterstützenden Gespräche.

Vielen Dank an alle Korrekturleser und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge, die diese Arbeit aufgewertet haben.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei meiner Familie und all meinen Freunden bedanken, die mir während der Promotion zur Seite standen. Danke an Dr. Sonja Dähn für die schönen Lauftreffs an der Uni und das gemeinsame Aufregen über Gott und die Welt. Danke an Lina Bugaeva und Dr. Marie Kümmel für die erholsamen Treffen am Staden mit Wein und Snacks. Großer Dank geht auch an Pascal Berger, der mich während der gesamten Promotion unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Vielen Dank für deine Freundschaft!

## **Eidesstattliche Versicherung**

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

Saarbrücken, den