

Heterologe Expression und Charakterisierung pflanzlicher Transportproteine

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Michael Eicks

aus Rheinbach

Mai 2004

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

© Copyright Logos Verlag Berlin 2003
Alle Rechte vorbehalten.

ISBN 3-8325-0681-0

<http://www.logos-verlag.de/cgi-local/buch?isbn=0681>

Logos Verlag Berlin
Comeniushof, Gubener Str. 47
10243 Berlin
Tel.: +49 030 42 85 10 90
Fax: +49 030 42 85 10 92
INTERNET: <http://www.logos-verlag.de>

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von Dezember 1998 bis Januar 2004 am Botanischen Institut der Universität zu Köln angefertigt. Die vorliegende Dissertation ist von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln angenommen worden.

Berichtersteller: Prof. Dr. U.-I. Flügge
Prof. Dr. S. Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2004

"That's the whole problem with science.
You've got a bunch of empiricists trying to
describe things of unimaginable wonder."

Bill Watterson's *Calvin and Hobbes*, *The
days are just packed* (1993)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Kompartimentierung des Stoffwechsels	1
1.2. Transportvorgänge an Plastiden	2
1.2.1. Plastidäre Phosphattranslokatoren	3
1.2.1.1. Der Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT)	3
1.2.1.2. Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT)	4
1.2.1.3. Der Glukose-6-phosphat/Phosphat-Translokator (GPT)	5
1.2.2. Der Transport von Pentosephosphaten über die Plastidenhüllmembran	6
1.2.3. Der Crassulaceen-Säurestoffwechsel von <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	8
1.2.4. Messung von Transporteigenschaften	9
1.3. Die Analyse von Mutanten bei der Aufklärung von Stoffwechselprozessen	9
1.3.1. Molekularbiologische Strategien der Mutantanalyse	10
1.3.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> als Modellorganismus	11
1.4. Zielsetzung	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Material	13
2.1.1. Chemikalien	13
2.1.2. Vektoren	13
2.1.3. Bakterien- und Hefestämme	14
2.1.4. Pflanzen	14
2.2. Methoden	14
2.2.1. Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
2.2.1.1. Langtag-Wachstumsbedingungen im Gewächshaus	15
2.2.1.2. Kurztag-Wachstumsbedingungen in der Phytokammer	15
2.2.1.3. Hochlicht/UV-Anzuchtammer	15
2.2.2. Mikrobiologische Methoden	16
2.2.2.1. Anzucht von <i>E. coli</i>	16
2.2.2.2. Herstellung kompetenter Zellen	17
2.2.2.3. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	18
2.2.2.4. Selektion auf Indikatorplatten	18
2.2.2.5. Selektion positiver Klone mit Hilfe der PCR	19
2.2.2.6. Herstellung und Transformation kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	20
2.2.2.7. Expression rekombinanter Proteine	21
2.2.2.8. Arbeiten mit <i>S. pombe</i>	22
2.2.3. Molekularbiologische Methoden	23
2.2.3.1. Schnellpräparation genomischer DNA aus Pflanzengewebe	23
2.2.3.2. Präparation von gDNA nach der CTAB-Methode	24
2.2.3.3. Southern-Blot	24
2.2.3.4. Durchsicht von transgenen Pflanzenpopulationen über PCR	26
2.2.3.5. Präparation von RNA aus Pflanzengewebe	27
2.2.3.6. Elektrophorese von RNA	28
2.2.3.7. Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	29

2.2.3.7.1.	RNA	29
2.2.3.7.2.	DNA	30
2.2.3.8.	Abschätzung von Nukleinsäurekonzentrationen in Agarosegelen	30
2.2.3.9.	Northern-Blot	31
2.2.3.10.	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	31
2.2.3.10.1.	Sondensynthese	31
2.2.3.10.2.	Kontrolle der Einbaurate	32
2.2.3.10.3.	Reinigung der DNA-Sonden	33
2.2.3.11.	Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Sonden mit RNA-Blots	33
2.2.3.12.	Detektion radioaktiver Hybridisierungssignale	34
2.2.3.13.	RT-PCR	34
2.2.4.	Biochemische Methoden	34
2.2.4.1.	Mechanischer Aufschluss von Hefezellen und Proteingewinnung	34
2.2.4.2.	Auftrennung von Proteinextrakten über SDS-PAGE	36
2.2.4.3.	Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau	37
2.2.4.4.	Proteinfärbung mit Silbernitrat	38
2.2.4.5.	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot)	39
2.2.4.6.	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen	39
2.2.4.7.	Bestimmung von Proteinmengen in Lösungen	40
2.2.5.	Physiologische Methoden	41
2.2.5.1.	Messungen im Pulsamplitudenmodulationsverfahren an intakten Blättern	41
2.2.5.2.	Bestimmung der Blattfläche von <i>A. thaliana</i>-Blättern	41
2.2.5.3.	Transportexperimente mit Proteoliposomen	42
2.2.5.3.1.	Reinigung von Phosphatidylcholin für die Liposomenherstellung	42
2.2.5.3.2.	Extraktion und Solubilisierung von Membranproteinen	42
2.2.5.3.3.	Rekonstitution von Membranproteinen	43
2.2.5.3.4.	Messung der Transportraten	44
2.2.5.4.	Stärkeextraktion	45
2.2.5.5.	Enzymaktivitätsbestimmungen aus Blattextrakten	45
2.2.5.5.1.	Aufschluss von Blattmaterial	46
2.2.5.5.2.	NADP-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.13)	47
2.2.5.5.3.	Enzyme des Oxidativen Pentosephosphatwegs	47
2.2.5.5.3.1.	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)	48
2.2.5.5.3.2.	Phosphoglukonat-Dehydrogenase (decarboxylierend, EC 1.1.1.44)	48
2.2.5.5.4.	Bestimmung von Glutathion per HPLC	48
2.2.5.6.	Bestimmung der Stärkegehalte in Blattproben	49
2.2.5.7.	Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker in Blattproben	50
2.2.5.8.	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in Lösungen	50
2.2.5.9.	Methanolische Extraktion von Pflanzengewebe	51
2.2.5.9.1.	Auftrennung von Flavonoiden per HPLC	51
2.2.5.9.2.	Messung des Anthocyangehaltes in Blattproben	51
3.	Ergebnisse	52
3.1.	Heterologe Expression und Charakterisierung des Pentosephosphat/Phosphat-Translokators aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
3.1.1.	Sequenzanalysen	52
3.1.2.	Expression in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	56

3.1.3. Aufreinigung des heterolog exprimierten Proteins über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatografie	56
3.1.4. Transportversuche mit gereinigtem, nativem Protein	58
3.1.4.1. Bestimmung der optimalen Proteinmenge	58
3.1.4.2. Untersuchung der Sättigung des homologen Phosphattransportes	59
3.1.4.3. Ermittlung der Michaelis-Konstante für anorganisches Phosphat	60
3.1.4.4. Messung der Substratspezifität	62
3.1.4.5. Kompetitionsexperimente und K_i-Werte	63
3.1.5. Datenbank-Recherche nach OPPP-Enzymen im Genom von <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
3.1.5.1. D-Ribulose-5-Phosphat 3-Epimerasen	67
3.1.5.2. Ribose-5-Phosphat Isomerasen	68
3.1.5.3. Transketolasen	68
3.1.5.4. Transaldolasen	68
3.1.6. Transportversuche mit Gesamtprotein aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
3.1.7. Weitere Ergebnisse	70
3.1.7.1. Das XPT-Gen	70
3.1.7.2. Expressionsmuster des XPT-Gens	71
3.2. Die <i>xpt-1</i>-Insertionsmutante	73
3.2.1. Molekularbiologische und genetische Charakterisierung	73
3.2.1.1. PCR-Analysen	73
3.2.1.2. RT-PCR-Analysen	74
3.2.1.3. Southern-Blot und Segregation	75
3.2.2. Physiologische Untersuchungen	77
3.2.2.1. Anzucht unter Hochlicht und UV-B-Strahlung	77
3.2.2.2. Wachstums-Charakteristika	78
3.2.2.3. Chlorophyll- und Anthocyanogehalte	79
3.2.2.4. Bestimmung der Flavonoidprofile	80
3.2.2.5. Photosynthesemessungen	82
3.2.2.6. Bestimmung der Gehalte an löslichen Zuckern und Stärke	84
3.2.2.7. Aktivitätsmessung von OPPP-Enzymen und GAP-DH	86
3.2.2.8. Glutathiongehalte	87
3.3. Untersuchungen an plastidären Phosphattranslokatoren aus <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	90
3.3.1. Vorbemerkungen	90
3.3.1.1. CAM-Induktion	91
3.3.1.2. Expressionsanalysen der Phosphattranslokator-Gene	91
3.3.1.3. Physiologische Messungen	91
3.3.2. Transportversuche mit <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	92
4. Diskussion	93
4.1. Der plastidäre Pentosephosphat/Phosphat-Translokator (XPT)	93
4.1.1. Der XPT innerhalb der pPT-Familie	94
4.1.2. Heterologe Expression	95
4.1.3. Transportversuche mit nativem XPT-Protein	96
4.1.3.1. Pentosephosphat-Transport durch den GPT?	97
4.1.4. Der OPPP in <i>Arabidopsis thaliana</i>	98
4.1.5. Pentosephosphattransport unter Staunässe	100
4.1.6. Expressionsanalysen und Genstruktur	101
4.2. Die <i>xpt-1</i>-Mutante	102

4.2.1.	Phänotypen und pPT-Mutanten	102
4.2.2.	Veränderungen im Metabolismus von <i>xpt-1</i>	103
4.2.2.1.	Sekundärmetabolite	103
4.2.2.2.	Zucker- und Stärkegehalte	104
4.2.2.3.	Photosyntheseleistung	105
4.2.2.4.	Wachstumsverhalten und Chlorophyllgehalte	106
4.2.2.5.	Cytosolische OPPP-Aktivitäten und Redoxstatus	107
4.3.	XPT und <i>xpt-1</i>: Fazit und Versuch einer Integration	109
4.4.	Plastidäre Phosphattranslokatoren aus <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	113
4.4.1.	CAM-Induktion und Expressionsmuster	113
4.4.2.	Die Transportaktivitäten im Rahmen des CAM	114
4.4.2.1.	Während der Dunkelperiode	114
4.4.2.2.	Während der Lichtperiode	114
4.4.3.	Fazit	115
5.	Zusammenfassung	117
6.	Abkürzungen	119
7.	Literaturverzeichnis	122
8.	Anhang	132
8.1.	Der XPT <i>in silico</i> (http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de)	132
8.1.1.	Protein- und cDNA-Sequenzen	132
8.1.2.	Genomische Sequenz	133
8.1.3.	Lokalisations- und Membranspannungsvorhersagen	135
8.2.	Verwendete Gleichungen	136
8.2.1.	Michaelis-Menten-Geradengleichung	136
8.2.2.	Umformung der K_j-Gleichung	136
8.3.	In silico-Lokalisationsvorhersagen der OPPP-Enzyme	137
8.3.1.	D-Ribulose-5-Phosphat 3-Epimerasen	137
8.3.2.	Ribose-5-Phosphat Isomerasen	138
8.3.3.	Transketolasen	139
8.3.4.	Transaldolasen	140
8.4.	Sequenzen verwendeter Oligonukleotide	141

1. Einleitung

1.1. Die Kompartimentierung des Stoffwechsels

Der fundamentale Unterschied zwischen den Zellen pflanzlicher und denen anderer eukaryotischer Organismen ist die Fähigkeit zur Photosynthese. In diesem Prozess wird das Sonnenlicht zur Bildung chemischer Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) und reduziertem Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) genutzt. Diese Energie wird bei der Assimilation, der Umwandlung von atmosphärischem Kohlendioxid (CO_2) in Biomasse, verbraucht. Diese Fähigkeit der Pflanzen beruht auf dem Besitz eines zusätzlichen Kompartiments, den Plastiden. Nach einer heute allgemein akzeptierten Theorie handelt es sich hierbei, wie bei den Mitochondrien, um Abkömmlinge eigenständiger, einzelliger Organismen, ähnlich Cyanobakterien wie z.B. *Synechocystis*. Diese wurden im Laufe der Evolution durch endocytotische Vorgänge in die Zellen anderer Organismen aufgenommen und konnten sich dort co-evolutiv als Organellen etablieren (Endosymbiontentheorie; Martin et al, 2002; McFadden, 1999a). Die Plastiden übernehmen in der Pflanzenzelle einen Großteil der biochemischen Leistungen. Sie sind Ort der Assimilation von anorganischem Stickstoff und Sulfat, der Synthese bestimmter Aminosäuren, der Lipid- und Stärkebiosynthese sowie der Produktion von Sekundärmetaboliten und Pigmenten. Diese verschiedenartigen Leistungen variieren mit der jeweiligen Spezies, dem Entwicklungszustand, sowie in verschiedenen Geweben einer Pflanze. Man unterscheidet eine Reihe verschiedener Plastidentypen, die alle aus den undifferenzierten Proplastiden meristematischer Gewebe hervorgehen und sich zum Teil auch ineinander umwandeln können. Die chlorophyllhaltigen, grünen Chloroplasten sind der Ort der photosynthetischen CO_2 -Assimilation. Die farblosen Leukoplasten dienen der Stoffspeicherung; man unterscheidet stärke-speichernde Amyloplasten, ölspeichernde Elaioplasten und proteinspeichernde Proteinoplasten, die in nicht-grünen Geweben wie Wurzeln, Samen und Knollen vorkommen. Darüber hinaus kennt man die durch Carotinoide gelb, orange oder rot gefärbten Chromoplasten, die oft Blüten und Früchten ihre Farbe verleihen, sowie die durch Etiolierung entstehenden, farblosen Etioplasten.

Neben den Plastiden, die im Falle der Chloroplasten selbst wiederum in Stroma und Thylakoidlumen kompartimentiert sind, existieren in der Pflanzenzelle noch weitere Kompartimente (Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Golgiapparat, Nukleus, Vakuole, Cytoplasma). Um die unterschiedlichen Stoffwechselwege in den verschiedenen

Kompartimenten zu integrieren, ist ein kontrolliertes Zusammenwirken nötig, das die Biosyntheseleistungen der Kompartimente den speziellen Bedürfnissen der Zelle anpassen kann. Dies geschieht maßgeblich durch einen kontrollierten Transport von physiologisch wichtigen Metaboliten über die Kompartimente trennenden Biomembranen.

1.2. Transportvorgänge an Plastiden

In Einklang mit der Endosymbiontentheorie sind Plastiden von zwei Biomembranen umgeben. Die äußere Plastidenhüllmembran, deren Ursprung bisher nicht völlig geklärt ist (Cavalier-Smith, 2000; Keegstra et al., 1984), besitzt Galaktolipide und Carotinoide, was auf einen prokaryotischen Ursprung schließen lässt. Darüber hinaus enthält sie mehrere Porin-ähnliche Proteine, von denen man mittlerweile weiß, dass sie eine ausgeprägte Substratspezifität besitzen (Flügge, 2000; Soll et al., 2000). Die innere Plastidenhüllmembran ist dem ursprünglich aufgenommenen Endosymbionten zuzurechnen. Sie bildet die eigentliche physiologische Barriere, da sie Sitz vieler Translokatoren ist, die den spezifischen Transport einer Vielzahl von Substanzen regulieren. Um nur zwei Beispiele zu nennen, seien hier der plastidäre 2-Oxoglutarat/Malattransporter und der plastidäre ATP/ADP-Transporter erwähnt. Der plastidäre 2-Oxoglutarat/Malattransporter, der 2-Oxoglutarat importiert und Malat exportiert (Weber et al., 1995), gehört zu den Dicarboxylattransportern, von denen ein zweiter den Austausch von Glutamat mit cytosolischem Malat vermittelt. Deren Funktion spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Ammoniumassimilation, während der Nitritreduktion und der Photorespiration über den sog. Oxalacetat-Malat-Shuttle (Woo et al., 1987). Der plastidäre ATP/ADP-Transporter tauscht cytosolisches ATP gegen stromales ADP und energetisiert so anabolische Reaktionen wie Stärke- und Fettsäuresynthese in nicht-grünen Plastiden. Im Gegensatz zum mitochondrialen System verläuft der Transport in Plastiden "umgekehrt" (Kampfenkel et al., 1995; Neuhaus et al., 1997). Auch konnten u.a. Glukose- und Maltosetransportvorgänge beobachtet werden (Lu and Sharkey, 2004; Niittyla et al., 2004; Schäfer et al., 1977). Ein Glukosetransporter ist mittlerweile von Weber et al. (2000) identifiziert und molekular charakterisiert worden.

1.2.1. Plastidäre Phosphattranslokatoren

Die plastidären Phosphattranslokatoren (pPTs) sind ein weiteres Beispiel gut charakterisierter pflanzlicher Transporter. Diese Proteine der inneren Chloroplastenhüllmembran sind für den kontrollierten Austausch von anorganischem Phosphat (P_a) gegen verschiedene phosphorylierte Metabolite verantwortlich und entscheidend für die Funktion des Stoffwechsels. Man unterteilt diese Proteinfamilie in vier Unterfamilien mit teilweise überlappenden Substratspezifitäten. Innerhalb einer Unterfamilie besitzen die Proteine auf Aminosäureebene 75-85% Sequenzidentität, während die Homologie zwischen den Unterfamilien 30-45% beträgt. Es sind jedoch auch mehrere, in der pPT-Familie höher konservierte Bereiche zu finden (Kammerer et al., 1998). Ebenfalls sind zwei Aminosäuren (Lysin und Arginin) der mutmaßlichen Substratbindestelle nahe des C-Terminus (Fischer et al., 1994) und zusätzlich ein Lysinrest nahe des N-Terminus konserviert (Knappe et al., 2003a). Die *in silico*-Vorhersagen für die Anzahl an Membranspannen in Phosphattranslokator-Proteinen liegen zwischen sieben und acht (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>; Schwacke et al., 2003); alle PTs sind kernkodiert und besitzen eine N-terminale Transitsequenz, welche die Proteine in die Plastiden dirigiert (Flügge, 1999; McFadden, 1999b) und dort abgespalten wird (May and Soll, 1999). Unter physiologischen Bedingungen werden die Substrate im strikten 1:1 Gegentausch nach einem Ping-Pong-Mechanismus transportiert (Flügge, 1992). Die Phosphattranslokatoren liegen im funktionellen Zustand als Homodimere vor (Flügge, 1998; Wagner et al., 1989).

1.2.1.1. Der Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT)

Der TPT katalysiert den Gegentausch von Triosephosphaten (Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat, DHAP) und 3-Phosphoglycerat (3-PGA) gegen P_a . Seine physiologische Funktion besteht im Export der im Verlauf der photosynthetischen CO_2 -Assimilation gebildeten Triosephosphate ins Cytosol im strikten Gegentausch mit anorganischem Phosphat (Fliege et al., 1978; Flügge and Heldt, 1981; Flügge and Heldt, 1991). Die Triosephosphate (TP) dienen im Cytosol der Bildung von Saccharose und Aminosäuren. Das Phosphat wird während dieser Biosynthesen im Cytosol freigesetzt und steht durch den Rücktransport in das Chloroplastenstroma wieder der

Photophosphorylierung zur Verfügung. Des Weiteren kann durch den Gegentausch von 3-PGA und TP das Cytosol mit chemischer Energie und Reduktionsäquivalenten versorgt werden. Dazu wird in das Chloroplastenstroma importiertes 3-PGA unter Verbrauch von ATP und NADPH aus der Lichtreaktion zu Triosephosphat reduziert und kann nach Export in das Cytosol dort glykolytisch zu 3-PGA reoxidiert werden. Dabei entstehen ATP und NAD(P)H (Flügge, 1999). Der TPT stellt mit 10-15% des Gesamtproteins das häufigste und am besten charakterisierte Protein der inneren Chloroplastenhüllmembran dar. Seine Expression ist auf grüne Gewebe beschränkt (Fischer et al., 1997; Schulz et al., 1993). Das rekombinante TPT-Protein konnte in *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*, Spaltheffe) funktionell exprimiert und in Liposomen rekonstituiert werden (Loddenkötter et al., 1993). Die Rolle des TPT im photosynthetischen Kohlenstoffmetabolismus wurde durch Antisense-Experimente in Kartoffel- (Riesmeier et al., 1993) und Tabakpflanzen (Häusler et al., 1998) untersucht. Mittlerweile ist auch eine *Arabidopsis* TPT-Mutante eingehend charakterisiert worden (Schneider et al., 2002).

1.2.1.2. Der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokator (PPT)

Der PPT katalysiert den Gegentausch von Phosphoenolpyruvat (PEP), 2-Phosphoglycerat (2-PGA) und P_a . Unter physiologischen Bedingungen spielt jedoch nur der Gegentausch von PEP und Phosphat eine Rolle (Fischer et al., 1997). Von einigen Ausnahmen abgesehen sind die Plastiden vieler Pflanzen nicht in der Lage, 3-PGA in PEP umzuwandeln, da ihnen die Enzyme Phosphoglycerat-Mutase und/oder Enolase fehlen (Borchert et al., 1993; Stitt and ap Rees, 1979). Eine Versorgung der Plastiden mit PEP, das im Cytosol auf glykolytischem Wege aus Hexosen oder TP gebildet werden kann, ist jedoch aus mehreren Gründen erforderlich. PEP dient, zusammen mit Erythrose-4-phosphat (Ery4P), in den Plastiden als Vorstufe für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren über den Shikimatweg, der quantitativ einen Hauptstoffwechselweg der Pflanze darstellt (Herrmann and Weaver, 1999; Schmid and Amrhein, 1995). Die über diesen Weg gebildeten Aminosäuren sind nicht nur für die Proteinbiosynthese, sondern auch für die Bildung bedeutsamer Sekundärmetabolite wie z.B. Alkaloide, Flavonoide und Lignin unerlässlich (Heldt, 1994). Daher stellt der PPT eine wichtige Verbindung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel der Pflanze dar. Die *A. thaliana cue1*-Mutante (Streatfield et al., 1999) besitzt keinen funktionellen PPT1. Sie zeigt einen retikulierten Blattphänotyp und ist nicht in der Lage, Anthocyane unter anaerobem Stress zu

synthetisieren (Voll, 2001; Voll et al., 2003). Der PPT1 ist besonders in Xylemparenchymzellen von Blättern, Wurzeln und Blüten exprimiert. In *Arabidopsis* existiert noch ein zweites *PPT*-Gen, das nur im Blattmesophyll und in Blüten exprimiert wird. Trotz ähnlicher Substratspezifitäten ist dieser endogene PPT2 nicht in der Lage, den Phänotyp der *cue1*-Mutante zu kurieren (Knappe et al., 2003b). Expressionsanalysen mit verschiedenen Geweben von Blumenkohl und Mais ergaben, dass Transkripte des *PPT*-Gens sowohl in photoautotrophen als auch in heterotrophen Geweben zu finden sind, wobei in letzteren die Expression stärker ist (Fischer et al., 1997). Die cDNA eines weiteren PPT-Typs wurde aus der C₄-Pflanze *Zea mays* isoliert. Dieser PPT des C₄-Typs ist stark in Mesophyllzellen exprimiert und exportiert PEP ins Cytosol (K. Fischer, persönliche Mitteilung), wo es als Substrat der PEP-Carboxylase dient (Hatch, 1988).

1.2.1.3. Der Glukose-6-phosphat/Phosphat-Translokator (GPT)

In den photosynthetisch aktiven Geweben einer Pflanze (*source*-Geweben) werden die Photoassimilate u.a. zur Synthese von Saccharose (Sac) genutzt, der bei den meisten Pflanzen üblichen Transportform von Kohlenhydraten. Über das Phloem wird die Saccharose zu heterotrophen Verbrauchs- oder Speichergeweben (*sink*-Geweben) transportiert. Dort wird sie als Energie- oder Kohlenstoffquelle z.B. durch das apoplastische Enzym Invertase in ihre Bestandteile Glukose und Fruktose zerlegt, die dann in das Cytosol der betreffenden Zellen importiert und zu Hexosephosphaten umgewandelt werden. Die Plastiden nicht-grüner Gewebe sind, von wenigen Ausnahmen abgesehen, aufgrund des Fehlens der plastidären Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase) nicht in der Lage, Hexosephosphate aus TP zu generieren (Entwistle and ap Rees, 1991). Das bedeutet, dass sie als Orte der Bildung und Speicherung von Stärke auf die Zufuhr von Hexosephosphaten aus dem Cytosol angewiesen sind. Hexosephosphate sind auch Substrate für den oxidativen Pentosephosphatweg (engl. '*oxidative pentose phosphate pathway*', OPPP), in dem sie zur Bildung von Reduktionsäquivalenten oxidiert werden. Diese Reduktionsäquivalente sind für reduktive Biosynthesen wie z.B. die Lipidsynthese, die Nitratassimilation und die Glutamatsynthese wichtig, die in den Plastiden lokalisiert sind (Borchert et al., 1993; Bowsher et al., 1992; Flügge, 1995; Thom et al., 1998). 1998 wurde von Kammerer et al. der GPT identifiziert, welcher den Hexosephosphattransport katalysiert. Hierbei wird cytosolisches Glk6P gegen plastidäres P_a getauscht. Auch TP, die im Laufe des oxidativen Pentosephosphatweges entstehen und im Cytosol wieder zu

Hexosephosphaten regeneriert werden können, werden gegengetauscht. Glk1P und Fruktose-6-phosphat (Fru6P) sind keine Substrate für den GPT, auch PEP wird unter physiologischen Bedingungen kaum transportiert. Untersuchungen an diversen stärkefreien Mutanten legen den Schluss nahe, dass die Stärkesynthese in den meisten Pflanzen auf dem Import von Glk6P in die Plastiden basiert (Caspar et al., 1985; Harrison et al., 1998; Kofler et al., 2000). Die *Arabidopsis thaliana*-Mutante *pgi1-1* (Yu et al., 2000), die nahezu stärkefreie Blätter besitzt, weist einen Defekt in der plastidären Phosphoglukose Isomerase (PGI) auf, welche Frk6P in Glk6P umwandelt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in photosynthetisch aktivem Gewebe kein funktioneller GPT vorhanden ist, der Glk6P in die Plastiden importieren könnte. Eine Untersuchung des Expressionsmusters des *GPT* ergab, dass die Expression hauptsächlich auf heterotrophe Gewebe, wie z.B. Kartoffelknollen, beschränkt ist (Kammerer et al., 1998). In *Arabidopsis* gibt es zwei GPTs. *AtGPT1* ist ubiquitär exprimiert, *AtGPT2* nur in Blüten und Schoten. Beide heterolog exprimierte Proteine haben gleiche Substratspezifitäten und sind in der Lage, bei Überexpression den Phänotyp der *pgi1-1*-Mutante zu komplementieren (Knappe, 2002).

1.2.2. Der Transport von Pentosephosphaten über die Plastidenhüllmembran

Bereits 1995 zeigten Schnarrenberger und Mitarbeiter, dass in Spinatblättern der OPPP im Cytosol nur bis zur Stufe von Ribulose-5-phosphat (Ru5P) stattfinden kann, da die Enzyme des nicht-oxidativen Teils dieses Zyklus ausschließlich in den Plastiden lokalisiert sind. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass Ru5P, das Produkt der cytosolischen Enzyme Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6PG-DH), zur weiteren Umsetzung in die Plastiden transportiert werden muss. Wenig später zeigten Hartwell et al. (1996), dass in den heterotrophen Plastiden aus Erbsenwurzeln ein enger Zusammenhang zwischen der Aktivität des oxidativen Pentosephosphatwegs und der plastidären NO_2^- -Reduktion besteht. Durch die Zugabe von Glk6P, dessen Import und Oxidation in die Plastiden die dafür benötigten Reduktionsäquivalente in Form von NADPH generiert, konnte die Nitritreduktion stimuliert werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass auch Ribose-5-phosphat (Rib5P) in der Lage ist, die plastidäre Nitritreduktion zu stimulieren, da es in die Plastiden transportiert und dort im OPPP weiterverarbeitet werden kann. Die importierten Zuckerphosphate werden mit TP, einem Produkt des OPPP, gegengetauscht. Dagegen zeigten Thom et al.

(1998), dass heterotrophe Chromoplasten aus Paprikafrüchten (*Capsicum annuum* L.) auch Glk6P im Gegentausch mit P_a oder TP importieren. Auch in diesem Fall wird Glk6P als Substrat des OPPP genutzt, wodurch NADPH generiert und die Nitritreduktion stimuliert wird. Es konnte jedoch kein Transport von Rib5P gezeigt werden. Averill et al. (1998) untersuchten Mais-Mutanten, die keine cytosolische 6PG-DH exprimieren. Sie konnten zeigen, dass 6PG-DH-defiziente Pflanzen nur noch ca. $\frac{1}{3}$ der Aktivität des OPPP im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen aufweisen und diese Aktivität auf den plastidären Teil zurückzuführen ist. Diese Mutanten waren nicht in der Lage, auf erhöhte Nitritkonzentrationen zu reagieren, da nicht mehr genügend Reduktionsäquivalente gebildet werden konnten. Dies deutet auf eine große Bedeutung des cytosolischen Teils des oxidativen Pentosephosphatwegs für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für plastidäre, reduktive Biosynthesen hin. Untersuchungen über den *crossstalk* des plastidären und des cytosolischen OPPP und die dabei möglicherweise transportierten Metabolite wurden bisher noch nicht durchgeführt.

Im Rahmen einer Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass der aufgrund von Sequenzhomologien zu bekannten Phosphattranslokatoren als Glukose-6-phosphat/Phosphat-Translokator-homologes Protein eingestufte cDNA-Klon 121I21T7 (EST121) aus *Arabidopsis thaliana* tatsächlich für ein Transportprotein kodiert (Eicks, 1998). Die Expression des rekombinanten, mit einer N-terminalen Hexahistidinsequenz (*his-tag*) versehenen EST121-Proteins in *S. pombe* wurde durch einen spezifischen Antikörper in den Gesamtmembranfraktionen der transgenen Spalthepezellen immunologisch nachgewiesen. Durch Rekonstitution der *S. pombe*-Gesamtmembranen in künstlichen Liposomen wurden die Funktionalität und Identität des EST121 als Phosphattranslokator bestätigt. Das Protein transportiert P_a , TP (Dihydroxyacetonphosphat, DHAP), 3-PGA und Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) im Gegentausch mit [^{32}P]- P_a , nicht jedoch Glk6P, Glk1P, ADP-Glk oder Rib5P. Aufgrund seiner Substratspezifität für Ru5P wurde das Protein zunächst als Ribulose-5-phosphat/Phosphat-Translokator, RPT, bezeichnet. Durch vergleichende Messungen wurde gezeigt, dass der rekombinante GPT ebenfalls Ru5P transportiert. Somit konnte zum ersten Mal der Transport eines Pentosephosphates über Plastidenhüllmembranen gezeigt und gleichzeitig zwei Proteinen aus der Familie der Phosphattranslokatoren zugeordnet werden. Transportdaten mit Hüllmembranen von Spinatblatt-Chloroplasten deuteten, in Übereinstimmung mit den von Schnarrenberger et al. (1995) gemachten Beobachtungen, auf eine Funktion des RPTs in diesem Gewebe hin. Auf dieser Basis wurde eine mögliche Funktion des Proteins *in planta* postuliert. Die Funktion des RPT würde demnach in der Versorgung des plastidären OPPP

mit dem "Endprodukt" des cytosolischen OPPP, Ru5P, bestehen. Aufgrund des Fehlens des nicht-oxidativen Teils dieses Stoffwechselweges im Cytosol kann Ru5P nur in den Plastiden weiter umgesetzt werden.

1.2.3. Der Crassulaceen-Säurestoffwechsel von *Mesembryanthemum crystallinum*

Der Crassulaceen-Säurestoffwechsel (engl. '*crassulacean acid metabolism*', CAM) ist eine Adaption an heißes, trockenes Klima bzw. verringerte Wasserverfügbarkeit, z.B. bei epiphytisch oder an ariden Standorten (z.B. Trockengebiete) lebenden Pflanzen. CO₂ wird nachts, wenn die Stomata geöffnet sind, über das Enzym Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PEPC) fixiert und als Malat (Äpfelsäure) in der Vakuole gespeichert. Während der Lichtperiode, wenn die Stomata zum Schutz vor Wasserverlusten verschlossen sind, wird das gespeicherte Malat decarboxyliert und so das fixierte CO₂ freigesetzt, um im Calvinzyklus refixiert zu werden (Holtum and Osmond, 1981). Die CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* (Eispflanze) gehört zu der Gruppe der NAD(P)-Malatenzym (ME) CAM-Pflanzen. Analog zum C₄-Stoffwechsel erfolgt auch beim CAM die Freisetzung des CO₂ in verschiedenen Pflanzen auf unterschiedliche Weise; neben dem NAD(P)-ME-Typ gibt es noch den PEP-Carboxykinase-Typ. Erstere produzieren während der Lichtperiode in den Chloroplasten hauptsächlich Polyglukane als transitorische Kohlenstoffspeicher, um damit nachts die Malatsynthese zu unterstützen. Die Umstellung von C₃- auf CAM-Stoffwechsel, die z.B. durch Salzstress induziert werden kann, bedeutet eine Neuausrichtung des Metabolismus und geht mit einer Vielzahl an Änderungen bezüglich der Expression und Aktivität von Enzymen einher (Holtum and Winter, 1982; Paul et al., 1993; Winter et al., 1982). Da die Reaktionen des CAM-Stoffwechsels in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind (Chloroplasten, Cytosol, Mitochondrien und Vakuole), spielen intrazelluläre Transportprozesse, besonders diejenigen über die Plastidenhüllmembran, eine wichtige Rolle. Chloroplasten von *Mesembryanthemum crystallinum* enthalten Transportsysteme für TP, PEP (Neuhaus et al., 1988), Glk und Glk6P (Kore-eda and Kanai, 1997; Neuhaus and Schulte, 1996). Inwiefern diese Transportaktivitäten mit der C₃-CAM-Transition korrelieren, war bislang nicht untersucht worden.

1.2.4. Messung von Transporteigenschaften

Die heterologe Expression von cDNA in Hefe, Proteinreinigung durch Affinitätschromatografie und die Rekonstitution der Transportaktivität in Liposomen sind etablierte Methoden zur Charakterisierung von Transportproteinen (Flügge, 1998; Hanke et al., 1999; Kasahara and Hinkle, 1977). In den letzten Jahren sind durch diese Techniken mehrere Mitglieder der drei Familien plastidärer Phosphattranslokatoren funktionell charakterisiert worden (Fischer et al., 1997; Kammerer et al., 1998; Loddenkötter et al., 1993). Der organspezifische Transport von Metaboliten lässt sich durch die Rekonstitution von Protein-Rohextrakten aus verschiedenen Organen wie Blatt, Blüte oder Wurzel untersuchen (Flügge and Weber, 1994). Die Rekonstitution von Membranproteinen in Liposomen ermöglicht es, das Innen- und das Außenmedium, dem das Membranprotein ausgesetzt ist, durch die Wahl der entsprechenden Puffer genau zu definieren. Im rekonstituierten System ist es so möglich, durch Vorbeladung der Liposomen mit unterschiedlichen phosphorylierten Metaboliten das Transportverhalten der rekonstituierten Proteine bezüglich dieser Metabolite zu untersuchen und zu vergleichen. Dies ist bei einer Messung z.B. eines Transport-Proteins aus Chloroplasten im intakten Organell ungleich schwieriger. Hier kann man zwar das die Plastiden umgebende Außenmedium innerhalb der durch die Osmolarität des Mediums gesetzten Grenzen definieren, eine Definition des Innenmediums der Plastiden durch Vorbeladung ist jedoch schwierig und häufig mit Fehlern behaftet.

1.3. Die Analyse von Mutanten bei der Aufklärung von Stoffwechselprozessen

In Eukaryoten und Bakterien hat die Untersuchung von Mutanten bei der Aufklärung von Stoffwechsel- und Signaltransduktionswegen enorme Bedeutung gewonnen. Auch in der Pflanzenforschung hat sich die Analyse von Mutanten in den letzten Jahren zu einem festen Bestandteil der Grundlagenforschung entwickelt. Neben der Mutagenese durch Chemikalien wie Ethylmethansulfonat (EMS) können Mutationen auch physikalisch durch Röntgen- oder UV-Bestrahlung oder Bestrahlung mit beschleunigten Neutronen induziert werden. Ferner besteht die Möglichkeit einer zufallsbedingten Ausschaltung von Genen

durch Insertionsmutagenese. Dabei inserieren DNA-Stücke von mehreren Kilobasen (kb) Länge im Genom. Findet die Insertion in einer Gensequenz statt, so führt dies in den meisten Fällen zur Zerstörung seiner Funktion. Um die Identifizierung und Isolierung des von der Mutation betroffenen Gens zu erleichtern, hat man in den letzten Jahren zwei Methoden entwickelt: die Transposon-Markierung (Bancroft et al., 1992) und die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte T-DNA-Insertionsmutagenese (Forsthoefel et al., 1992). Obwohl auch in *Arabidopsis* Transposonelemente entdeckt wurden (Konieczny et al., 1991; Peleman et al., 1991), waren sie zu dem Zeitpunkt nicht ausreichend untersucht, um sie als Insertionsmutagene einzusetzen. Aus diesem Grund wurden für die Transposon-Markierung heterologe Transposons wie das *Ac/Ds*-System aus Mais (McClintock, 1951) verwendet. Die T-DNA-Insertionsmutagenese beruht auf einem *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer (Zambryski et al., 1983; Zupan and Zambryski, 1995). Die T-DNA ist an beiden Enden durch 25 bp lange direkte Wiederholungen begrenzt. Ausschließlich diese Sequenzen sind für die T-DNA-Prozessierung erforderlich; jegliche von ihnen begrenzte DNA wird in die Pflanzenzelle transportiert. Der Vorteil dieser Insertionsmutagenese-Methoden ist die Möglichkeit, betroffene Pflanzengene aufgrund der bekannten Sequenz des Transposons oder der T-DNA zu identifizieren. Die der Insertion benachbarten Fragmente des Pflanzengens können mit der Methode des *plasmid rescue* (Behringer and Medford, 1992; Fritze et al., 1995) oder über PCR-Amplifikation, der sogenannten *thermal asymmetric interlaced* (TAIL)-PCR, isoliert werden (Liu et al., 1995; Liu and Whittier, 1995; Sessions et al., 2002).

1.3.1. Molekularbiologische Strategien der Mutantanalyse

Bei höheren Pflanzen wurden die ungezielten Methoden zur Mutagenese verstärkt angewendet und etabliert. Man unterscheidet zwei Untersuchungsansätze: Bei der ersten Methode ist eine Mutante vorhanden und es wird versucht, das für den beobachteten Phänotyp verantwortliche Gen durch Karten-gestützte Klonierung (*map based cloning*) mit Hilfe von molekularen Markern über *chromosome walking* (Westhoff, 1996) zu isolieren. Falls es sich um eine Insertionsmutante handelt, kann das betroffene Gen auch mittels *plasmid rescue* oder iPCR (Gasch et al., 1992) identifiziert werden. Man spricht dabei auch von "Vorwärtsgenetik". Die zweite Methode, die auch als "reverse Genetik" bezeichnet wird, startet mit einer bekannten Gensequenz. Die Untersuchung einer Mutante, die einen Defekt in diesem Gen besitzt, soll Aufschluss über seine Funktion geben. Voraussetzung

dafür sind die Verfügbarkeit von Populationen von Insertionsmutanten und die Kenntnis der DNA-Sequenzen sowohl des Zielgens als auch der inserierenden DNA. Dies ist z.B. bei der über 60.000 transgene Linien umfassenden Population der *Arabidopsis Knockout Facility* (AKF) in Madison, Wisconsin, USA, der Fall. Die Population wurde mit Hilfe von T-DNA Insertionen erzeugt (Krysan et al., 1999). Ausgehend von der DNA eines sogenannten *pools*, also eines Zusammenschlusses oder Gemisches mehrerer Pflanzenlinien, kann man durch PCR-Reaktionen mit genspezifischen und T-DNA-spezifischen Oligonukleotiden nach derjenigen Pflanzenlinie suchen, die eine Insertion im "gewünschten" Gen trägt, um diese dann weiter zu untersuchen. Neben den Linien der AKF existieren eine ganze Reihe weiterer Populationen, die durch computergestützte Recherchen in Datenbanken zugänglich sind. Das Salk Institute Genome Analysis Laboratory (SIGnAL) bietet eine eigene T-DNA-mutagenisierte Population von z.Zt. 141.486 Linien (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdanexpress>). Innerhalb dieser Kollektion besteht eine 96,6%ige Wahrscheinlichkeit, eine Insertion in einem beliebigen *Arabidopsis*-Gen durchschnittlicher Länge (ca. 2 kb) zu finden. Alle frei zugänglichen Populationen zusammengenommen, stehen bereits über 350.000 Insertionen (mit sequenzierten flankierenden Regionen) zur Verfügung, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit für ein beliebiges der ca. 25.500 Gene aus *Arabidopsis* ein *knock-out* gefunden werden kann (A. Schneider und D. Leister, persönliche Mitteilung).

1.3.2. *Arabidopsis thaliana* als Modellorganismus

Die Spezies *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Acker-Schmalwand, gehört zur Familie der *Brassicaceae*, Kreuzblütler. Sie kommt in ganz Europa vor und wächst auf nährstoffarmen Äckern, sandigen Ruderalstellen, Mauern und lückigen Trocken- und Halbtrockenrasen (Rothmaler, 1990). Die diploide Pflanze eignet sich aufgrund ihrer Eigenschaften besonders für molekularbiologische und genetische Untersuchungen (Meinke et al., 1998; Meyerowitz, 1989; Pyke, 1994). Die Generationszeit von Wildtyppflanzen ist mit durchschnittlich sechs bis acht Wochen relativ kurz und die Samenproduktion hoch. Aufgrund der geringen Größe lassen sich viele Pflanzen auf begrenztem Raum (z.B. in Klimakammern) kultivieren. Sowohl die chemische als auch die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Mutagenese sind einfach durchzuführen. Das für genetische Analysen entscheidende Merkmal ist die geringe Genomgröße von 125 Megabasen, die auf

fünf Chromosomen verteilt sind. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* ist das erste einer höheren Pflanze, das komplett sequenziert wurde (Arabidopsis Genome Initiative, 2001).

1.4. Zielsetzung

Phosphattranslokatoren, pflanzliche Transportproteine, spielen eine grundlegende Rolle im Metabolismus und ihre Funktionen sind für die Pflanze wichtige Bestandteile der Überlebensstrategie. Durch die biochemische Charakterisierung des RPTs wird, ausgehend von den Ergebnissen der Diplomarbeit, die eigentliche physiologische Rolle des Proteins im Stoffwechsel genauer untersucht. Die im Laufe der Arbeit isolierte Nullmutante bietet darüber hinaus die Möglichkeit, das Fehlen dieses Proteins und seine Effekte auf den gesamten Organismus und die Physiologie von *Arabidopsis thaliana in vivo* zu studieren. Im Falle der induzierbaren CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* wird durch Analyse der Transportkapazitäten verschiedener Phosphattranslokatoren die Rolle dieser Transportproteine im Wechsel zwischen den unterschiedlichen Stoffwechselmodi untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), Difco (Hamburg), Duchefa (Haarlem, NL), Ferak (Berlin), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen, Radiochemikalien von den Firmen ICN (Eschwege) und Amersham Pharmacia (Freiburg).

2.1.2. Enzyme

Enzyme für die Manipulation von Nukleinsäuren wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach), GibcoBRL (Karlsruhe), QIAGEN (Hilden), Pharmacia (Freiburg), und Promega (Mannheim) erworben; Enzyme für biochemische und physiologische Fragestellungen wurden von der Firma Boehringer bzw. Roche (Mannheim) bezogen.

2.1.2. Vektoren

Folgende Vektoren wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Klonierungen eingesetzt:

Vektor	Bezugsquelle	Verwendung
pBluescript [®] -Serie	Stratagene [™]	Amplifikation von Fragmenten in <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)
pGEM-T [®] Easy	Promega	Klonierung von PCR-Produkten in <i>E. coli</i>
pYES-DEST 52	Invitrogen [®] , Groningen, NL	Proteinexpression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAP-E	Prof. N. Sauer, Erlangen	Proteinexpression in <i>S. pombe</i>

2.1.3. Bakterien- und Hefestämme

E. coli DH5 α – zur Amplifikation von Plasmiden verwendet.

supE44 lacU169 (Φ 80, *lacZ M15*) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) InvSc1 – zur Proteinexpression eingesetzt.

his3 Δ 1 leu2 trp1-289 ura3-52

S. pombe 1-32 – zur Proteinexpression eingesetzt (Prof. N. Sauer, Erlangen)

leu1-32

2.1.4. Pflanzen

Als Kontrollen und für Rückkreuzungen wurde *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. des Ökotyps Wassilewskija (Ws-2) verwendet. Zur Isolierung einer T-DNA Insertionsmutante (Krysan et al., 1999) mit Defekt im Gen des Pentosephosphat/Phosphat-Translokators wurden Samen des 9er-pools P39F3 von der *Arabidopsis Knockout Facility* (AKF, Madison, Wisconsin, USA; <http://www.biotech.wisc.edu/Arabidopsis/>) bezogen. Zur Selektion transgener Pflanzen wurden diese im Alter von ca. drei Wochen zweimal im Abstand von zwei Tagen mit dem Herbizid BASTA[®] besprüht (1,25 ml BASTA[®] und 1 ml Tween20 auf 1 l H₂O). Nach ein bis zwei weiteren Tagen wurden die überlebenden Pflanzen gezählt.

2.2. Methoden

2.2.1. Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Samen von *Arabidopsis thaliana* wurden auf einem Gemisch von 3 Teilen Erde (Einheitserde Typ Minitray, Gebr. Patzer KG, Sinntal-Jossa) und einem Teil Vermiculit (Basalt Feuerfest, Linz) ausgelegt. Vor der Aussaat wurde das Substrat mit Leitungswasser

durchtränkt. Die Pflanzschalen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen durch Fremdsamen mit Pikierhauben abgedeckt. Zur Brechung der Samenruhe und Synchronisation der Keimung wurde die Aussaat zunächst für zwei Tage bei 4°C stratifiziert.

2.2.1.1. Langtag-Wachstumsbedingungen im Gewächshaus

Arabidopsis Pflänzchen wurden in 77er Multiplatten (Nitsch & Sohn, Kreuztal) pikiert und bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16:8 h bei einer täglichen Photonendosis von 200 klxh und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 40% herangezogen. In der Lichtperiode betrug die Temperatur 21°C, während der Dunkelperiode 18°C. Die Beleuchtungsstärke wurde während der Lichtperiode durch fakultatives Hinzuschalten von Leuchten oberhalb von 20 lx gehalten. Die Multiplatten wurden regelmäßig angestaut und einmal wöchentlich mit Nematoden (Sautter und Stepper, Ammerbruch) zur Bekämpfung eines eventuellen Befalls durch Trauermückenlarven besprüht. Bei Befall mit Blattläusen wurden Florfliegenlarven (Sautter und Stepper, Ammerbruch) als Nützlinge ausgebracht.

2.2.1.2. Kurztag-Wachstumsbedingungen in der Phytokammer

A. thaliana Pflänzchen wurden auf dasselbe Substrat wie unter 2.2.1 beschrieben pikiert und bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12:12 h, also unter Kurztagbedingungen bei einer PFD von 100-200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, einer relativen Luftfeuchte von 40-50% und einer Temperatur von 22°C während der Lichtperiode und 18°C während der Dunkelperiode kultiviert. Die Phytokammer (Karl Weiss, Giessen) war zu gleichen Teilen mit Leuchtstoffröhren der Fa. Osram L58W/11-860 (Tageslicht), L58W/30 (Warmweiß), L58W/76 (Natura de Luxe) und L58W/77 (FluorA) bestückt. Zur Bekämpfung von Blattlausbefall wurden bei Bedarf Florfliegenlarven ausgebracht.

2.2.1.3. Hochlicht/UV-Anzuchtammer

Wie unter 2.2.1 beschrieben pikierte *A. thaliana* Pflänzchen wurden bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 13:11 h, also ebenfalls unter Kurztagsbedingungen bei einer

maximalen PFD von $650 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in Pflanzenhöhe, einer relativen Luftfeuchte von 50-80% und einer Temperatur von 20°C während der Lichtperiode und 10°C während der Dunkelperiode kultiviert (Abbildung 1). Die Anzuchtammer (Vötsch Industrietechnik, Balingen-Frommern) war mit 4 Krypton-Glühbirnen 100 W und 8 Halogen-Quecksilberdampf Lampen POWERSTAR HQ1-T 400 W der Firma Osram, München) ausgestattet. Die UV-B-Bestrahlungseinheit bestand aus 4 UV-B-Leuchtstoffröhren (280-320 nm) des Typs TL12 / 20 W der Fa. Phillips. Zum Herausfiltern der von den UV-B-Leuchtstoffröhren emittierten UV-C Strahlung ($< 280 \text{ nm}$) befand sich unterhalb derselben eine Filterfolie (Ultraplan UTR, $100 \mu\text{m}$) der Fa. Digrefa, München. Diese wurde vor Gebrauch für 12-24 h unter 8 UV-B-Leuchtstoffröhren "eingebraunt" und für eine die Dauer einer Anzuchtperiode (ca. 3-5 Wochen) verwendet.

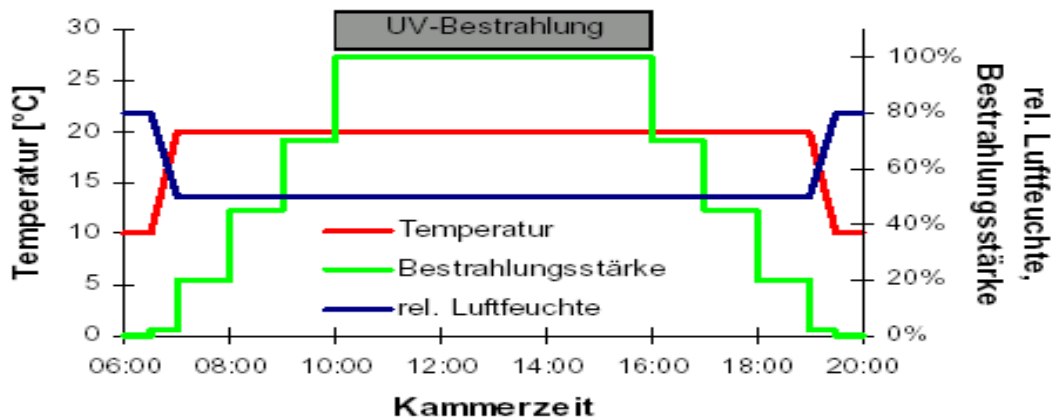


Abbildung 1. Tagesgang der Klima- und Strahlungsbedingungen in der Hochlicht-/UV-Anzuchtammer. Tagesgang von 6 Uhr bis 29 Uhr. In der Zeit von 20 Uhr bis 6 Uhr blieben die Bedingungen konstant. Die UV-B-Leuchtstoffröhren wurden zur Zeit der maximalen Bestrahlungsstärke von 10 Uhr bis 16 Uhr, also für 6 h, angeschaltet. Die maximale UV-B Bestrahlungsstärke betrug ca. $1,5 \text{ W/m}^2$. Die Kammerzeit ist unabhängig von der Echtzeit. Der Anzuchtschrank regelt die Klimabedingungen mit einem Fehler von 1°C bzw. 5% rel. Luftfeuchte (Herstellerangaben). Abbildung aus Schmitz (2000).

2.2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1. Anzucht von *E.coli*

Zur Anzucht des unter 2.1.3 aufgeführten *E. coli*-Stammes wurde eine Kolonie von einer Platte oder $10 \mu\text{l}$ einer Glycerinstammkultur in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (200 min^{-1}) bei 37°C inkubiert. Falls erforderlich wurden Antibiotika zur Selektion hinzugesetzt (s.u.). *E. coli* Zellen wurden entweder kurzfristig für

einige Wochen als Kolonie auf Agarplatten bei 4°C oder langfristig als Stammkultur bei –20°C im gleichen Volumen 65% Glycerin, 0,1 M MgSO₄, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0 gelagert.

LB-Medium:

1 g Trypton
0,5 g Hefeextrakt
1 g NaCl
ad 100 ml H₂O_{bidest.}

Das Medium wurde nach Zugabe aller Komponenten autoklaviert.

Wenn nötig wurden 0,1% (v/v) Ampicillin (50 mg/ml in 1M Tris/HCl, pH 8) bzw. 0,1% (v/v) Kanamycin (25 mg/ml) nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

LB-Platten:

LB-Medium mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar

2.2.2.2. Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung und Transformation kompetenter Zellen wurde auf die TSS-Methode zurückgegriffen (Chung and Miller, 1993). Zellen des Stammes DH5 α wurden in 5 ml LB-Medium (2.2.2.1) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (New Brunswick G25, Edison, USA) angezogen. Danach wurde 1 ml der Übernachtskultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml frischem LB-Medium überimpft und die Kultur bei 37°C im Schüttelinkubator etwa 1 bis 2 h geschwenkt, bis die entnommenen Proben mit einer Extinktion von 0,4 bei 600 nm Wellenlänge ($E = 0,4$; $\lambda = 600$ nm) auf die exponentielle Wachstumsphase hinwiesen. Die Kultur wurde dann auf SS34-Becher verteilt und die Zellen im SS34-Rotor für 10 min bei 3.000 U·min⁻¹ sedimentiert. Die Sedimente wurden in 10 ml TSS aufgenommen und vereinigt, 15 min auf Eis gestellt, zu 50 μ l in Einmal-Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und maximal 2 Monate bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

TSS:

10% (w/v) PEG 8000

5 (v/v) DMSO
75 (v/v) LB-Medium
50 mM MgCl₂
pH 6,5 NaOH

2.2.2.3. Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Ein 50 µl Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und nach Zugabe des Ligationsansatzes für 20 min auf Eis inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden 90 s auf 42°C erwärmt, kurz auf Eis abgekühlt, dann mit 1 ml LB-Medium (2.2.2.1) versetzt und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

2.2.2.4. Selektion auf Indikatorplatten

Transformierten Zellen (2.2.2.3) wurden bei der Verwendung der Vektoren pBSC oder pGEM-T Easy auf Indikatorplatten ausplattiert, die über Nacht bei 37°C bebrütet wurden und nach 24-stündiger Lagerung bei 4°C auf blaue und weiße Kolonien kontrolliert wurden. Weiße Klone wurden in Kulturröhrchen mit 5 ml LB-Amp-Medium (2.2.2.1) überimpft. Nach der Inkubation im Schüttler bei 37°C über Nacht wurden von 500 µl der Flüssigkulturen wie unter (2.2.2.1) beschrieben Stammkulturen angelegt und bei -20°C gelagert.

Indikatorplatten (Blau-Weiß-Selektion):

1 g Trypton
0,5 g Hefeextrakt
0,1 g NaCl
0,25 g MgCl₂
1,5 g Bacto-Agar
20 mg IPTG, dioxanfrei
0,5 (v/v) X-Gal, 2% (w/v) in Dimethylformamid
400 µl Ampicillin (0,1% w/v)
ad 100 ml H₂O_{dd}

Außer den hitzelabilen Bestandteilen IPTG, der X-Gal-Lösung und Ampicillin wurden alle Komponenten zusammengegeben und die resultierende Lösung autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf unter 40°C wurden die restlichen Bestandteile hinzugefügt, die Lösung gut durchmischt und unter der Sterilbank in Petrischalen gegossen.

2.2.2.5. Selektion positiver Klone mit Hilfe der PCR

Konnte der Ligations- und Transformationserfolg nicht über eine Blau-Weiß-Selektion überprüft werden, so wurden transformierte Zellen auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag wurde auf die Rückseite der Platten ein Gitter gezeichnet und aus jedem Feld eine halbe Kolonie mit einer Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß mit 50 µl PCR-Prämix transferiert. Die Ansätze wurden 5 min auf 95°C erhitzt, und darauf kurz zur Abtrennung der Zelltrümmer zentrifugiert. 20 µl der Überstände wurden in PCR-Reaktionsgefäße überführt, 1 U Taq-Polymerase (QIAGEN, Hilden) hinzugegeben und die PCR-Reaktionen (0) gestartet. Nach Ende des PCR-Programms wurden die Reaktionen auf 1 x Stop-Puffer gebracht und elektrophoretisch auf die gewünschten Produkte hin untersucht.

PCR-Prämix:

- 0,1 mM dNTPs, jeweils
- 0,1 µM Oligonukleotid 1
- 0,1 µM Oligonukleotid 2
- 1/10 Vol 10 x Reaktionspuffer

Es wurden jeweils spezifische Oligonukleotide eingesetzt.

10 x Stop:

- 20% (w/v) Ficoll 400
- 1% (w/v) SDS
- 100 mM EDTA, pH 8,0
- 0,02% (w/v) Bromphenolblau
- 0,02% (w/v) Xylencyanol

2.2.2.6. Herstellung und Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

10 µl einer Hefestammkultur des Stammes INVSc1 wurden auf YPD-Platten ausgestrichen und ein bis zwei Tage bei 30°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden in 10 ml YPD Medium überimpft und über Nacht unter Schütteln bei 30°C herangezogen. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur in einem Volumen von 50 ml YPD auf eine $E = 0,4$ ($\lambda = 600$ nm) verdünnt und weitere 2 bis 4 h unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden dann auf sterile 50 ml-Polypropylenröhrchen aufgeteilt und 5 min in einer Bodenzentrifuge (Hermle ZK 364, Kontron) bei 1.500 x g sedimentiert und in 40 ml 1 x TE resuspendiert. Die Zellen wurden wie zuvor sedimentiert, in 2 ml 1 x LiOAc/0,5 x TE aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl dieser Suspension mit 1 µl Plasmid-DNA und 10 µl Träger-DNA (10 mg/ml denaturierte Heringsspermen-DNA) in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß vermischt, 700 µl 1 x LiOAc/ 40% PEG-3350/ 1 x TE hinzugegeben und das Reaktionsgefäß gründlich invertiert. Danach wurden die Transformationsansätze für 30 min bei 30°C inkubiert, bevor 88 µl DMSO zugegeben und die Suspension sorgfältig durchmischt wurde. Anschließend wurden die Hefezellen einem siebenminütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und 10 s zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben, die Zellen in 1 ml 1 x TE resuspendiert, in gleicher Weise sedimentiert, in 100 µl 1 x TE aufgenommen und auf SC/-Ura-Platten zur Selektion auf fehlende Uracil-Auxotrophie in den Transformanten ausgestrichen.

YPD-Medium:

1% (w/v) Bactopepton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

2% (w/v) Glukose

Das Medium wird vor dem Gebrauch autoklaviert.

YPD-Platten:

YPD-Medium mit 2% (w/v) Bacto-Agar (Difco).

1 x TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 7,4

1 mM EDTA

Die Lösung wird autoklaviert.

1 x LiOAc/ 0,5 x TE

5 mM Tris/HCl, pH 7,5
100 mM Lithiumacetat
0,5 mM EDTA

1 x LiOAc/ 40% PEG-3350/ 1 x TE:

10 mM Tris/HCl, pH 7,5
100 mM Lithiumacetat
1 mM EDTA
40% (w/v) PEG-3350

SC/-Ura-Platten:

0,67% (w/v) YNB (*Yeast Nitrogen Base without Amino Acids*)
2% (v/v) 40% (w/v) Glukoselösung, sterilfiltriert
1% (v/v) 10 x Dropout -Ura
2% (w/v) Bacto-Agar

10 x Dropout -Ura:

0,1% (w/v) Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin,
Tryptophan
0,05% (w/v) Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin,
Serin, Tyrosin, Valin

Soll auf andere Auxotrophien hin selektiert werden, so können dem 10x Dropout ein oder mehrere der anderen Bestandteile vorenthalten werden und dafür 0,02% (w/v) Uracil beigemischt werden.

2.2.2.7. Expression rekombinanter Proteine

Eine Einzelkolonie INVSc1, die das Expressionskonstrukt trug, wurde in 15 ml SC/-Ura-Medium überimpft und über Nacht unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur in einem Volumen von 50 ml Induktionsmedium auf eine E = 0,4 ($\lambda = 600$ nm) verdünnt und weiter unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Zur

Überwachung der Expressionstärke des His₆-markierten Proteins wurden nun in regelmäßigen Abständen Proben der Kultur genommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1500 x g, 5 Minuten, 4°C) sedimentiert und in 1 Vol. 2 x SB resuspendiert, kurz bei 96°C inkubiert und via SDS-PAGE und *Western-Blot* (2.2.4.2f) analysiert. Alternativ dazu wurde mit den Zellen wie unter 2.2.4.1 beschrieben verfahren.

SC/-Ura Medium

SC/-Ura-Platten (2.2.2.6) ohne Bacto-Agar. Das Medium wird autoklaviert

2.2.2.8. Arbeiten mit *S. pombe*

Der Hefestamm 1-32 (*leu1-32*, 2.1.3) stammte ursprünglich von Prof. N. Sauer (Erlangen) und wurde dem Institut zu Verfügung gestellt. Zur Transformation wurden diese *Schizosaccharomyces pombe*-Zellen ähnlich dem unter 2.2.2.6 angegeben Protokoll verarbeitet (Bröker, 1993). Die Selektion der Transformanden beruhte dann jedoch auf einer von dem verwendeten Expressionsvektors SAP-E (Truernit et al., 1996) vermittelten Komplementation der Leucin-Auxothrophie des verwendeten Hefestammes. Das auf dem Vektor gelegene LEU2-Gen befähigt die Transformanden zur Synthese der β -Isopropylmalat-Dehydrogenase und damit zum Wachstum auf Leucin-verarmtem Minimalmedium.

Minimalmedium (MMA)

1% (w/v) Glukose

0.67% (w/v) YNB

Zur Herstellung von MMA-Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 2% (w/v) Bacto-Agar zugesetzt.

Die Anzucht der Hefetransformanden erfolgte unter selektiven Bedingungen zunächst als 10 ml Kultur in einem 100 ml Erlenmeyerkolben (30°C, 200 min⁻¹, 24 h, G25 Incubation Shaker), die mit einigen Hefezellen von einer Agarplatte angeimpft worden war. Bei einem gewünschten Endvolumen von 50 ml wurde nach 24 Stunden mit 40 ml frischem MMA-Medium aufgefüllt und das Wachstum der Hefezellen bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.8-1.2 verfolgt (Spektrophotometer Novaspec II). Dann wurden die Zellen in 50 ml-Röhrchen überführt, sedimentiert (5 min, 3000 U·min⁻¹, 4°C, Hermle ZK 364) und nach

Abgießen des Überstandes in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem 1.5 ml Einmal-Reaktionsgefäß erneut zentrifugiert (2 min, 2000 x g, PicoFuge™) und der Überstand vollständig abgenommen. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Hefezellen so bei -20°C gelagert werden. Bei größeren Endvolumina wurde die 10 ml-Kultur ebenfalls nach 24 Stunden mit frischem MMA-Medium auf 50 ml aufgefüllt und nach weiteren 24 Stunden zum Animpfen einer 200-1000 ml-Kultur verwendet (30 ml Vorkultur auf 200 ml Endvolumen, 75-100 ml Vorkultur auf 1000 ml Endvolumen). Die Hefezellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8-1.2 wachsen gelassen und dann geerntet (s.o.); bei Anzucht von 1 l-Kulturen wurden die Zellen zunächst in einem größeren Volumen sedimentiert (10 min, 3000 U·min⁻¹, 4°C, Sorvall RC5B, Rotor GS-3), resuspendiert und dann, wie bereits beschrieben, weiter aufbereitet. Die Lagerung der Hefekolonien erfolgte auf Agarplatten bei 4°C für mehrere Wochen, längerfristig als Glycerin-Stammkultur, wobei eine dicht gewachsene Vorkultur, mit dem gleichen Volumen 30% (v/v) Glycerin versetzt, bei -80°C gelagert wurde. Zum Animpfen neuer Kulturen wurden von einer solchen Stammkultur auf Trockeneis einige Zellen mit einer Impföse abgekratzt und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Nach 3-5-tägiger Inkubation bei 30°C wurden die Kolonien sichtbar. Die Weiterverarbeitung der geernteten Zellen erfolgte auch hier wie unter 2.2.4.1f beschrieben.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie Präparation von Plasmid-DNA, Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, RNasen, Ligasen, Phosphorylasen, Polymerasen oder Kinasen, sowie die Agarose-Gelelektrophorese von DNA wurden wie beschrieben durchgeführt (Ausubel et al., 1997).

2.2.3.1. Schnellpräparation genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Mit der DNA-Schnellpräparation (Edwards et al., 1991) kann zwar relativ unreine, aber für die PCR geeignete genomische DNA (gDNA) aus kleinen Mengen Pflanzengewebe extrahiert werden. Mindestens 10 mg Blattmaterial wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und evtl. bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Das Blattmaterial wurde in den Höhlungen von Mikrotiterplatten mit

Plastikpistillen gemörsert und nach Zugabe von 400 µl Aufschlußpuffer 5 s stark geschüttelt, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und maximal 1 h bei Raumtemperatur bis zur Aufarbeitung weiterer Proben stengelassen. Gewebetrümmer wurden 1 min bei $13.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ($17.900 \times g$) sedimentiert und 300 µl der Überstände mit dem gleichen Volumen Isopropanol in neuen Reaktionsgefäßen vermischt. Nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Gefäße 5 min bei $13.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ($17.900 \times g$) zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Sedimente unter der Sterilbank getrocknet. Die getrockneten Sedimente wurden in 100 µl 1 x TE (2.2.2.6) aufgenommen und bis zur PCR-Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Aufschlußpuffer

200 mM Tris/HCl, pH 7,5

250 mM NaCl

25 mM EDTA

0,5% (w/v) SDS

Die Lösung wird autoklaviert.

2.2.3.2. Präparation von gDNA nach der CTAB-Methode

Nach diesem Protokoll isolierte gDNA konnte für Restriktionsanalysen und *Southern*-Blots eingesetzt werden. Für alle Pipettierschritte wurden die Spitzen abgeschnitten, um Scherkräfte an der Pipettenspitzenöffnung zu minimieren, die die DNA beschädigen könnten. Die Präparation erfolgte so wie von Kofler (2000) beschrieben. Die Quantifizierung der gDNA erfolgte wie unter 2.2.3.7 oder 2.2.3.8 beschrieben.

2.2.3.3. *Southern*-Blot

Für *Southern*-Blot Analysen wurden je Probe 20 µg nach dem CTAB-Protokoll (2.2.3.2) isolierte gDNA mit Restriktionsenzymen gespalten und auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.3). Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 min mit 0,25 M HCl depurinert, in 0,4 M NaOH inkubiert und auf eine positiv geladene Nylonmembran (porablot NY plus, Macherey-Nagel, Düren) in 0,4 M NaOH transferiert. Nach dem Abwärtskapillartransfer für 2,5 h wurde die Membran in 2xSSC geschwenkt und

getrocknet. Zur Hybridisierung der auf der Nylonmembran (2.2.3.3) fixierten gDNA mit der radioaktiv markierten Sonde (2.2.3.10) wurde die Membran zunächst für mindestens 2 h bei der gewünschten Temperatur in Hybridisierungslösung mit 1/100 Vol. 0,01% sonifizierter Heringssperm-DNA vorhybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde für 10 min bei 95°C denaturiert, auf 250 µl mit Hybridisierungslösung aufgefüllt und zur Vorhybridisierung gegeben. Dann wurde über Nacht im Hybridisierungssofen (Fa. Hybaid, Heidelberg) inkubiert. Heterologe Hybridisierungen wurden bei 56°C mit 6x SSC, homologe Hybridisierungen bei 65°C mit 4x SSC durchgeführt. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurden Waschungen der Membran mit steigender Stringenz durchgeführt. Bei der gewählten Temperatur wurde zweimal für je 20 min mit Waschlösung I und II gewaschen. Zuletzt konnte, je nach radioaktivem Hintergrund, eine weitere Waschung mit Waschlösung III durchgeführt werden. Die Detektion der Hybridisierungssignale wurde wie unter 2.2.3.12 beschrieben durchgeführt.

20x SSC

0,3 M Na-Citrat

3 M NaCl

100x Denhardt's

2% (w/v) Ficoll 400

2% (w/v) PVP (MW 40.000)

2% (w/v) BSA

Hybridisierungslösung

4 - 6x SSC

3x Denhardt's

0,5% (w/v) SDS

Waschlösung I

2x SSC

0,5% (w/v) SDS

Waschlösung II

1x SSC

0,5% (w/v) SDS

Waschlösung III

0,1x SSC
0,5% (w/v) SDS

2.2.3.4. Durchsicht von transgenen Pflanzenpopulationen über PCR

Zwei µl der unter 2.2.3.1 gewonnenen genomischen Pflanzen-DNA wurden in Standard-PCR-Reaktionen von jeweils 20 µl Gesamtvolumen unter Einsatz eines genspezifischen Reverse- und eines zum linken Ende der T-DNA homologen Oligonukleotids (*left border primer*) auf die Gegenwart des gewünschten Insertion hin überprüft. Nach Beendigung des PCR-Programms (s.u.) wurden die enzymatischen Reaktionen durch Zugabe von 1/5 Volumen 5 x Stop-Puffer (2.2.2.5) abgestoppt. Positive Nachweisreaktionen zeichneten sich durch eine Bande der erwarteten Größe bei der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung der Reaktionen aus.

PCR-Reaktion:

1/10 Vol genomische DNA (2.2.3.1)
0,1 mM dNTPs, jeweils
0,5 µM Oligonukleotid 1 (genspezifisches Reverse-Oligonukleotid)
0,5 µM Oligonukleotid 2 (*left border primer*)
1/10 Vol 10 x Reaktionspuffer
1 U Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden)

Standard-PCR-Programm:

4 min 96°C
15 s 94°C
30 s 48 - 65°C* · 36 Zyklen
120 s 72°C
4 min 72°C
∞ 18°C

*Die Temperatur für die Anlagerung der Oligonukleotide an die Matrizen-DNA hängt von der Basensequenz der verwendeten Oligonukleotid-Paare ab.

2.2.3.5. Präparation von RNA aus Pflanzengewebe

Pflanzliche RNA wurde sowohl bei der Weiterverwendung für RNA-Blots als auch als Ausgangspunkt für die Herstellung von radioaktiv markierten cDNA-Sonden nach einer Methode von Eggermont et al. (1996) isoliert und gereinigt. Mindestens 20 mg gefrorenes Blattmaterial wurde in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser pulverisiert, in 1 ml eines 1:1-Gemisches aus Extraktionspuffer und PCI aufgenommen und bis zum Auftauen weitergemörsert. Die Suspension wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, maximal 15 min auf Eis inkubiert und dann 5 min zur Phasentrennung bei 10.000 x g zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde abgenommen und in frische Reaktionsgefäße überführt, das gleiche Volumen PCI hinzugegeben und die Gefäße 30 s geschüttelt. Die Phasentrennung wurde durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 10.000 x g herbeigeführt, die Oberphase zum gleichen Volumen CI gegeben und wie vor geschüttelt und zentrifugiert. Zum wäßrigen Überstand wurde ½ Volumen 8 M LiCl gegeben, die Proben 1 h bei -20°C inkubiert und die RNA danach 10 min bei 10.000 x g sedimentiert. Das Sediment wurde mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen und das Ethanol möglichst vollständig abgenommen. Ethanolreste wurden unter dem Abzug verdampft, das getrocknete Sediment in 40 µl DEPC-H₂O_{dd} resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Extraktionspuffer:

100 mM NaOAc

1 mM Na-EDTA

4% (w/v) SDS

DEPC-H₂O:

0,2% (v/v) DEPC

Das Gemisch wurde 1 h gerührt und danach autoklaviert.

8 M LiCl:

8 M LiCl

0,2% (v/v) DEPC

Das Gemisch wurde 1 h gerührt und danach autoklaviert.

PCI:

H₂O-gesättigtes Phenol (s.u.) : Chloroform : Isoamylalkohol (v/v/v) 25 : 24 : 1

CI:

Chloroform : Isoamylalkohol (v/v) 24:1

H₂O-gesättigtes Phenol:

Kristallines Phenol wurde in der gleichen Masse H₂O_{dd} aufgenommen, 3 h gerührt, in einen Scheidetrichter überführt und die untere organische Phase nach der Phasentrennung weiterverwendet und in getönten Glasgefäßen gelagert.

2.2.3.6. Elektrophorese von RNA

Es wurden sowohl Auftrennungen in RNA-Gelele zur Quantifizierung der RNA als auch präparative RNA-Gele zur Verwendung in RNA-Blot-Experimenten (2.2.3.9) eingesetzt. Von jeder Probe wurden für analytische Gele 45 µl Beladungsmix bzw. 95 µl Beladungsmix für präparative Gele vorbereitet. Die Ansätze wurden 15 min bei 65°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Jeder Probenansatz wurde nachfolgend mit 5 µl Ethidiumbromidlösung (1 mg Ethidiumbromid/ml) versetzt und der Inhalt des Reaktionsgefäßes kurz durchmischt. Danach wurden die Ansätze wenige Sekunden anzentrifugiert, die Proben auf Eis zwischengelagert und auf ein 1%iges RNA-Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte bei 130V für ca. 1,5 h. Das Gel wurde nach Abschluß des Laufes wie unter 2.2.3.8 beschrieben bearbeitet und ausgewertet.

RNA-Agarosegel (1%):

1% (w/v) Agarose

12 ml 10 x RB

8 ml Formaldehyd

ad 120 ml H₂O_{bidest.}

Die Agarosesuspension wurde in der Mikrowelle aufgeköcht, nach dem Abkühlen wurden 10 x RB und Formaldehyd zugegeben. Der Laufpuffer ist 1 x RB.

10 x RB:

200mM MOPS, pH 7,0 / NaOH

30mM NaOAc

5mM EDTA in H₂O_{bidest.}**Beladungsmix für RNA-Agarosegele (pro Ansatz):**

6,25 µl Formaldehyd

20 µl deionisiertes Formamid

5 µl 10 x RB

ad 45 µl bzw. 95 µl (s.o.) RNA-Lösung

Formamid, deionisiert:

Formamid wurde mit 3,3% (w/v) AG 501-X8 Kationenaustauscherharz für 30 min gerührt und anschließend bei Raumtemperatur gefiltert.

2.2.3.7. Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren absorbieren maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Aus der Absorption der Lösungen bei $\lambda = 260$ nm kann unter Kenntnis des Extinktionskoeffizienten der Nukleinsäure bei dieser Wellenlänge die Konzentration berechnet werden. Verunreinigungen durch Proteine, Kohlenhydrate, Phenol, sowie Phenolderivate werden über die Absorption der Lösungen bei $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 230$ nm abgeschätzt.

2.2.3.7.1. RNA

Der Quotient A_{260}/A_{280} sollte bei reinen RNA-Lösungen zwischen 1,6 und 1,7 liegen. Der Meßwert bei $\lambda = 230$ nm sollte ebenso wie der bei $\lambda = 325$ nm möglichst gering sein. Eine Extinktionsdifferenz (E) von 0,025 entspricht einer RNA-Konzentration von 1 µg/ml Lösung. Ein Volumen von 1 µl der RNA-Präparationen wurde mit DEPC-H₂O (2.2.3.5) 1:200 verdünnt und die Bestimmung der Extinktion bei den Wellenlängen $\lambda = 230$ nm, 260 nm, 280 nm und 325 nm am Photometer (Ultrospec III, Pharmacia, Freiburg) bestimmt.

Die Meßwerte wurden durch eine zuvor mit 200 µl DEPC-H₂O aufgenommenen Grundlinie über den gesamten Meßbereich der H-Lampe korrigiert. Aufgrund der bisweilen auftretenden beachtlichen Verunreinigungen der Proben mit Kohlenhydraten wurden zur Einstellung von gleichen RNA-Mengen für weiterführende Experimente die Quantifizierung nach 2.2.3.8 vorgezogen.

2.2.3.7.2. DNA

Der DNA-Gehalt wurde ebenfalls über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Ein Aliquot der DNA-Präparation wurde hierzu 1:50 mit TE-Puffer verdünnt und die Absorption bei den Wellenlängen $\lambda = 260$ nm und 280 nm in einer Quarzküvette gegen TE-Puffer als Referenz gemessen. Eine Absorptionsdifferenz von 0,1 entspricht einer Konzentration von 5 µg DNA/ml. Eine Kontamination der DNA-Präparation mit Phenolen und Polysacchariden konnte über die Absorptionsverhältnisse A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} überprüft werden. Die Werte sollten größer als 1,7 bzw. 2 sein. Bei zu großen Verunreinigungen wurde die DNA-Menge auch wie unter 2.2.3.8 beschrieben quantifiziert.

2.2.3.8. Abschätzung von Nukleinsäurekonzentrationen in Agarosegelen

Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen von Nukleinsäuren, wodurch sich der ursprünglich vorliegende, thermodynamisch favorisierte Abstand zwischen den hintereinanderfolgenden Basen ändert; das betreffende Molekül (RNA oder DNA) wird gestreckt. Der so gebildete Komplex kann durch UV-C-Licht zur Fluoreszenz im Orangebereich angeregt werden. Die Anzahl emittierter Quanten ist nach Sharp et al. (1973) proportional zur Anzahl der Nukleinsäuremoleküle an der entsprechenden Stelle im Agarosegel. Die Agarosegele wurden nach der Beendigung des Gellaufes auf einen UV-Tisch plziert und fotografisch dokumentiert. Die resultierenden Bilder wurden als TIFF-Dateien gespeichert, die mit Hilfe des Programmes *NIH Image Quant 1.60/ppc* ausgewertet werden konnten. Dabei konnte über die Verteilung der Pixeldichte (= Helligkeit) in den jeweiligen Gelspuren integriert und die Flächen unter den interessanten Banden durch das Programm berechnet und zueinander in Relation gesetzt werden. Durch die densitometrische Analyse der rRNA-Banden konnten etwa gleiche Mengen RNA für den Transfer auf Nitrozellulose-Membranen (2.2.3.9) eingesetzt werden.

DNA-Mengen konnten durch den Vergleich der Quantifizierungsergebnisse der aufgetragenen Proben mit denen des Molekulargewichtsmarkers bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

Marker für DNA-Agarose-Gele:

100 µl 1 kb-DNA-Leiter [1 µg/µl], GibcoBRL
100 µl 10x Stop
ad 1 ml H₂O_{dd}

2.2.3.9. Northern-Blot

Die Übertragung von RNA auf Nitrozellulosemembranen erfolgt nach Chomczynski (1992) über Hochsalzpuffer (10x SSC) und ist in Standardwerken beschrieben (Ausubel et al., 1997). Für den Transfer wurden Biotodyne B-Membranen (Pall, Portsmouth, UK) und etwa 30 µg der Gesamt-RNA (2.2.3.5) pro Spur eingesetzt.

2.2.3.10. Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Bei der Herstellung radioaktiv markierter DNA-Fragmente nach Feinberg und Vogelstein (1983) wird ³²P über die α-Phosphatgruppe von α-[³²P]-dATP in das Zucker-Phosphat-Rückgrat enzymatisch synthetisierter Nukleinsäuren eingebaut. Der Ausgangspunkt für die Polymerisation der DNA (Nukleation der DNA-Synthese) sind dabei Hexanuklotide, die statistisch alle 4.000 Nukleotide an den Matrizenstrang binden (*random priming*).

2.2.3.10.1. Sondensynthese

30 ng isolierter DNA-Fragmente wurden mit 10 µl Oligomarkierungspuffer versetzt und mit H₂O_{dd} so aufgefüllt, daß nach Zugabe der restlichen Komponenten ein Gesamtvolumen von 50 µl in den Reaktionsgefäßen vorlag. Die Ansätze wurden für 10 min auf 95°C zur Denaturierung der DNA-Stränge erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Nach dem Abkühlen und Anzentrifugieren der Lösung wurden 2 µl BSA ([1 µg/µl]) und 2 µl Klenow-Fragment (Boehringer, Mannheim [2 U/µl]), sowie 40 µCi [³²P]dATP (ICN,

Aurora/ USA) hinzugegeben und die Ansätze für mindestens 2 h bis maximal 6 h bei 37°C inkubiert.

Oligomarkierungspuffer:

Der Oligomarkierungspuffer wurde aus drei getrennt angesetzten Lösungen hergestellt.

Lösung A:

1,25 M Tris/HCl pH 8,2
125 mM MgCl₂
2 Vol% β-Mercaptoethanol
je 0,5 mM dNTPs

Lösung B:

2 M Hepes/NaOH; pH 6,6

Lösung C:

3,6 µg/µl Desoxyhexanukleotide (Boehringer, Mannheim)

Die Lösungen A, B und C wurden aliquotiert, bei -20°C gelagert und im Volumenverhältnis (v/v/v) 1 : 2,5 : 1 gemischt.

2.2.3.10.2. Kontrolle der Einbaurate

Die Einbaurate wurde vor Reinigung und Verwendung der Sonden kontrolliert. War die Einbaurate zu gering, so konnte die Inkubationszeit verlängert werden. 1,5 µl der Markierungsreaktionen wurden mit 100 µl H₂O_{dd} verdünnt und die DNA nach Zugabe von 2 µl Träger-DNA (10 mg/ml Heringsspermen-DNA) mit 130 µl 20%iger Trichloressigsäure (TCA) für 5 min auf Eis gefällt. Nachfolgend wurden die Ansätze 7 min bei 13.000 U·min⁻¹ (17.900 x g) zentrifugiert und die Überstände vollständig in neue Einweg-Reaktionsgefäße überführt. Nun wurde die Radioaktivität des Sedimentes und des wäßrigen Überstandes mit dem Zählrohr gemessen und die prozentuale Verteilung des ³²P berechnet. Ab einer Markierungsrate von mindestens 70% wurden die Ansätze weiter aufgearbeitet.

2.2.3.10.3. Reinigung der DNA-Sonden

S200 *spin columns* (Pharmacia, Freiburg) wurden zum Resuspendieren des Säulenmaterials mehrfach invertiert, geöffnet und in Einmal-Reaktionsgefäße gestellt. Der Puffer der Säulen wurden durch Zentrifugation für 1 min bei $3.100 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ($1.000 \times g$) mit leicht gelöstem Säulenschraubdeckel abgetrennt. Nach dem Auftrag des Restvolumens der Markierungsansätze wurden Säulen und Reaktionsgefäße für 2 min bei $3.100 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ($1000 \times g$) zentrifugiert, wobei die Sonden in neuen Reaktionsgefäßen aufgefangen wurden. Die Eluate wurden anschließend mit $100 \mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ verdünnt und wurden für 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und schließlich in das Prähybridisierungsmedium (2.2.3.11) gegeben. Es wurden spezifische Aktivitäten zwischen 380 und $510 \text{ Ci} \mu\text{mol}^{-1}$ Sonde ($= 2,5 \text{ mCi} \cdot \mu\text{g DNA}^{-1}$) erzielt. Alternativ konnten die Eluate nach der Verdünnung auch bei -20°C bis zur Verwendung gelagert werden.

2.2.3.11. Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Sonden mit RNA-Blots

RNA-tragende Nitrozellulosemembranen wurden im Hybridisierungssofen unter Rotation 30 min bei 68°C in Church-Puffer prähybridisiert. Die wie unter 2.2.3.10 vorbereitete radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde hinzugefügt und über Nacht bei 58°C hybridisiert.

Church-Puffer:

0,5 M NaH_2PO_4 , pH 7,2

7% (w/v) SDS

1 mM EDTA

Am nächsten Morgen wurde die Hybridisierungslösung in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und bei -20°C bis zur erneuten Verwendung oder bis zum Abklingen gelagert. Die Membranen wurden jeweils 5 min bei Raumtemperatur mit steigender Stringenz in $6 \times \text{SSC}/ 0,5\% \text{ SDS}$, $4 \times \text{SSC}/ 0,5\% \text{ SDS}$ und $2 \times \text{SSC}/ 0,5\% \text{ SDS}$ gewaschen. Danach werden die Membranen maximal 15 Minuten in $2 \times \text{SSC}/ 0,5\% \text{ SDS}$ und bei Bedarf weitere Minuten in $1 \times \text{SSC}/ 0,5\% \text{ SDS}$ bei 65°C im Hybridisierungssofen

gewaschen, wobei die auf der Membran verbliebene Radioaktivität auch während der Waschungen mit dem Monitor überwacht wurde.

2.2.3.12. Detektion radioaktiver Hybridisierungssignale

Die hybridisierten Membranen wurden, soweit nicht anders angegeben, nach den Waschungen in Plastikfolie feucht eingeschweißt und für zwei bis vier auf einem *storage phosphor screen* (Fa. Molecular Dynamic, Krefeld) exponiert. Dieser wurde nach Ende der Exposition mit einem Phosphor-Imager (Storm 860, Fa. Molecular Dynamics, Krefeld) gescannt (Version 4.1), als TIFF-Datei gespeichert und konnte mit der Software *ImageQuant Mac* (Version 1.2) densitometrisch ausgewertet werden.

2.2.3.13. RT-PCR

Zur Synthese von Erststrang-cDNA wurde das *SuperscriptTM II RNase H* Reverse Transcriptase-Kit (Gibco BRL) verwendet. Das Protokoll wurde wie folgt geändert. 2 µg RNA aus Blättern wurde mit 10 U RNase-freier DNase I (Boehringer Mannheim GmbH) 15-20 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde durch Zugabe von EDTA (2,27 mM Endkonzentration) und nachfolgender Hitzedenaturierung (10 min 65°C) inaktiviert. Der Reaktionsansatz enthielt 500 ng Oligo (dT)₁₂₋₁₈, jeweils 0,5 mM dNTPs, 10 mM DTT und 200 U Reverse Transcriptase in einem Endvolumen von 50 µl. Nach Inkubation für eine Stunde bei 42°C wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70°C für 15 min denaturiert. Ein Zehntel dieses Ansatzes wurde in einer nachfolgenden PCR als DNA-Vorlage eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden der Größe nach auf einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid angefärbt.

2.2.4. Biochemische Methoden

2.2.4.1. Mechanischer Aufschluss von Hefezellen und Proteingewinnung

Hefezellen einer Induktionskultur (2.2.2.7) wurden zum Zeitpunkt der maximalen Expressionstärke des rekombinanten Proteins 5 min bei 3.000 U·min⁻¹ sedimentiert und in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen mit TE-Puffer (2.2.2.6) mit 1% (v/v) PMSF (30 mg / ml EtOH)

auf eine Extinktion bei $\lambda = 600$ nm von 50,0 gebracht. Danach wurde die 4fache Menge (w/w) säuregewaschene Glasperlen hinzugegeben, gut durchmischt und die Zellen dann bei 4°C im Kühlraum in einem Zellhomogenisator (Braun, Melsungen) aufgeschlossen. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls im Kühlraum. Nach dem Zellaufschluß wurde das gleiche Volumen TE/PMSF hinzugefügt, die Suspension homogenisiert und 8 min bei 2.300 U·min⁻¹ zentrifugiert. Der danach milchige Überstand wurde schließlich in einem letzten Zentrifugationsschritt (100 000 x g, 15 min, 4°C, Centrikon T-1065, Rotor 65-13) in eine lösliche und eine membrangebundene Fraktion getrennt. Die sedimentierte Membranfraktion wurde dann direkt zur Rekonstitution in Liposomen (2.2.5.3.3) oder proteinchemischen Analyse (2.2.4.2) verwendet oder bei -20°C eingefroren und gelagert. Zur Gewinnung von His₆-markiertem Protein wurde ein solches Membransediment in Puffer I mit 1,5% Detergenz resuspendiert und zu 30 µl Ni²⁺-NTA-Agarose-Suspension (QIAGEN, Hilden) gegeben, die zuvor fünfmal mit 1 ml Puffer I äquilibriert wurde, wobei die Ni²⁺-NTA -Agarose-Partikel nach jedem Resuspendieren durch 10 s Anzentrifugieren wieder abgesetzt wurden. Das Gemisch aus Ni²⁺-NTA-Agarose und Membransuspension wurde resuspendiert und geschüttelt. Die Suspension wurde 15 s anzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment fünfmal mit 1 ml Puffer II gewaschen. Nach jedem Resuspendieren wurde das Säulenmaterial erneut 15 s anzentrifugiert. Bei Bedarf wurden Aliquots der Überstände zur Überwachung der Wasch- und Elutionsschritte mit dem gleichen Volumen 2 x SB versetzt und bis zur Analyse per SDS-PAGE (2.2.4.2) bei Raumtemperatur gelagert. Das His₆-gekoppelte Protein wurde anschließend mit Puffer III von der NiNTA-Agarose eluiert. Eluate wurden mit dem gleichen Volumen 2 x SB versetzt und bis zur elektrophoretischen Auftrennung bei Raumtemperatur gelagert, oder direkt zur Rekonstitution in Liposomen verwendet (2.2.5.3.3). Bei größeren Aufreinigungsansätzen wurde statt mit diesem sogenannten *batch*-Verfahren mit watteverschlossenen Pasteurpipetten als Säulen gearbeitet.

Puffer I:

100 mM NaH₂PO₄
50 mM NaCl
8 mM Imidazol
0,06% (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltopyranosid (DM)

Puffer II:

10 mM Tricine / KOH, pH 8,0

35 mM Imidazol
0,06% (w/v) DM

Puffer II:

150 mM Imidazol, pH 8,0
0,06% (w/v) DM

2 x SB:

125 mM Tris/HCl, pH 6,8
20% (v/v) Glycerin
4% (w/v) SDS
3% (w/v) DTT
0,005% (w/v) Bromphenolblau

Säuregewaschene Glasperlen:

Die Glasperlen (0,5 mm) wurden in 0,1 M HCl gewaschen und durch mehrfaches Spülen mit H₂O_{dd} neutralisiert.

2.2.4.2. Auftrennung von Proteinextrakten über SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde nach (Laemmli, 1970) durchgeführt. SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe der Minigel Apparatur System 2050 Midget (Pharmacia, Freiburg) hergestellt. Trenngele wurden vor der Polymerisierung mit n-Butanol überschichtet, das nach erfolgter Polymerisierung wieder abgeschüttet wurde. Polymerisierungsreaktionen wurden durch Zugabe von TEMED gestartet. Bei der Elektrophorese waren die Kathoden- und Anodenpuffertanks voneinander getrennt und durch die Gele miteinander verbunden. Die Proben (2.2.4.1, 2.2.5.5.1) und Molekulargewichtsmarker (Dalton Mark VII-L, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) wurden aufgetragen, 10 min bei 10 mA einlaufen gelassen, 2 min bei 40 mA fokussiert und bis die Proteinfront das Ende des Trenngels erreicht hatte bei 25 mA aufgetrennt (ca. 35 min).

4 x Sammelgelpuffer:

500 mM Tris/HCl, pH 6,8

0,4% SDS

4 x Trenngelpuffer:

1,5 M Tris/HCl. pH 8,8

0,4% SDS

Sammelgelzusammensetzung:

25% (v/v) 4 x Sammelgelpuffer

15% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) (Roth, Gel 30)

0,06% (w/v) APS

0,3% (v/v) TEMED

Trenngelzusammensetzung (12,5% Acrylamid):

25% (v/v) 4 x Trenngelpuffer

42% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) (Roth, Gel 30)

0,05% (w/v) APS

0,05% (v/v) TEMED

2.2.4.3. Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau

Die Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau erfolgte nach (Weber and Osborn, 1969). Die Färbelösungen 1 und 2 wurden zu gleichen Teilen gemischt und die SDS-PAGE-Gele 30 min unter leichtem Schütteln darin gefärbt. Die Gele wurden dann in Entfärber überführt und bis zur Entfärbung des Gelhintergrundes unter Wechseln der Lösung entfärbt und bei Bedarf fotografisch dokumentiert, sowie in gespannter und in Entfärber getränkter Zellophanfolie mehrere Tage lang luftblasenfrei getrocknet.

Coomassie Färbelösung 1:

0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blau (Serva)

80% (w/v) MeOH

Coomassie Färbelösung 2:

20% (v/v) HOAc

Entfärber

10% (v/v) HOAc

40% (v/v) MeOH

2.2.4.4. Proteinfärbung mit Silbernitrat

Die Färbung wurde nach der Vorschrift von (Blum et al., 1987) durchgeführt; sie ist ca. 5-10-fach empfindlicher als die Färbung mit Coomassie-Brilliantblau (2.2.4.3).

Fixierlösung

50% (v/v) Methanol

12% (v/v) Essigsäure

0.019% (v/v) Formaldehyd

Waschlösung I

50% (v/v) Ethanol

Waschlösung II800 μ M Natriumthiosulfat**Inprägnierlösung**

0.2% (w/v) Silbernitrat

0.028% (v/v) Formaldehyd

Entwicklerlösung

6% (w/v) Dinatriumkarbonat

0.019% (v/v) Formaldehyd

18 μ M Natriumthiosulfat**Stop-Lösung**

50% (v/v) Methanol

12% (v/v) Essigsäure

Die Gele wurden zunächst 2 Stunden in der Fixierlösung geschüttelt, dann 3 x 20 Minuten mit Waschlösung I und genau 1 Minute mit Waschlösung II gewaschen. Nach drei Waschungen mit Wasser für genau 20 Sekunden wurden die Gele für mindestens 20 Minuten in Imprägnierlösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser für jeweils genau 20 Sekunden wurden die Gele bis zum deutlichen Hervortreten der Banden in Entwicklerlösung inkubiert. Danach wurde erneut zweimal kurz mit Wasser gewaschen und für 30 Minuten in Stop-Lösung inkubiert. Anschließend konnten die Gele getrocknet werden (2.2.4.3).

2.2.4.5. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (*Western-Blot*)

Die Übertragung von Proteinen von SDS-Polyacrylamidgelen (2.2.4.2) auf PVDF Membranen (BioRad, München) wurde im Halbtrockenverfahren nach (Khyse-Anderson, 1984) in einer Transferkammer mit Carbon-Elektroden (Carboglass, Schleicher & Schuell, Dassel) durchgeführt. Der Aufbau der Apparatur und die Vorbereitung der Lösungen erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers der verwendeten Kathoden- und Anodenpuffer (RotiBlot®-System, Roth, Karlsruhe). Vor dem Aufbau des Systems wurde die PVDF-Membran 10 s in Methanol aktiviert. Der Elektrotransfer dauerte 1,5 h bei $1 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ Gelfläche.

2.2.4.6. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach Beendigung des Elektrotransfers wurde der Bereich der PVDF-Membran mit dem Molekulargewichtsmarker abgetrennt und 30 s in Coomassie-Brilliantblau (2.2.4.3) gefärbt. Der Rest der Membran wurde zügig in Blockierpuffer überführt und 30 min unter Schütteln bei Raumtemperatur mit BSA abgesättigt. Der primäre, gegen ein Epitop des gesuchten Proteins gerichtete Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2500 bis 1:3000 in den Blockierungspuffer gegeben und 1-3 h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde dann zweimal für 10 min mit TBST-T und einmal 10 min mit TBS gewaschen und anschließend der sekundäre Antikörper einer 1:3000-Verdünnung in Blockierpuffer appliziert. Nach einer 1,5-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran wie nach Entfernen des primären Immunglobulins gewaschen und schließlich solange in Färbelösung geschwenkt, bis Banden des blau

gefärbten, unlöslichen Niederschlags aus NBT- und BCgIP-Addukten sichtbar waren. Die Membran wurde dann kurz in H_2O_{dd} überführt, an der Luft getrocknet und zur besseren Konservierung in Folie eingeschweißt. Antikörperlösungen konnten bei $-20^{\circ}C$ eingefroren und mehrfach wiederverwendet werden.

Färbelösung:

10 ml Puffer A
66 μ l NBT (5% (w/v) in 70% DMF)
33 μ l BCIP (5% (w/v) in DMF)

Puffer A:

100 mM Tris/ HCl, pH 9,5
100 mM NaCl
5 mM $MgCl_2$

TBST-T:

10% (v/v) 10x TBS
0,2% (v/v) Triton X-100
0,05% (v/v) Tween 20

10x TBS:

0,1 M Tris/HCl, pH 7,4
1,5 M NaCl

2.2.4.7. Bestimmung von Proteinmengen in Lösungen

Bei dem von (Bradford, 1976) entwickelten Test werden Proteine mit Coomassie-Brilliantblau nachgewiesen. Proteinmenge und Extinktion bei $\lambda = 590$ nm korrelieren nicht linear zueinander, so daß auch die Extinktion bei $\lambda = 450$ nm gemessen und der Quotient A_{590}/A_{450} gebildet wurde. Die Proteinkonzentrationen in den Proben wurden mit Hilfe einer mitgeführten BSA-Eichreihe im Bereich von 0,5 bis 20 μ g BSA berechnet. Die Proben wurden mit H_2O_{dd} auf 800 μ l aufgefüllt, 200 μ l Roti-Quant (Roth, Karlsruhe) zugegeben, die Reaktionsgefäße gründlich invertiert und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Photometer wurde bei $\lambda = 590$ nm mit einer leeren Einmal-Küvette auf Null

abgeglichen, die Extinktionen der Lösungen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ und $\lambda = 590 \text{ nm}$ gemessen und die Proteingehalte anhand der Eichreihe berechnet.

2.2.5. Physiologische Methoden

2.2.5.1. Messungen im Pulsamplitudenmodulationsverfahren an intakten Blättern

Dynamische Änderungen der Chlorophyllfluoreszenz wurden mit einer PAM-2000 (Walz, Effeltrich) gemessen. Grundlegende Größen wie F_v (variable Fluoreszenz), F_s (Fluoreszenz im Fließgleichgewicht), F_m' (maximale Fluoreszenz in lichtadaptierten Blättern) F_0 (Grundfluoreszenz in dunkeladaptierten Blättern) und F_m (maximale Fluoreszenz in dunkeladaptierten Blättern) wurden, wie in Schreiber et al. (1986) beschrieben, während der Messung alle 10 bis 30 s ermittelt. Die aus den Meßwerten abgeleiteten Parameter q_N (nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung), q_P (photochemische Fluoreszenzlöschung), das F_v/F_m -Verhältnis, und die ETR (Elektronentransportrate) wurden während der Messungen von den mit dem Gerät gelieferten Programmen nach Schreiber et al. (1986), sowie Φ_{PSII} (Effizienz des Quantentransfers im Photosystem II) nach Genty et al. (1989) berechnet und ausgegeben. Vor der Bestimmung von F_0 und F_m wurden die Pflanzen 20 min dunkeladaptiert. Die Bestimmung von q_A^- , dem prozentualen Anteil reduzierten, an Photosystem II (PSII) gebundenen Plastochinons, wurde mit der Formel $q_A^- = 100 \cdot (1 - q_P)$ in Anlehnung an Schreiber et al. (1986) bestimmt.

2.2.5.2. Bestimmung der Blattfläche von *A. thaliana* Blättern

Blätter von *A. thaliana* wurden auf Millimeterpapier ausgelegt und mit Kopierfolien abgedeckt, die beschriftet werden konnten. Kopierfolie und Millimeterpapier wurden mit Büroklammern arretiert und mit der Kopierfolie nach unten kopiert. Die Silhouetten der Blätter und Referenzflächen verschiedener Größe wurden aus der Kopie ausgeschnitten und auf der Feinwaage gewogen. Anhand der Eichwerte der Referenzflächen konnten die Blattflächen berechnet werden.

2.2.5.3. Transportexperimente mit Proteoliposomen

Die Extraktion, Solubilisation und Rekonstitution pflanzlichen Gesamtmembranproteins wurde in leicht modifizierter Form nach Flügge und Weber (1994) durchgeführt.

2.2.5.3.1. Reinigung von Phosphatidylcholin für die Liposomenherstellung

30 g Phosphatidylcholin (Sigma, Deisenhofen) wurden nach (Kramer et al., 1977) in 100 ml Chloroform gelöst, mit 540 ml Aceton versetzt, das Gemisch 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Phospholipid über Nacht bei 4°C gefällt. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 100 ml Diethylether gelöst, der nachfolgend am Rotationsverdampfer abgezogen wurde. Der hochreine Phosphatidylcholin-Rückstand wurde aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.3.2. Extraktion und Solubilisierung von Membranproteinen

Blattmaterial definierten Gewichts wurde geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Blattmaterial wurde in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser pulverisiert, 15 Volumen (v/w) Aufschlußpuffer hinzugegeben und das Gemisch bis zum Auftauen homogenisiert. Das Homogenat wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und diese 2 min bei 14.000 U·min⁻¹ (20.800 x g) zur Sedimentierung grober Gewebetrümmer zentrifugiert. Die Überstände wurden abgehoben, in frische Reaktionsgefäße transferiert und die Suspension mit der Pipette durchmischt. 100 µl der Suspension wurden für eine Chlorophyllbestimmung (2.2.5.8) abgenommen und bei -20°C in einem Reaktionsgefäß bis zur Verwendung eingefroren, der Rest der Präparation wurde bis zur Zugabe in die Liposomenlösung (s.u.) auf Eis gelagert. Bei der Verarbeitung von Blattmaterial aus *Mesembryanthemum* (1.2.3) wurden einige Modifikationen eingeführt. Aufgrund der hohen Konzentration an Malat im Blattmaterial wurde der pH-Wert der Suspension ständig kontrolliert und gegebenenfalls durch Zugabe von 5 M K₂CO₃ über einen Wert von pH 7 eingestellt. Um spezifisch Phosphatranslokator-Protein an- bzw. lösliches Protein abzureichern, wurde nach dem Aufschluss ein Ultrazentrifugationsschritt (100 000 x g, 15 min, 4°C, Centrikon T-1065,

Rotor 65-13) angefügt. Die sedimentierten Membranfraktionen wurde dann direkt zur Rekonstitution in Liposomen (2.2.5.3.3) eingesetzt.

Aufschlußpuffer:

- 0,2 M Tricin/KOH, pH 8,0
- 10 mM EDTA
- 4 mM DTT
- 6 mM Ascorbat
- 0,1% (w/v) BSA, entfettet
- 0,1% (w/v) PVP
- 0,5% (v/v) Protease-Inhibitor-Cocktail für Pflanzenextrakte (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

2.2.5.3.3. Rekonstitution von Membranproteinen

Mit dem Ultraschallgerät (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics, Danbury/USA) wurden 5 ml der Liposomenpuffer 10 min auf Eis bei 30% Auslastung auf Stufe 5 beschallt und danach auf Eis gestellt. 600 µl Liposomensuspension wurden mit je 400 µl der solubilisierten Proteine aus den verschiedenen Blattproben vermischt, die Reaktionsgefäße invertiert, kurz zentrifugiert und bei -80°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Falle der Rekonstitution von heterolog exprimiertem Protein (2.2.2.7) wurde ein Volumen von 700 µl Liposomensuspension mit 110 bis 120 µl solubiliertem Protein vermischt. Die Ansätze konnten bei Bedarf bis zur zweiten Beschallung bei -80°C gelagert werden. Die Liposomengemische wurden anschließend auf Eis aufgetaut und danach 30 Pulse lang in gleicher Stärke wie zuvor zur Bildung von Proteoliposomen beschallt. Das gesamte Volumen der Proteoliposomenlösungen wurde auf vorher dreimal mit 5 ml PD10-Puffer äquilibrierte NAP-25-Säulen (Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Es wurde mit zweimal 1000 µl PD10-Puffer zur Abtrennung des alten Außenmediums gespült. Die Proteoliposomen wurden dann mit 950 µl PD10-Puffer eluiert. Die NAP-25-Säulen wurden nach der Verwendung zur Reinigung viermal mit Azidwasser gefüllt.

Liposomenpuffer:

- 100 mM Tricin/KOH, pH 7,8
- 80 mM Kaliumglukonat

30 mM Substrat

11 Vol% Phosphatidylcholin

Als Substrate wurden verschiedene, phosphorylierte Metabolite eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten Liposomen, die kein Substrat enthielten.

PD10-Puffer:

100 mM Natriumglukonat

50 mM Kaliumglukonat

10 mM Tricin/KOH, pH 7,6

2.2.5.3.4. Messung der Transportraten

Pasteurpipetten wurden mit wenig Watte verstopft, mit 1,5 ml einer dichten Suspension von Anionenaustauscherharz (Dowex AG 1-X8, 100-200 mesh, BioRad, München) in H₂O gefüllt und mit zweimal 1 ml 200 mM NaOAc äquilibriert. Pro Ansatz wurden 2 bis 3 µCi [³²P]-NaH₂PO₄ mit 0,2 M KH₂PO₄, pH 7,0 auf eine Phosphatkonzentration von 5 mM gebracht und 45 µl-Aliquots dieser Stammlösung in Reaktionsgefäße vorgelegt. Zur Bestimmung der exakten spezifischen Aktivität der Substratlösung wurden verdünnte Aliquots der Phosphatstammlösung im Szintillationszähler (Beckman LS 6000A, München) mittels des Cherenkov-Effektes gezählt. 850 µl der gereinigten Proteoliposomenlösungen wurden zur vorgelegten Phosphatlösung in die Reaktionsgefäße pipettiert und der Inhalt mit der Pipettenspitze durchmischt. 15, 35, 55 und 75 s nach Zugabe der Proteoliposomen wurden 200 µl aus den Reaktionsgefäßen entnommen und jeweils auf eine Anionenaustauschersäule (2.2.5.3.4) gegeben. Anschließend wurden die radioaktiv beladenen Proteoliposomen mit einmal 500 µl und einmal 1,5 ml 200 mM NaOAc in Szintillationsgefäße eluiert. Dabei bindet nicht in die Liposomen eintransportiertes [³²P]-P_a an die Matrix, so dass kein Substratmolekül mehr die Liposomen verlassen kann. Die Eluate wurden wie die Aliquots der Substratlösung im Flüssigszintillationszähler gezählt. Das ans Austauscherharz gebundene [³²P]-Phosphat wurde mit 3 mal 1 ml 1 M HCl eluiert und entsorgt.

2.2.5.4. Stärkeextraktion

Blätter wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und in schockgefrorenem Zustand in 1 ml auf 65°C vortemperiertes 80% Ethanol transferiert. Die Reaktionsgefäße wurden wenige Minuten auf 80°C erhitzt, das Ethanol abgehoben, durch 1 ml frisches 80% Ethanol ersetzt und weiter bis zur vollständigen Ausbleichung der Blätter bei 80°C extrahiert. Die ethanolischen Extrakte wurden vereinigt und im Vakuumkonzentrator (Bachofer, Reutlingen) zur Trockne eingeengt. Alternativ konnten lösliche und unlösliche Fraktionen bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20° C eingefroren werden. Das ausgebleichte Gewebe wurde mit 250 µl 0,2 M KOH versetzt und mit einem rotierenden Pistill (Techn. Werkstätten, Institut f. Botanik) in den Reaktionsgefäßen homogenisiert. Am Bohrkopf verbliebene Gewebereste wurde mit weiteren 250 µl 0,2 M KOH zum Homogenisat gespült. Stärke wurde durch 45minütiges Erhitzen auf 95°C in Lösung gebracht, die Ansätze 1 min auf Eis abgekühlt und zur Einstellung des pH-Wertes auf 5,5 bis 6 mit 120 µl 1 M Essigsäure vermischt. 7,3 U α -Amylase und 5 U Amyloglukosidase in 100 µl 0,1 M NaOAc wurden zur enzymatischen Hydrolyse der Stärke hinzupipettiert und die Gefäße über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Reaktionen wurden durch die 10minütige Denaturierung der Enzyme bei 95°C abgestoppt und die Reaktionsgefäße danach 5 min bei 14.000 U·min⁻¹ (20.800 x g) zentrifugiert.

2.2.5.5. Enzymaktivitätsbestimmungen aus Blattextrakten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die maximal extrahierbare Enzymaktivität aus Gewebeextrakten gemessen. Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgt über einfache oder gekoppelte optische enzymatische Tests. Kopplungsenzyme und Substrate wurden im Überschuß hinzugegeben, damit allein die Aktivität des untersuchten Enzyms geschwindigkeitsbestimmend war. Durch Substratmangelansätze konnten die gemessenen Aktivitäten gegen einen unspezifischen Hintergrund korrigiert werden. Die Kinetiken wurden mit Hilfe der mitgelieferten Programme (*EasyWin Kinetics*, SIL-TECAN) ausgewertet.

2.2.5.5.1. **Aufschluss von Blattmaterial**

Arabidopsis-Blätter wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Extraktion bei -80°C gelagert. Die Proben wurden dann mit einem in flüssigem Stickstoff vorgekühlten rotierenden Pistill im drei- bis fünffachen Volumen Extraktionspuffer aufgeschlossen, so daß sich eine Proteinkonzentration von mindestens $1,5 \text{ mg Protein}\cdot\text{ml Extrakt}^{-1}$ ergab. Die Extrakte wurden sofort auf -20°C gestellt und noch am gleichen Tag gemessen. Vor der Messung wurden die Extrakte 1 min bei $12.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ ($15.300 \times \text{g}$) anzentrifugiert und auf Eis gestellt. 5 bis $10 \mu\text{l}$ Aliquots der Überstände wurden in den Enzymtests bei 30°C (s. 2.2.5.5.2 ff) im Absorptionsmodus des *SpectraFluor plus* (SIL-Tecan, Crailsheim) eingesetzt und mit den mitgelieferten Programmen (*EasyWIN kinetics*, SIL-Tecan, Crailsheim) ausgewertet. $10 \mu\text{l}$ Aliquots dieser Verdünnung und des ursprünglichen Überstandes wurden für eine Proteinbestimmung (2.2.4.7) abgenommen und bis zur Verwendung am gleichen Tag bei 4°C gelagert. Vor der Zugabe in die Reaktionsgemische wurden in NH_4SO_4 suspendierte Kopplungsenzyme 1 min bei $12.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ ($15.300 \times \text{g}$) zentrifugiert, der ammoniumsulfathaltige Überstand abgenommen und das Sediment im gleichen Volumen 50mM Hepes/NaOH, pH 7,3 aufgenommen.

Extraktionsmedium:

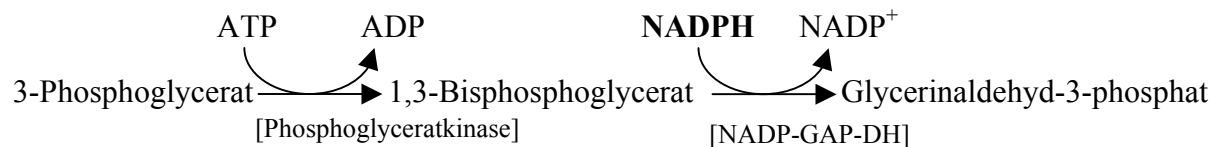
- 50mM Hepes/NaOH, pH 7,5
- 2mM DTT
- 5mM MgCl_2
- 1mM EDTA
- 0,1% (v/v) β -Mercaptoethanol
- 0,5% (v/v) Triton-X-100
- 50% (v/v) Glyzerin

β -Mercaptoethanol, Triton-X-100 und Glyzerin wurden erst nach Einstellung des pH-Werts in den Puffer gegeben.

2.2.5.5.2. NADP-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.13)

Die Aktivität der NADP-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (NADP-GAP-DH) wurde durch einen gekoppelten optischen Test nachgewiesen.

Nachweis der NADP-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GA3P-DH)-Aktivität:



In den Reaktionsansätzen befanden sich in je 200 μl Volumen:

50 mM Tricin/NaOH, pH 8,1

4 mM 3-Phosphoglycerat*

5 mM ATP

10 mM MgCl_2

0,2 mM NADPH

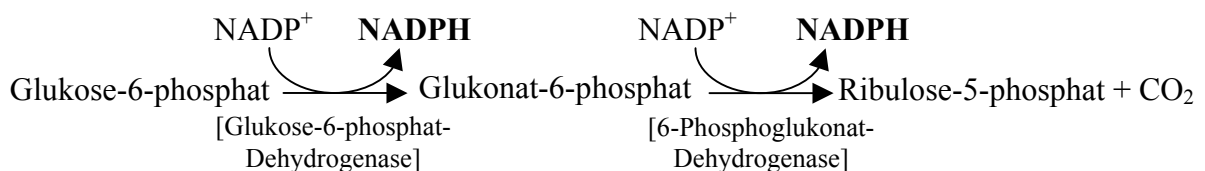
20 U Phosphoglyceratkinase (Boehringer, Mannheim)

2,5% (v/v) Extrakt

* Das Substrat 3-Phosphoglycerat fehlte in den Kontrollansätzen.

2.2.5.5.3. Enzyme des Oxidativen Pentosephosphatwegs

Reaktionsfolge des oxidativen Teils des Pentosephosphatzyklus (messrelevante Schritte):



2.2.5.5.3.1. *Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)*

Die Aktivität der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wurde wie von Stitt und ap Ress (1979) beschrieben nachgewiesen.

In den Reaktionsansätzen befanden sich in je 200 µl Volumen:

- 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
- 2,5 mM MgCl₂
- 1 mM NADP⁺
- 10 mM Glukose-6-phosphat*
- 0,5 U 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (Boehringer, Mannheim)
- 5% (v/v) Extrakt

* Das Substrat Glukose-6-phosphat fehlte in den Kontrollansätzen.

2.2.5.5.3.2. *Phosphoglukonat-Dehydrogenase (decarboxylierend, EC 1.1.1.44)*

Die Aktivität der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6PG-DH) wurde wie von Glock und McLean (1953) beschrieben nachgewiesen.

In den Reaktionsansätzen befanden sich in je 200 µl Volumen:

- 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
- 20 mM MgCl₂
- 4 mM NADP⁺
- 4 mM 6-Phosphoglukonat*
- 5% (v/v) Extrakt

*Das Substrat 6-Phosphoglukonat fehlte in den Kontrollansätzen

2.2.5.5.4. **Bestimmung von Glutathion per HPLC**

Die Bestimmung der Gehalte an reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH bzw. GSSG) per HPLC erfolgte nach einer Methode von Strohm et al., 1995. Es wurde Blattmaterial in 2% (v/v) HClO₄ mit 7% (w/v) PVPP, das zuvor in 10%iger HCl aufgekocht, neutralisiert und filtriert worden war, unter N₂ gemörsert. Das Homogenat

wurde auf Eis zweimal für 30 s mit einem Ultraschallstab behandelt und anschließend einmal 20 min und einmal 10 min bei 4°C und 12.000 U·min⁻¹ (15.300 x g) zentrifugiert, wobei jeweils die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt wurden. Danach wurde mit 5 M K₂CO₃ alkalisiert und ein letztes Mal zentrifugiert (4°C, 14.000 U·min⁻¹, 20.800 x g). Der Überstand wurde direkt zur Messung eingesetzt oder bei -20°C eingefroren. Die weitere Versuchsdurchführung verlief nach Baier et al. (2000).

2.2.5.6. Bestimmung der Stärkegehalte in Blattproben

A. thaliana-Blattmaterial eines Frischgewichts zwischen 20 und 80 mg wurde in 2 ml-Einweg-Reaktionsgefäßen geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Extraktion und Aufarbeitung des Blattmaterials erfolgte wie in 2.2.5.4 beschrieben. Der letzte Zentrifugationsüberstand wurde bis zur Messung bei -20°C tiefgefroren. Aliquots der Überstände wurden bei 30°C im Mikrotiterplattenlesegerät (SIL-Tecan, Crailsheim) mit einem Absorptionsfilter von $\lambda = 360$ nm im Absorptionsmodus in folgenden Testansätzen eingesetzt:

100 mM Hepes/ KOH, pH 8,0
0,6 mM NADP⁺
2 mM ATP
10 mM MgCl₂
2,5% (v/v) Überstand

Die Reaktionen wurden nach wenigen Minuten durch Zugabe eines Gemisches von 34 mU Hexokinase und 17 mU Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase mit einem Stempelblock gestartet. Aus den Extinktionsänderungen konnten die Konzentrationen an Glukosemolekülen in den Ansätzen nach folgender Formel berechnet werden:

$$\Delta c(\text{Glc}) = \frac{\Delta E \cdot \pi \cdot r^2}{\epsilon_{340}(\text{NADH}) \cdot V_E}$$

ΔE : Absolute Extinktionsänderung [dimensionslos]

r: Radius der Reaktionsräume [cm]

$\epsilon_{340}(\text{NADH})$:	Extinktionskoeffizient NADH bei $\lambda = 340 \text{ nm}$	$[\text{cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}]$
V_E :	Eingesetztes Extraktvolumen	$[\text{cm}^3]$
$\Delta c (\text{Glc})$:	Konzentrationsänderung an Glukose	$[\mu\text{mol} \cdot \text{ml Extr.}]$

2.2.5.7. Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker in Blattproben

Die Rückstände der ethanolischen Fraktionen nach dem Einengen (2.2.5.4) wurden in 200 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ mit einem Rührspatel resuspendiert, unlösliche Bestandteile 2 min bei 14.000 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$ (20.800 x g) sedimentiert. 20 μl des Überstandes wurden für die Zuckerbestimmung in den gleichen Testansätzen wie unter 2.2.5.5.4 eingesetzt. Glk6P, Glukose, Fruktose und Saccharose wurden nach (Bergmeyer, 1970) gemeinsam in einem gekoppelten optischen Test durch die sequentielle Zugabe der folgenden Enzyme bestimmt:

- 1) 50 mU Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (Roche, Mannheim)
- 2) 20 mU Phosphoglukomutase (Boehringer, Mannheim)
- 3) 0,2 U Phosphoglukoisomerase (Roche, Mannheim)
- 4) 120 U Invertase (Roche, Mannheim)

Messung und Auswertung erfolgten wie 2.2.5.5.4 beschrieben.

2.2.5.8. Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in Lösungen

Chlorophyllgehalte wurden photometrisch nach Graan und Ort (1984) in 80% Aceton bestimmt. Die zu testenden Lösungen wurden mit 80% Aceton auf 1 ml aufgefüllt, die Gefäße invertiert und 10 min im Dunkeln inkubiert. Bei Bedarf wurde Blattmaterial bekannten Frischgewichts direkt in 80% Aceton gemörsert, in 1,5 ml-Einweg-Reaktionsgefäße überführt und in gleicher Weise inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße 1 min bei 14.000 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$ (20.800 x g) zentrifugiert und 900 μl der Überstände im Photometer (LKB Novaspec II, Pharmacia, Freiburg) bei $\lambda = 645 \text{ nm}$, $\lambda = 652 \text{ nm}$ und $\lambda = 663 \text{ nm}$ in einer bei $\lambda = 663 \text{ nm}$ gegen Null abgeglichenen Küvette gemessen. Die Chlorophyllgehalte der Lösungen bzw. der Extrakte konnten mit den von Graan und Ort (1984) bestimmten Extinktionskoeffizienten berechnet werden.

2.2.5.9. Methanolische Extraktion von Pflanzengewebe

Die Auftrennung von UV-Schutzsubstanzen und ihre Extraktion wurde in Anlehnung an Weissenböck (1984) durchgeführt. *A. thaliana* Blattmaterial wurde gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Extraktion bei -80°C gelagert. Die Proben wurden in 2 bis 5 Volumen (v/w) 60% Methanol gemörsert, in 1,5 ml-Einweg-Reaktionsgefäße überführt, die Mörser mit 200 μl 60% Methanol gespült und die vereinigten Extrakte kurz anzentrifugiert. Aliquots der Überstände wurden für nachfolgende Analysen weiterverwendet und bei Bedarf bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.9.1. Auftrennung von Flavonoiden per HPLC

Die Messung erfolgte an einer Shimadzu LC-10A-Anlage (Shimadzu, Tokio, Japan) über eine Nucleosil 100-5 C_8 -Säule (125 x 4,6 mm, CS Chromatographierservice, Langerwehe) in einem binären, diskontinuierlichen Phosphorsäure/Acetonitril-Gradienten bei Raumtemperatur und einer Flussrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Die Substanzen wurden mit dem Shimadzu SPD-10A-Detektor über die Absorption bei 315 nm detektiert und mit dem Chromatopac CR-51 (Shimadzu, Tokio, Japan) quantifiziert (Voll, 2001).

2.2.5.9.2. Messung des Anthocyangehaltes in Blattproben

Die Quantifizierung von Anthocyanen erfolgte nach Rabino und Mancinelli (1986). Blattproben unterschiedlich angezogener *Arabidopsis* Pflanzen (2.2.1) wurden im zehnfachen Volumen 2% (w/v) salzsaurem Methanol aufgeschlossen, auf Eis gelagert, kurz anzentrifugiert, der Überstand 1:10 mit dem Extraktionsmedium verdünnt und die Extinktion bei $\lambda = 534 \text{ nm}$ gegen salzsaures Methanol photometrisch bestimmt (LKB Novaspec II, Pharmacia, Freiburg).

3. Ergebnisse

3.1. Heterologe Expression und Charakterisierung des Pentosephosphat/Phosphat-Translokators aus *Arabidopsis thaliana*

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass der aufgrund von Sequenzhomologien zu bekannten GPTs (Kammerer et al., 1998) als Glukose-6-phosphat/Phosphat-Translokator-homologes Protein eingestufte cDNA-Klon 121I21T7 (EST121, *accession no* T43612) aus *Arabidopsis thaliana* für ein Transportprotein kodiert. Das reife Protein wurde in *S. pombe* heterolog exprimiert und transportierte im rekonstituierten System P_a, DHAP, 3-PGA und Ru5P im Gegentausch mit [³²P]-Phosphat, nicht jedoch Glk6P, Glk1P, ADP-Glk oder Rib5P. Das Protein wurde wegen seiner Spezifität für Ru5P als RPT bezeichnet (im Folgenden wird jedoch die Bezeichnung XPT verwendet, siehe dazu 3.1.4.4). Durch vergleichende Messungen wurde gezeigt, dass der rekombinante GPT aus Erbsenwurzel ebenso Rib5P transportiert. Es konnte auch eine Transportaktivität bezüglich Pentosephosphaten über die Plastidenhüllmembranen von Spinatchloroplasten und Amyloplasten aus Maisendosperm gemessen werden (Eicks, 1998).

3.1.1. Sequenzanalysen

Das offene Leseraster kodiert für ein Protein von 417 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 45 Kilodalton (kDa). N-terminal befindet sich das hydrophile Transitpeptid, welches das Protein in die Plastidenhüllmembran dirigiert und während oder nach der Integration in die Membran proteolytisch abgespalten wird. Die Prozessierungsstelle liegt zwischen Aminosäure 75 und 85. Die Hydrophobizitätsverteilung der Aminosäuresequenz zeigt im Mittel sieben bis acht Transmembrandomänen (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>; 8.1), ein für alle PTs typischer Wert (Knappe et al., 2003a). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des XPTs mit allen anderen bekannten PTs zeigte eine geringe, aber signifikante Homologie (35-40% Identität) zu Proteinen aus der TPT- und PPT-Unterfamilie, während sich XPT und GPTs deutlich ähnlicher sind (50% Identität). Dennoch ist die Aminosäureidentität zwischen XPT und GPT aus *Arabidopsis* deutlich geringer als zwischen GPTs verschiedener

Pflanzen, wo sie 79-83% beträgt. Die Analysen legen den Schluss nahe, dass der XPT eine eigene, vierte Unterfamilie von Phosphattranslokatoren bildet. Das wird durch einen phylogenetischen Baum verdeutlicht, der mit der *distance matrix*-Methode (Saitou and Nei, 1987) erstellt wurde. Wie Abbildung 2 zeigt, gruppieren sich die Mitglieder der drei Phosphattranslokator-Unterfamilien der TPTs, PPTs und GPTs in etwa gleichen Abständen zueinander, während die XPT- zusammen mit der GPT-Unterfamilie gruppiert, jedoch früher abzweigt.

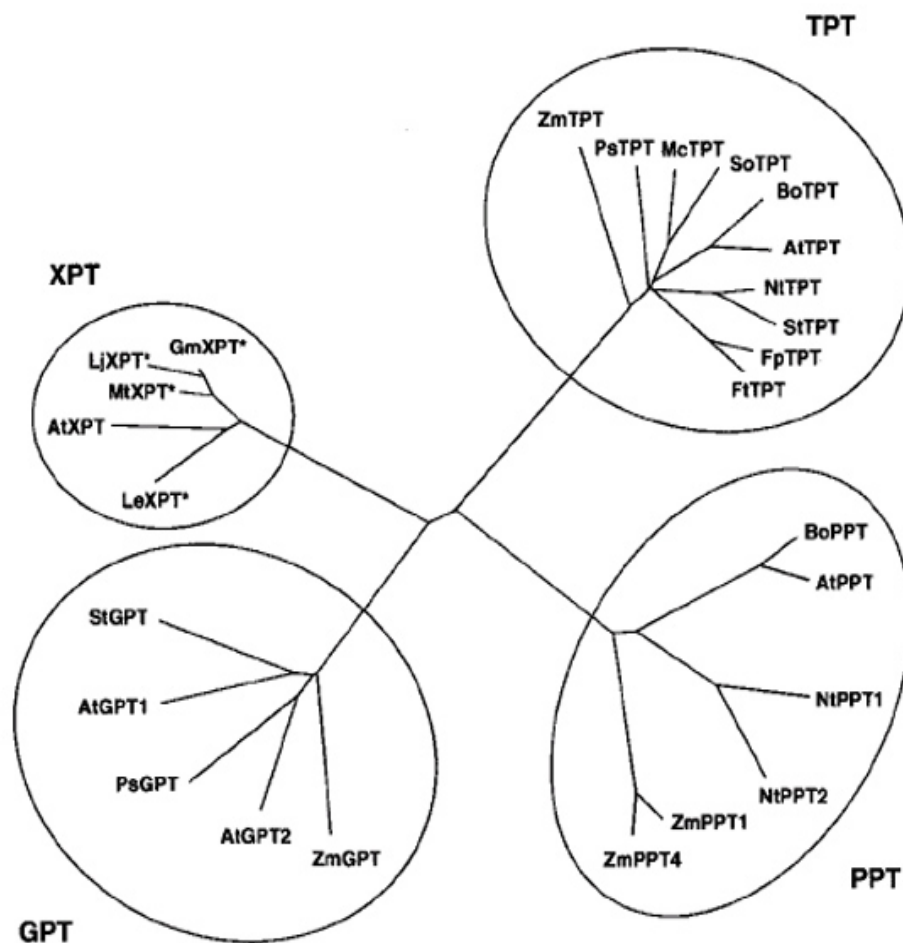


Abbildung 2. Unverwurzelter phylogenetischer Baum der Phosphattranslokatoren. Der Baum wurde mit den Programmen ClustalX (Higgins et al., 1992) und Drawtree (PHYLIP 3.752-Programmpaket) auf Basis der Aminosäuresequenzen einiger Phosphattranslokatoren erstellt. Die Bezeichnung XPT ist synonym für RPT, siehe dazu 3.1.4.4. At *Arabidopsis thaliana*, Bo *Brassica oleracea*, Fp *Flaveria pringlei*, Ft *Flaveria trinervia*, Gm *Glycine max*, Le *Lycopersicon esculentum*, Lj *Lotus japonicus*, Mc *Mesembryanthemum crystallinum*, Mt *Medicago trunculata*, Nt *Nicotiana tabacum*, Ps *Pisum sativum*, St *Solanum tuberosum*, Zm *Zea mays*. * bezeichnet EST-Sequenzen.

Abbildung 3 (nächste Seite) zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen des XPT mit GPT-Proteinen. Innerhalb der pPT-Familie gibt es, trotz der niedrigen Gesamthomologien

(s.o.), fünf Bereiche mit hoher Sequenzidentität (Kammerer et al., 1998), die auch im XPT vorkommen. Das Lys-Arg-Motiv (K₂₇₈ und R₂₇₉ bei ZmGPT, in Abbildung 3 grau unterlegt), welches in der vierten Region mit hoher Ähnlichkeit liegt, ist im XPT ebenso wie in allen anderen Phosphattranslokatoren konserviert. Dieses Dipeptid ist wahrscheinlich in die Substratbindung involviert (Fischer et al., 1994; Flügge and Heldt, 1977; Flügge and Heldt, 1979). Zusätzlich existiert ein weiterer Lysinrest, der in allen Unterfamilien konserviert ist (K₄₅ bei ZmGPT, graue Umrandungen in Abbildung 3) und im ersten Bereich hoher Sequenzidentität liegt (Knappe et al., 2003a). Die beiden Aminosäurereste jeweils direkt ober- und unterhalb des Lys-Arg-Motivs sind charakteristisch für jede Phosphattranslokator-Unterfamilie. Im Falle des GPTs und XPTs finden sich oberhalb die Aminosäuren Thr-Met, während TPTs und PPTs dort die Aminosäuren Val-Leu bzw. Cys-Val aufweisen (Kammerer et al., 1998). Unterhalb des Lys-Arg-Motivs befinden sich bei GPTs die Aminosäuren Ile-Ser, beim XPT jedoch Val-Val (fett gedruckt), ebenso wie bei den PPTs. Die TPTs haben in dieser Position die Aminosäuren Val-Phe. Das nächste Dipeptid der Sequenz, Val-Ile, ist wiederum in allen pPTs konserviert, während das folgende GPT-spezifische Val beim XPT ein Ile (fett gedruckt) ist. Inwieweit diese Aminosäure eine Rolle bei der Erkennung oder Bindung des Substrates spielt, muss noch weiter untersucht werden.

Transitpeptid

```

-70 MIPSVRLSPG PAAFS----- --GSSLRSK LPSIPS--IS SLKPSKYVVS SLKPLYLAPL DGP--RTAEL K-----SRR QPL-----EF RCS ZmGPT
-85 .S.L.QPSI SIGSDV-VL RKRHAT.IQL R.QSF.PFS. RE.SQRS... TK...H..C. GVG--NFGSV .NFESEA.FG .SD-----LV K.G PsgPT
-66 .VL..KQTLS .KIG-----LF RRNP..SLGR S.VSL.-FP. TEL.KRT.LA VS...H.S-- ----A KSP-----VW .E AtGPT1
-70 .LS.IKP.SS SFSTAISGSV RRSIPTKLKF S.LLIKNCH NQSFNAN... HQ...HISSA SN-----FK. -----V KVE AtGPT2
-82 ..SLNL-..S LNPG----- -LLHKTRTCQ Q.TRL.---A L.ITNPKPFN HRH...G.S.I PNLQI.DVSA .PLLSLITNPE SSSGFSRKKPR SIA AtXPT
    
```

Reifes Protein

	I	II	III
ZmGPT	ASAAD----- DKESKTQVVP V-QSEGAQRL KISYFATWV ALNVI---FNINYKVKVNLNAPPYP WLSTLSLAC GSAMMLFSWA TRLVEAPKTD LDFWKVLPV AVAHTIGHVA		104
PsgPT	.YE.----- --R.EVEGGD GTP.A.KKVV---.....Y..... .L..I... .IA..... .E..T.....		103
AtGPT1	.YE...--RSE PHPIGDDAAAETK..A.KK.V---.....Y..... .L..I... .I..T... FD...T.....		109
AtGPT2	.YE...--RSR PLDINIELPD E-..K. .G..... .V..V..V..... .L..... .IAD..... .E..T.....		108
AtXPT	.VGSS--DSN PD.KSDLGFA EKKEKAKT. .LGIV.GL.Y FQ.IV---.F..A.V... .LASFQ.FA .IW.VL.S FK.YPC..IS KP.IIA.LGP .LF.....IS		109
	IV	V	
ZmGPT	ATVMSKVVAV SFTHIIKSAE PAFSVLVS RF FLGTFPIPV YLSLLPIIGG CALAAVTELN FNMVGFMGAM ISNLAVFVRN IFSKRGM-KGKSVSGMNYACLS IMSLVILTFP		216
PsgPTG.....G.....I.....V.....I.....I..... .I..... .I..... .L..A.....		215
AtGPT1G.....G.....I.....TS.....I.....S..... .I..... .I..... ML..L.....		221
AtGPT2G.....G.....M.....L..... .M..... .I..... .K..... M.....		221
AtXPT	.C..F..... .V.....V..... .V...IF.S- L.DSY.LA. W.I...VM. .S.....VS .LG.LS... .VG..L... .SLQSF.EID.L.L.G... .L..LV.F.V		221
	VI	VII	
ZmGPT	AIAMEGPQMW AAGWQKALAE VGP-NVVM-WIAAQSVFHYLHLY NOVSYMSLDQ ISPLTFSIGN TMRKRISVIVS SIIIFHPVR AVNALGAAIA ILGTFLYS--		317
PsgPTA.....T..S. I.-Q...-V...I.....I.....E..... .I..... .I..... .I..... .I..... .I..... .I.....		316
AtGPT1	.V.....V.....VD...T...T...Q...-V..V..V..... .V..... .V..... .V..... .V..... .V..... .V.....		322
AtGPT2	S.V..... .N.VSQF...-V..V..V..... .V..... .V..... .V..... .V..... .V..... .V.....		306
AtXPT	..FV..SH-. VP.YH..I.S ..TPSTTFYF.VLLSG..... .S..QA..EV... ..V...I. TVLV.RN... PL.....S... .C.....QATAKKKKIEVGGDKKN		335

Abbildung 3. Aminosäuresequenzvergleich des XPT mit verschiedenen GPTs. Die GPT-Sequenzen sind: Zm *Zea mays* (accession no AF020813), Ps *Pisum sativum* (AF020814), At *Arabidopsis thaliana* (AtGPT1, At5g54800; AtGPT2, At1g61800). Aminosäure-Identitäten zwischen den Translokatoren sind durch Punkte gekennzeichnet. Die Nummerierung beginnt mit dem ersten Aminosäurerest des reifen Proteins. Bindestriche zeigen Lücken an, die eingefügt wurden, um den Vergleich zu optimieren. Die Lage der sieben statistisch wahrscheinlichsten Transmembrandomänen ist durch Linien gekennzeichnet (I-VII). Graue Umrandungen markieren konservierte Aminosäurereste (K₄₅ und K₂₇₈R₂₇₉ in ZmGPT).

3.1.2. Expression in *Schizosaccharomyces pombe*

Die Expression plastidärer Phosphattranslokatoren ist im System *S. pombe* etabliert und bereits ausführlich beschrieben worden (Fischer et al., 1997; Kammerer et al., 1998; Loddenkötter et al., 1993). *S. pombe* zeigt eine drei- bis fünffach höhere Expressionsrate im Vergleich mit *S. cerevisiae* (Loddenkötter, 1996), so dass der bereits früher verwendete Expressionsklon des XPTs (Eicks, 1998) in der vorliegenden Arbeit weiterverwendet wurde. Die Experimente zur Untersuchung der Substratspezifitäten waren mit den Gesamtmembranfraktionen (2.2.4.1) transgener Spaltheferzellen durchgeführt worden, auch gab es einen Versuch zur Aufreinigung des heterolog exprimierten Proteins über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatografie unter denaturierenden Bedingungen. Zur weiteren Charakterisierung des Proteins, insbesondere im Hinblick auf die kinetischen Eigenschaften des Proteins und eine Überprüfung der Substratspezifitäten wurde eine Aufreinigung unter nativen Bedingungen (2.2.4.1) als Voraussetzung angesehen.

3.1.3. Aufreinigung des heterolog exprimierten Proteins über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatografie

Die native Aufreinigung von heterolog exprimiertem Protein mittels Metallchelat-Absorptionsharz wurde erstmals von Jahnknecht et al. (1991) gezeigt und bald darauf auch für die stark hydrophoben Phosphattranslokatoren etabliert (Loddenkötter et al., 1993). Die Methode beruht auf den Affinitätseigenschaften von Oligohistidinresten zu zweiwertigen Metallkationen wie Ni²⁺. Da dem rekombinanten EST121-Protein N-terminal ein sogenannter *his-tag* aus sechs aufeinander folgenden Histidinresten angefügt worden war, konnte diese Methode hier Anwendung finden. Ausgehend von der Gesamtmembranfraktion einer Hefekultur wurde die Reinigung wie unter 2.2.4.1 beschrieben durchgeführt. In Vorversuchen wurde mit kleineren Volumina im *batch*-Verfahren getestet, wie sich das Protein auf dem Säulenmaterial verhält. Dazu wurde mit Puffern steigender Konzentrationen an Imidazol gewaschen, um das Elutionsverhalten des Proteins zu untersuchen. Diese Experimente zeigten, dass Waschungen mit Konzentrationen von bis zu 50 mM Imidazol geeignet waren, das meiste unspezifisch gebundene Protein zu entfernen, ohne das heterolog exprimierte Protein zu eluieren. Die

Elution des XPTs erfolgte schließlich mit 150 mM Imidazol in einem möglichst kleinen Volumen (Abbildung 4).

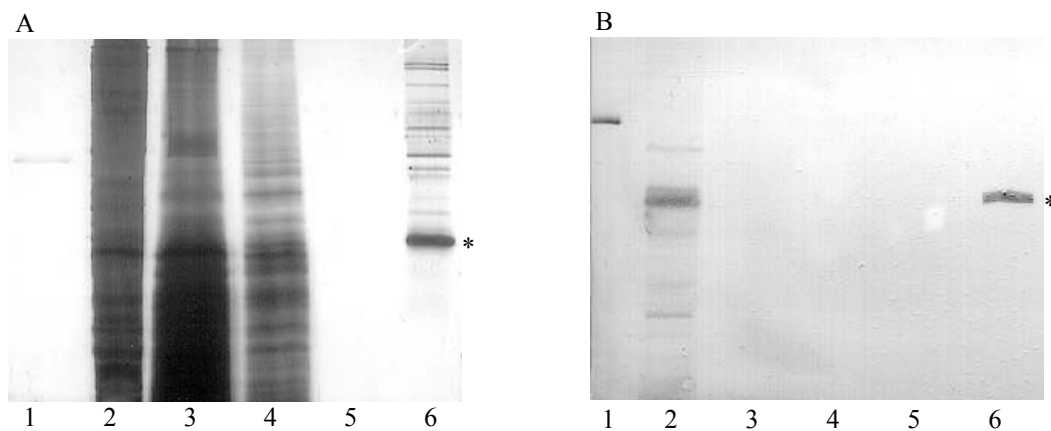


Abbildung 4. Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatografie (2.2.4.1) der Membranfraktion eines XPT exprimierenden *S.pombe*-Klones. A: SDS-Polyacrylamidgel (2.2.4.2), Färbung mit Silbernitrat (2.2.4.4). B: *Western-Blot* ebendieses Gels (2.2.4.5) Detektion mit Anti-His₅-Antikörper (2.2.4.6). Spur 1: Positivkontrolle (His₆-Hexokinase). Spur 2: Gesamtmembranfraktion. Spur 3: Überstand nach Bindung an das Säulenmaterial. Spur 4: Waschung mit 35 mM Imidazol. Spur 5: Waschung mit 50 mM Imidazol. Spur 6: Elution des heterolog exprimierten Proteins mit 150 mM Imidazol. * markiert ein Molekulargewicht von etwas über 36 kDa.

In Spur 1 (Abbildung 4, A und B) erkennt man eine schwache Bande der Positivkontrolle. Hierbei handelt es sich um eine mit einem *his-tag* versehene, heterolog exprimierte Hexokinase aus Spinat von ca. 49 kDa Masse (Wiese, 2000). Die Proteinkonzentration ist in Spur 2, der Gesamtmembranfraktion, am höchsten; daher ist diese Spur überfärbt. Gleiches gilt für den Überstand nach Bindung an das Säulenmaterial. Die nachfolgenden Waschungen entfernen nahezu sämtliches, unspezifisch gebundenes Hefeprotein; bei der Waschung mit 50 mM Imidazol (Spur 4 in B) ist bereits kein Protein mehr detektierbar. Die Elution zeigt neben der prägnanten Bande des heterolog exprimierten XPTs bei ca. 36 kDa noch einige Kontaminationen an Hefeprotein, die sich im weiteren experimentellen Verlauf als nicht störend erwiesen. Das Vorhandensein und die Schärfe dieser Banden im Gel zeigt jedoch, dass während des Zellaufschlusses und der nachfolgenden Affinitätschromatografie kein nennenswerter Proteinabbau stattgefunden hat. Der *Western-Blot* (B) zeigt in Spur 1 die Positivkontrolle, die ein deutliches Signal bei ca. 50 kDa gibt. In Spur 2 ist ein dominantes Signal zu erkennen, welches den XPT mit einem Molekulargewicht von 36 kDa anzeigt. Die folgenden Fraktionen sind nicht positiv, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der XPT quantitativ an das Säulenmaterial gebunden hat. Erst in der Elutionsfraktion (Spur 6) findet sich das XPT-Protein wieder, in Übereinstimmung mit der Coomassie-Färbung des Proteingels (A). Diese

hochangereicherte XPT-Fraktion konnte direkt in Liposomen rekonstituiert werden (2.2.5.3.3).

3.1.4. Transportversuche mit gereinigtem, nativem Protein

3.1.4.1. Bestimmung der optimalen Proteinmenge

Um die für Transportversuche optimale Menge an gereinigtem, nativem Protein zu bestimmen, wurden zunächst unterschiedliche Eluatvolumina der Ni^{2+} -Affinitätschromatografie (2.2.4.1, 3.1.3) in mit anorganischem Phosphat vorbeladenen Liposomen rekonstituiert (2.2.5.3.3) und der homologe Austausch gegen radioaktiv markiertes Phosphat gemessen (2.2.5.3.4). Parallel dazu wurden Proteinbestimmungen durchgeführt (Abbildung 5).

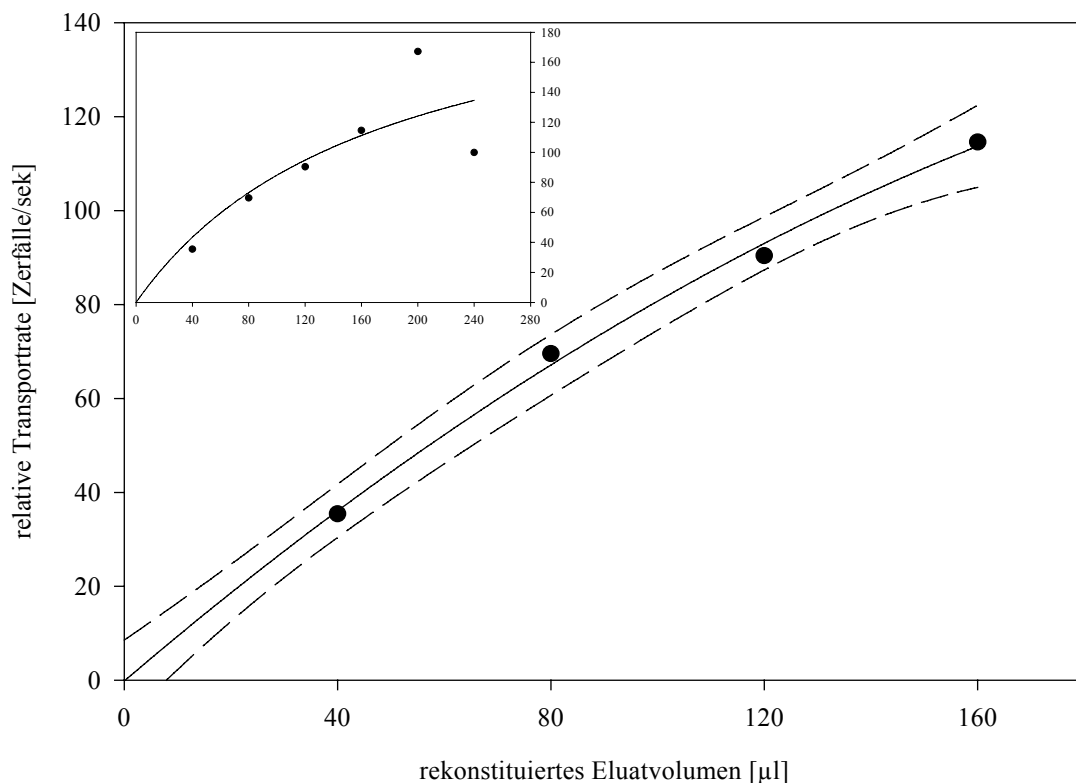


Abbildung 5. P_a -Transportrate in Abhängigkeit vom rekonstituierten Eluatvolumen. Es wurden unterschiedliche Eluatvolumina, und damit auch Proteinmengen, rekonstituiert. Ein Volumen von 40 µl entsprach etwa 2 µg Protein. Eingesetztes Diagramm: Übersicht über den gesamten getesteten Volumenbereich. Oberhalb 200 µl Rekonstitutionsvolumen (~ 10 µg Protein) deutet sich ein hyperbolischer Verlauf an. Großes Diagramm: Detail aus dem unteren Volumenbereich bis 160 µl Rekonstitutionsvolumen. In diesem Bereich besteht eine recht gute Linearität zwischen Proteinmenge und Transportrate. Durchgehende Linie: Regressionsgerade. Gestrichelte Linien: 95% Konfidenzbereich der Regression ($R^2=0,98$).

Wie Abbildung 5 zeigt, ist bei kleineren Rekonstitutionsvolumina bis 160 μl (entsprechend ca. 8 μg Protein) eine gute Linearität zwischen Proteinmenge und Transportrate gegeben. Oberhalb 200 μl schwanken die Werte zu stark und lassen keine deutliche Aussage zu. Aufgrund der recht stabilen Expressionsrate der XPT-exprimierenden Hefen und der darauf standardisierten und immer wieder überprüften Affinitätsreinigung wurde das eingesetzte Eluatvolumen für die weiteren Transportversuche auf 120 μl , also ca. 6 μg Protein, festgelegt. Eine weitere Kontrolle ergab sich durch die Transportversuche selbst, da bei immer gleich eingesetzter spezifischer Aktivität die Aufnahmearten selbst als zusätzliche Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinmenge dienen. An dieser Stelle sei noch erwähnt, dass Untersuchungen der pH-Abhängigkeit des P_a -Gegentausches durchgeführt wurden. Dazu wurde der Liposomen-interne pH-Wert auf 5 bzw. 7,8 eingestellt. Es stellte sich heraus, dass bei niedrigerem pH-Wert die relative Transportrate um ca. 50% verringert ist.

3.1.4.2. Untersuchung der Sättigung des homologen Phosphattransportes

Obwohl der Reaktionsmechanismus des TPT seit längerem bekannt war (Flügge, 1992) und auch einige andere Mitglieder der Phosphattranslokatorenfamilie biochemisch charakterisiert worden waren (Fischer et al., 1994; Kammerer et al., 1998; Loddenkötter et al., 1993), sollte im Falle des XPT getestet werden, ob bei steigender Substratkonzentration eine Sättigung der Reaktionsgeschwindigkeit auftritt und auch dieses Protein einer Michaelis-Menten-Kinetik (8.2.1) folgt. Dazu wurden externe P_a -Endkonzentrationen von 0,1 bis 5 mM eingestellt, während die Konzentration des internen Substrats (ebenfalls P_a) konstant bei 30 mM gehalten wurde (2.2.5.3.4). Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 6 dargestellt. Sie zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit $[v]$ von der Substratkonzentration $[S]$. Die eingefügte Regressionskurve (durchgehende Linie) zeigt eine Sättigung, wie sie für eine Reaktion, die einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt, typisch ist. Der lineare Bereich, in dem $[v]$ proportional zu $[S]$ ist, liegt zwischen 0,1 und ca. 0,4 mM P_a . Für die weiteren Messungen, z.B. zur Substratspezifität (3.1.4.4), wurde daher immer eine externe P_a -Konzentration von 0,25 mM eingestellt um Aufnahmearten im linearen Bereich zu messen.

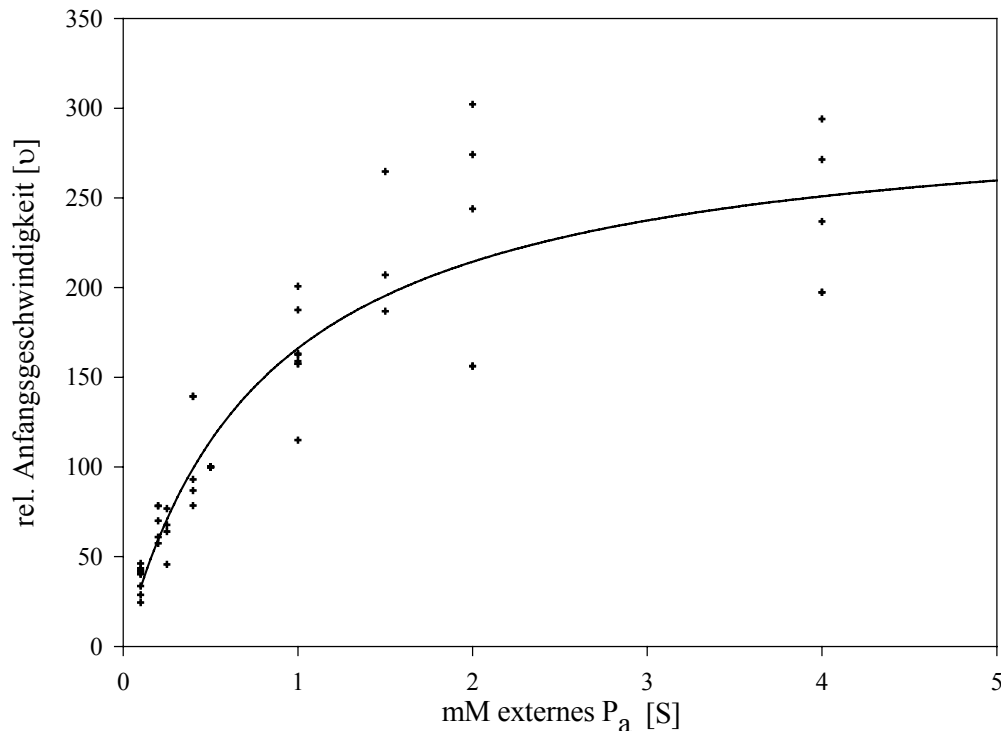


Abbildung 6. Grafische Darstellung der relativen Anfangsreaktionsgeschwindigkeit [v] in Abhängigkeit von der Substratkonzentration [S]. Es wurden externe P_a-Konzentrationen von 0,1 bis 5 mM vorgelegt. Die interne P_a-Konzentration blieb konstant bei ca. 30 mM. Der hyperbolische Verlauf der Regression zeigt, dass der XPT einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt.

3.1.4.3. Ermittlung der Michaelis-Konstante für anorganisches Phosphat

Auf der Basis der unter 3.1.4.2 durchgeführten Versuche war es möglich die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) des XPT für P_a zu ermitteln. Der K_M -Wert entspricht der Substratkonzentration bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht. Die einzelnen Transportexperimente wurden doppelt-reziprok in sogenannten *Lineweaver-Burk*-Diagrammen ausgewertet. Man trägt dabei $1/[v]$ gegen $1/[S]$ auf und erhält eine Gerade, deren x-Achsenschnittpunkt den Wert für $-1/K_M$ liefert (Segel, 1968). Abbildung 7 zeigt exemplarisch die Auswertung eines Experiments. Das Gesamtergebnis der K_M -Bestimmungen ist zusammen mit den bereits bekannten K_M -Werten anderer Phosphattranslokatoren in Tabelle 1 aufgeführt.

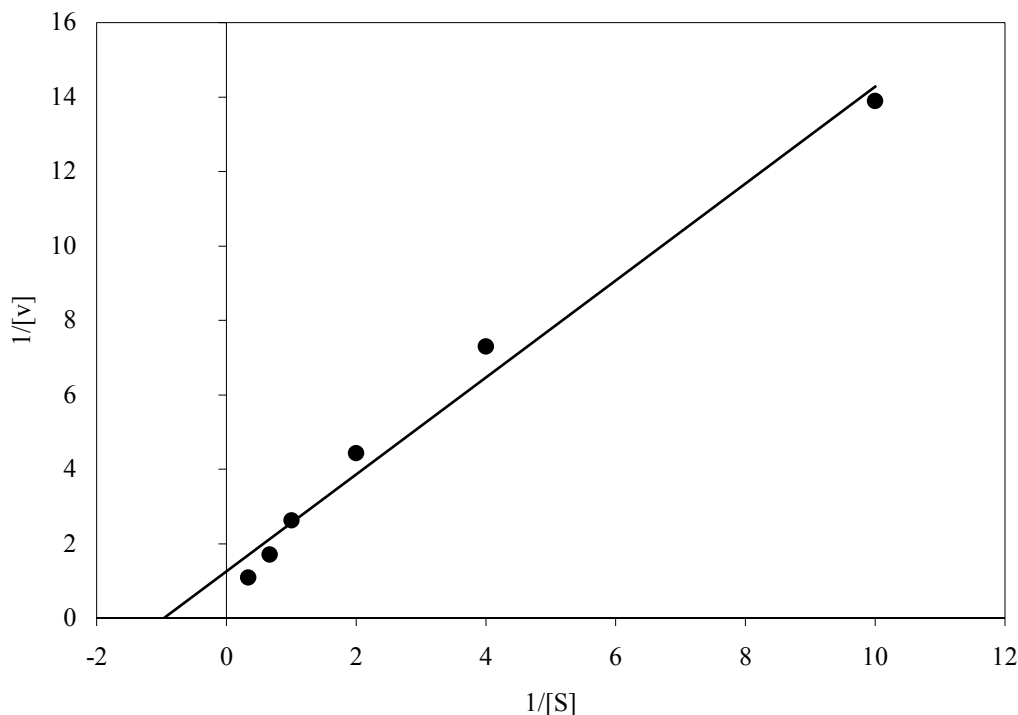


Abbildung 7. Lineweaver-Burk-Diagramm eines Experiments. Darstellung von $1/[v]$ gegen $1/[S]$. Die eingefügte Regressionsgerade schneidet die x-Achse bei dem Wert für $-1/K_M$. Die Geradengleichung (8.2.1) zur rechnerischen Bestimmung von $-1/K_M$ lautet $y = 1,3021 x + 1,2656$ ($R^2=0,9854$). Der sich hieraus ergebende Wert für K_M ist 1,03 mM (Tabelle 1).

Phosphattranslokator	$K_M P_a$ [mM]
cXPT	$1,0 \pm 0,2$
cTPT ^a	$1,0 \pm 0,3$
cPPT ^a	$0,8 \pm 0,1$
cGPT ^b	$1,1 \pm 0,1$

Tabelle 1. Vergleich der K_M -Werte für P_a verschiedener Phosphattranslokatoren. cXPT aus *A. thaliana*, cTPT aus Spinatblatt, cPPT aus Blumenkohlinfloreszenz, cGPT aus Erbsenwurzel. ^a Daten aus Fischer et al. (1997), ^b Daten aus Kammerer et al. (1998). Das den Phosphattranslokatornamen vorangestellte c steht für rekombinant exprimiertes Protein. Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

Es zeigte sich, dass der K_M für P_a des XPT mit denen der anderen Phosphattranslokatoren übereinstimmt. Dies belegt, dass alle Translokatoren gleichermaßen gut P_a als Substrat akzeptieren.

3.1.4.4. Messung der Substratspezifität

Die bisherigen Messungen zur Bestimmung der Substratspezifität erfolgten mit Gesamtmembranprotein transgener Hefezellen (2.2.4.1; Eicks, 1998). Diese Vorgehensweise bot sich aufgrund ihrer direkten Durchführbarkeit an. Die Ergebnisse solcher Messungen reichen aus, um Aussagen über Substratspezifitäten zu treffen (Loddenkötter, 1996; Loddenkötter et al., 1993). Um jedoch exakte Umsatzraten bestimmen zu können, ist eine nahezu homogene Reinigung des betreffenden Proteins aus den Gesamtmembranen (2.2.4.1) vorzuziehen. Es ist mehrfach gezeigt worden, dass die mit Hefe-Gesamtmembranen gemessenen exakten Transportraten zum Teil erheblich von denen mit gereinigtem Protein oder isolierten Plastiden gemessenen abweichen können (Fischer et al., 1994; Loddenkötter et al., 1993). So werden durch Untersuchungen der Substratspezifität mit gereinigtem Protein die Transportraten der Messungen mit Gesamtmembranen korrigiert, die besonders im Bereich von 30% und darunter (relativ zum 100% gesetzten Phosphataustausch) voneinander abweichen können (B. Kammerer, U.-I. Flügge, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund wurden die bereits als Substrate identifizierten Metabolite erneut getestet. Zusätzlich wurden Transportversuche mit Xylulose-5-phosphat (Xu5P) durchgeführt. Neben Ru5P und Rib5P ist Xu5P das dritte Pentosephosphat, das im OPPP gebildet wird, und wurde deshalb auch als mögliches Substrat in Betracht gezogen. Tabelle 2 zeigt den Vergleich der Transportraten miteinander, zusätzlich sind die Werte für den rekombinanten GPT aus Erbsenwurzel angegeben. Während die XPT-Transportraten für 3-PGA, PEP, Ery4P, Rib5P und Glk6P innerhalb der Messungenauigkeiten gleich bleiben, ist die Transportrate für DHAP mit gereinigtem Protein deutlich höher (von 47% auf 88%). Interessant jedoch ist die deutliche Abnahme der Transportrate für Ru5P von 66% auf 28%, und die Tatsache, dass Xu5P gleich gut transportiert wird wie DHAP (81%). Diese Beobachtung führte dazu, dass die ursprüngliche Bezeichnung RPT (von Ru5P) zugunsten von XPT (Xu5P) aufgegeben wurde. Neben P_a transportiert das gereinigte Protein DHAP, 3-PGA und Xu5P mit den höchsten Raten, gefolgt von Ru5P und Ery4P. Kaum oder gar nicht transportiert werden PEP, Rib5P und Glk6P. Auch mit den ebenfalls getesteten Metaboliten PPi, Glk1P, Fru6P, 6-PG und ADP-Glk zeigte sich keinerlei Transportaktivität. Glk1P und Fru6P werden auch vom rekombinanten GPT nicht transportiert (nicht gezeigt). Dagegen ist dieser in der Lage, alle drei getesteten Pentosephosphate zu transportieren.

Substrat ^a	relative Transportrate [%] ^b		
	XPT- Gesamtmembranen	XPT- Ni ²⁺ -NTA Eluat	GPT- Ni ²⁺ -NTA Eluat ^c
P _a	= 100	= 100	= 100
3-PGA	58 ± 11	69 ± 10 ^d	50 ± 1
DHAP	47	88 ± 12	112 ± 5
PEP	10 ± 1	10 ± 1	20 ± 1
Ery4P	29 ± 15	34 ± 5	28 ± 8 ^e
Ru5P	66 ± 26	28 ± 4	53 ± 6 ^e
Xu5P	n. d. ^f	81 ± 8	54 ± 12 ^e
Rib5P	12 ± 10	2 ± 0	29 ± 0 ^e
Glk6P	9 ± 5	6 ± 2	90 ± 9

Tabelle 2. Substratspezifitäten mit Gesamtmembranen und gereinigtem Protein im Vergleich. Die Versuche wurden wie unter 2.2.5.3 beschrieben durchgeführt. ^a Liposomen wurden mit den angegebenen Substraten (30 mM) vorbeladen. ^b Die Transportraten sind relativ zum 100% gesetzten Phosphataustausch angegeben. Die 100%-Aktivitäten der rekombinanten, aufgereinigten Proteine in $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$: 1,4 (XPT) und 1,2 (GPT). Messwerte sind abzüglich der Kontrollen (2.2.5.3.3) angegeben. ^c Daten aus Kammerer et al (1998). ^d Mögliche Substratspezifitäten des XPT fett gedruckt. ^e Daten aus zwei bis drei (ansonsten fünf) unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. ^f *not determined*, nicht bestimmt.

3.1.4.5. Konkurrenzexperimente und K_i -Werte

Da die Messungen der Substratspezifitäten mit sättigenden Konzentrationen an internem Liposomensubstrat durchgeführt wurden, sagen die Transportraten noch nichts über die Affinitäten der einzelnen Metabolite zum Transportprotein aus. Ein Maß dafür stellt der K_i -Wert dar. K_i ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Kompetitor bzw. -Inhibitor-Komplexes und ihr Kehrwert ($1/K_i$) die Affinitätskonstante. Je kleiner demnach der Wert für K_i ist, desto größer ist die Affinität des Kompetitors (bzw. Inhibitors) zu dem Enzym. Dabei beeinflussen die Substratkonzentration [S], die Kompetitor (Inhibitor)-Konzentration [I] und ihre jeweiligen Affinitäten (K_M bzw. K_i) die Stärke der Konkurrenz. Die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion wird durch einen kompetitiven Inhibitor nicht

verändert (Segel, 1968). Experimentell lässt sich K_i durch Wettbewerbsversuche bestimmen. Bietet man mit P_a vorbeladenen Proteoliposomen gleichzeitig mit dem externen, radioaktiv markierten P_a ein zweites Substrat an, so wird dieses um die Bindung an und den Transport durch den Phosphattranslokator konkurrieren. Man beobachtet eine mehr oder weniger große Beeinträchtigung des homologen Phosphataustausches durch das zweite Substrat, je nachdem wie hoch seine Affinität zum Protein ist. Um zu testen, wie stark die unter 3.1.4.4 in Tabelle 2 aufgeführten möglichen Hauptsubstrate den homologen P_a -Gegentausch des XPT behindern, wurden Wettbewerbsversuche mit steigenden externen Konzentrationen (0,5 bis 4 mM) dieser Metabolite durchgeführt. Die interne und externe P_a -Konzentration (30 bzw. 0,25 mM) wurde dabei nicht variiert (Abbildung 8).

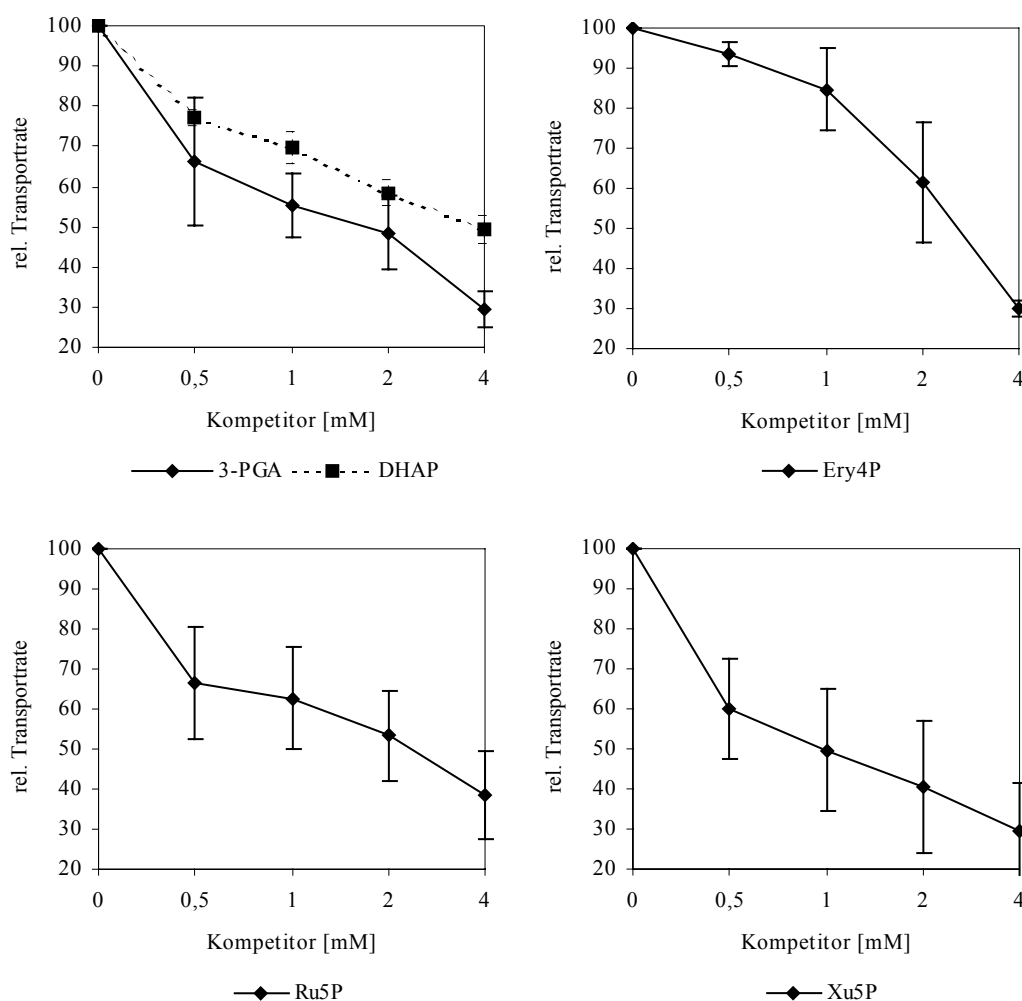


Abbildung 8. Wettbewerbsversuche mit unterschiedlichen Substraten des XPT. Dargestellt ist die relative P_a -Gegentauschrate in Abhängigkeit von der Konzentration (0,5 bis 4 mM) des jeweiligen Kompetitors. Die Werte sind jeweils relativ zur P_a -Transportrate ohne externen Kompetitor angegeben, die gleich 100% gesetzt wurde. Daten aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

Alle fünf getesteten Metabolite üben kompetitive Effekte auf den P_a -Gegentausch aus, wobei die Einzelwerte jedoch stark variieren. Die C_3 -Metabolite DHAP und 3-PGA zeigen ähnliche Effekte, wenn auch die Werte für 3-PGA stärker schwanken. Eine halbmaximale Reduktion des P_a -Austausches erreicht man mit 3-PGA ab ca. 1,5 mM, mit DHAP erst ab ca. 4 mM. Den stärksten Effekt erzielt Xu5P, das bereits bei einer externen Konzentration von 1 mM eine Reduktion der P_a -Transportrate auf 50% bewirkt. Ru5P zeigt einen ähnlichen Effekt, aber schwächer (halbmaximale Reduktion ab 2 mM). Ery4P wirkt erst ab einer Konzentration von über 1 mM deutlich auf den P_a -Austausch und reduziert diesen ab ca. 3 mM auf 50%. Auf dieser Basis wurden nun weitere Wettbewerbsversuche durchgeführt, um die K_i -Werte der einzelnen Metabolite zu bestimmen. Dazu wurde, wie bei den Messungen des K_M -Wertes (3.1.4.3), bei konstanter interner Konzentration (30 mM) die Konzentration des externen P_a variiert, und zwar in zwei Versuchsreihen mit bzw. ohne Zugabe des Kompetitors. Es wurde dabei in etwa die Kompetitor-Konzentration gewählt, die in den oben beschriebenen Wettbewerbsversuchen (Abbildung 8) eine halbmaximale Reduktion des P_a -Gegentausches bewirkte. Im Falle von Substraten, mit denen sich kaum Transportaktivität zeigte, wurden höhere Konzentrationen eingesetzt. So wurde z.B. bei Glk6P eine Konzentration von 5 mM gewählt, wodurch eine leichte Beeinträchtigung des P_a -Gegentausches erreicht werden konnte. Bei Auftragung von $1/[v]$ gegen $1/[S]$ für beide Versuchsreihen erhält man neben dem Wert für K_M (aus der Versuchsreihe ohne Kompetitor) einen apparenten K_M -Wert, der sich aus der Versuchsreihe mit Kompetitor ergibt. Mit Kenntnis der beiden Werte und der Kompetitor-Konzentration kann der K_i -Wert rechnerisch nach folgender Formel (Segel, 1968; 8.2.2) bestimmt werden:

$$K_{M(app)} = K_M \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right]$$

Die folgende Tabelle 3 zeigt die Gesamtergebnisse der K_i -Wert-Bestimmungen des rekombinanten XPT für verschiedene Metabolite.

Substrat (Kompetitor)	Kinetische Konstanten des P _a -Transportes ^a
	K_M (app) [mM] 1.0 ± 0.2
	K_i (app) [mM]
DHAP	0.4^b ± 0.1
3-PGA	10.6 ± 2.9
PEP	2.1 ± 0.2
Ery4P	3.3 ± 0.5
Rib5P	22 ± 1
Ru5P	3.5 ± 0.3
Xu5P	0.8 ± 0.1
Glk6P	66 ± 7

Tabelle 3. K_M (P_a) und K_i -Werte des rekombinanten XPT für verschiedene Metabolite. ^a Die Transporte wurden wie unter 2.2.5.3 und 3.1.4.5 beschrieben durchgeführt. ^b sehr niedrige K_i -Werte (und damit hohe Affinitäten des Kompetitors zum XPT) sind fett gedruckt. Daten aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

Wie aufgrund der guten Transportraten (3.1.4.4) von DHAP ($88 \pm 12\%$) und Xu5P ($81 \pm 8\%$) zu erwarten war, zeigen die jeweiligen K_i -Werte, dass beide Metabolite eine hohe Affinität zum XPT haben und die besten Substrate für diesen Phosphattranslokator darstellen. Die niedrigen Konzentrationen, die in beiden Fällen ausreichen, um mit dem P_a-Gegentausch zu konkurrieren, lassen vermuten, dass sie auch unter physiologischen Bedingungen transportiert werden. Überraschenderweise ist der K_i -Wert für 3-PGA recht hoch, was angesichts der guten Transportrate ($69 \pm 10\%$) und des deutlichen Kompetitionsverhaltens verwundert. Im Falle von PEP steht eine sehr geringe Transportrate ($10 \pm 1\%$) einer vergleichsweise hohen Affinität zum XPT gegenüber. Die mittelmäßigen Transportraten von Ery4P und Ru5P (34 ± 5 bzw. $28 \pm 4\%$) schlagen sich wiederum in ihren K_i -Werten von über 3 mM nieder. Im Falle von Rib5P und Glk6P sind sowohl die Transportraten ($2 \pm 1\%$ bzw. $6 \pm 2\%$) als auch die Affinitäten zum XPT schlecht, was den Transport von beiden durch den XPT *in vivo* ausschließt. Der XPT ist also ein plastidärer Phosphattranslokator, der vor allem P_a, DHAP und Xu5P transportiert, nicht jedoch Glk6P oder andere Hexosephosphate.

3.1.5. Datenbank-Recherche nach OPPP-Enzymen im Genom von *Arabidopsis thaliana*

Ru5P ist eines der Produkte des oxidativen Teils des OPPP (2.2.5.5.3). Im Laufe des nicht-oxidativen Teils wird es durch die Aktivität der Ribose-5-Phosphat Isomerase (RPI) zu Rib5P und durch die D-Ribulose-5-Phosphat 3-Epimerase (RPEase) zu Xu5P umgesetzt. Beide Pentosephosphate werden danach durch die Enzyme Transketolase (TK) und Transaldolase (TA) zu Triose- und Hexosephosphaten umgesetzt. Im Gegensatz zu Spinat (Schnarrenberger et al., 1995) und anderen Pflanzen (Debnam and Emes, 1999) lagen für *A. thaliana* keine Informationen über die Verteilung dieser Enzyme und damit das Ausmaß des OPPP in Cytosol und Plastiden vor. Daher wurde eine Analyse der *GenBank*-Datenbank (Benson et al., 2002) unternommen, durch die mögliche Gene der Enzyme RPI, RPEase, TK und TA aus *Arabidopsis* identifiziert werden sollten. Grundlage dieser Suche ist u.a. die Tatsache, dass alle bisher identifizierten und charakterisierten stromalen Proteine, wie z.B. die Enzyme des Calvin-Zyklus oder des Shikimatwegs (Schmid und Amrhein, 1995), N-terminale Transitsequenzen besitzen, die ihren Import in dieses Kompartiment gewährleisten (May and Soll, 1999). Daher unterscheidet das Vorhandensein eines solchen Transitpeptids ein plastidäres von einem cytosolischen Protein. Die Vorhersage über die Lokalisierung eines Proteins ist heute mit hoher Sicherheit *in silico* möglich (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>; 8.3).

3.1.5.1. D-Ribulose-5-Phosphat 3-Epimerasen

Im Genom von *Arabidopsis* findet sich sehr wahrscheinlich ein Gen, das für eine plastidäre Isoform dieses Enzyms kodiert (At5g61410) sowie zwei Gene, die für cytosolische Isoformen kodieren (At3g01850 und At1g63290). Darüber hinaus gibt es eine große Anzahl ESTs aus einer Vielzahl höherer Pflanzen. Offensichtlich besitzen die meisten, wenn nicht alle Pflanzen, cytosolische RPEasen.

3.1.5.2. Ribose-5-Phosphat Isomerasen

Das Genom von *Arabidopsis* enthält drei verschiedene Gene, die für RPIs kodieren (At1g711100, At2g01290 und At3g04790). Die letztere dieser Isoformen ist wahrscheinlich plastidär, denn sie besitzt eine Transitsequenz und zeigt zudem noch eine sehr hohe Homologie zur plastidären RPI aus Spinat (Martin et al., 1996). Eine weitere, vermutlich plastidäre Isoform wurde 2003 von Kruger und von Schaewen postuliert (At5g44520). Die zwei übrigen sind vermutlich cytosolisch, da sie kein erkennbares Transitpeptid besitzen. Obwohl experimentelle Daten dafür noch ausstehen, kann man annehmen, dass RPI-Aktivitäten im Cytosol von *Arabidopsis* vorkommen.

3.1.5.3. Transketolasen

In *Arabidopsis* gibt es zwei sehr homologe Gene, die für plastidäre Isoformen der TK kodieren (At2g45200 und At3g60750). Beide zeigen eine sehr hohe Homologie zur plastidären TK aus Spinat (Flechner et al., 1996). Cytosolische Formen des Enzyms konnten bisher nicht nachgewiesen werden.

3.1.5.4. Transaldolasen

Das Genom von *Arabidopsis* enthält offensichtlich zwei Gene, die für plastidäre TA kodieren (At1g12230 und At5g13420). Die kodierten Proteine sind sehr verschieden, tragen aber beide plastidäre Transitpeptide. Cytosolische Isoformen fehlen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in *Arabidopsis thaliana* der cytosolische OPPP sehr wahrscheinlich bis zur Stufe der isomeren Pentosephosphate Ru5P, Rib5P und Xu5P ablaufen kann, jedoch nicht weiter.

3.1.6. Transportversuche mit Gesamtprotein aus *Arabidopsis thaliana*

Die bisherigen Untersuchungen ließen auf eine möglicherweise wichtige Funktion des XPT bei der Kommunikation zwischen cytosolischem und plastidärem OPPP schließen. Eine weitere Überlegung war, dass der plastidäre OPPP unterstützende Funktionen haben könnte, wenn z.B. ein erhöhter Bedarf an Shikimatweg-Derivaten besteht. Der Shikimatweg hängt von der Verfügbarkeit von PEP und Ery4P ab (Herrmann and Weaver, 1999; Schmid and Amrhein, 1995). Letzteres könnte vom OPPP zur Verfügung gestellt werden, wenn eine zusätzliche Versorgung des plastidären OPPP mit Xu5P aus dem Cytosol gewährleistet wäre. Bei Zuckerfütterung beispielsweise werden in *Arabidopsis* vermehrt Stärke und Anthocyane gebildet und in den Blättern akkumuliert (Tsukaya et al., 1991). Dieses Syndrom tritt ebenfalls bei Staunässe auf (Voll, 2001). Eine massive Akkumulation von Anthocyanen als Produkten des Shikimatwegs könnte so dazu führen, auch einen erhöhten Bedarf an den Ausgangsmetaboliten PEP und Ery4P zu schaffen. Damit wäre die Voraussetzung für eine unterstützende Reaktion des plastidären wie cytosolischen OPPP gegeben, die eine erhöhte Aktivität des XPT beinhalten könnte. Auf dieser Basis sollten die Transportaktivitäten *in planta* untersucht werden. Dazu wurde Blattgesamtprotein von *Arabidopsis* (Ökotyp Col-0) isoliert und rekonstituiert (2.2.5.3.2). Die Pflanzen wurden in der Klimakammer (2.2.1.2) unter normalen Bedingungen bzw. unter anaerobem Stress durch Staunässe angezogen (Voll, 2001; Abbildung 9).

Wie aus Abbildung 9 (A) hervorgeht, waren die Transportraten für die getesteten Metabolite unter Staunässe erhöht. Der Effekt war am größten mit P_a , aber auch noch bei Ru5P und Xu5P deutlich. Die Raten waren mit Rib5P leicht und Glk6P deutlich niedriger und schwankten zudem im Falle von Glk6P stark. Die Normalisierung der Transportraten für Normalbedingung und Staunässe auf den jeweiligen gleich 100% gesetzten P_a -Gegentausch (B) zeigte, dass für keinen der getesteten Metabolite überproportional mehr Transportaktivität zu verzeichnen war. Die Erhöhung der Transportraten war ein genereller Effekt, von dem allerdings auch die Pentosephosphate betroffen waren.

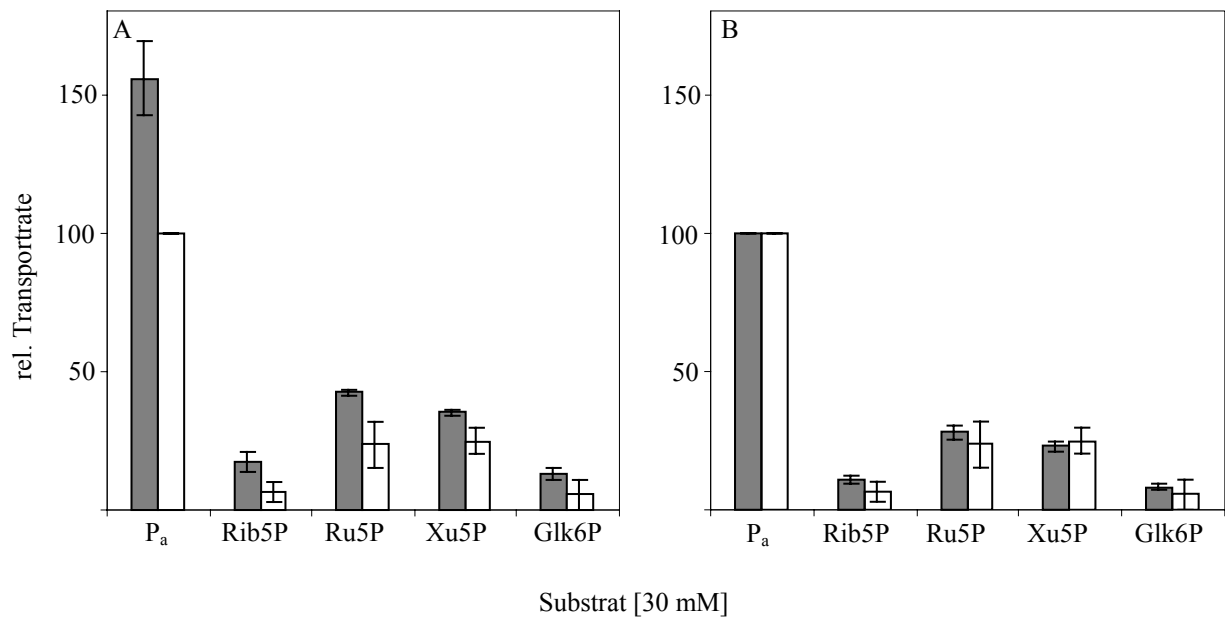


Abbildung 9. Relative Transportraten für verschiedene Metabolite mit Gesamtmembranprotein aus Blättern unterschiedlich angezogener *Arabidopsis thaliana*. Graue Balken: Staunässe, weiße Balken: Normalbedingungen. Die Daten sind relativ zum 100% gesetzten P_a-Gegentausch unter Normalbedingungen angegeben (A) bzw. auf den P_a-Gegentausch unter der jeweiligen Anzuchtbedingung (B). Die 100%-Aktivität mit P_a unter Normalbedingungen war 12 nmol·g FG⁻¹·min⁻¹. Werte aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung.

3.1.7. Weitere Ergebnisse

Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse wurden von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Flüge zusammengetragen, stellen jedoch wichtige Bestandteile im Gesamtbild der XPT-Analyse dar und sollen hier vorgestellt werden.

3.1.7.1. Das XPT-Gen

Parallel zur biochemischen Charakterisierung wurde von V. Maurino ein genomischer Klon isoliert, der neben der für den XPT kodierenden Region (At5g17630) auch 5'- und 3'-nicht-translatierte Bereiche enthielt. Das offene Leseraster (*open reading frame*, ORF) ist 1253 bp lang und liegt auf Chromosom 5. Durch Vergleiche der genomischen Sequenz mit der cDNA konnte gezeigt werden, dass das Gen keine Introns trägt. *Southern-Blot* (2.2.3.3) Analysen zeigten, dass es im Genom nur einmal (*single copy*) vorliegt. Die XPT-Promotorregion wurde auf bekannte Elemente hin untersucht. Dabei wurden zwei

mögliche TATA-Box-Motive an den Positionen -175 und -189 und zwei mögliche CAAT-Box-Motive an den Positionen -203 und -241 gefunden. Andere Elemente für die Interaktion mit bekannten Transkriptionsfaktoren konnten nicht nachgewiesen werden.

3.1.7.2. Expressionsmuster des *XPT*-Gens

Zur Untersuchung der gewebespezifischen *XPT*-Expression wurden von S. Knappe RT-PCR-Experimente durchgeführt. Ein 586 bp langes RT-PCR Fragment konnte aus allen getesteten Geweben amplifiziert werden (Blüte, Blatt, Spross und Wurzel; Abbildung 10). Im Gegensatz dazu ist die *TPT*-Expression auf photosynthetisch aktive Gewebe beschränkt, ebenso wie die Expression des *LHCP*-Gens, das als Negativkontrolle für die Expression in Wurzeln diente.

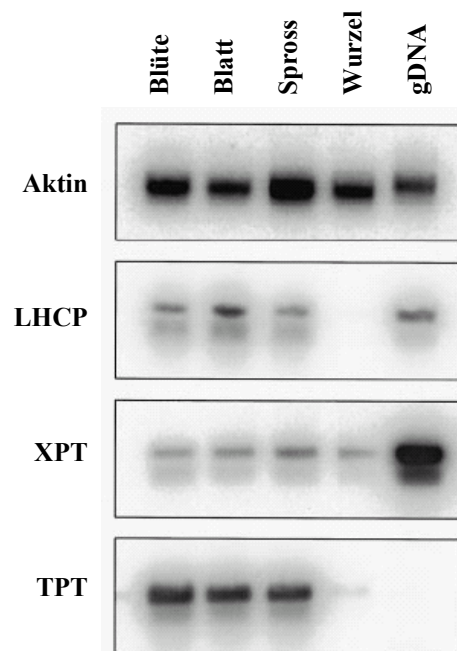


Abbildung 10. Analyse von *XPT*-Transkriptmengen durch semiquantitative RT-PCR. Es wurde RNA von Blüten, Blättern, Spross und Wurzeln untersucht. *XPT*-Transkript findet sich in allen Organen, während *TPT*-Transkript auf photosynthetisch aktive Gewebe beschränkt ist. *LHCP* dient als Wurzel-Negativkontrolle; *Aktin* als Kontrolle für gleichmäßige Gelbeladung. RNA und gDNA stammten von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0. *Aktin*: 22 Zyklen, *LHCP*: 16 Zyklen, *XPT*: 22 Zyklen, *TPT*: 20 Zyklen. Nach erfolgter RT-PCR wurden die Produkte im Agarosegel aufgetrennt, auf Membranen übertragen und mit spezifischen Sonden hybridisiert. Die gDNA-Bande des *TPT* ist aufgrund ihrer Größe nicht mehr sichtbar.

Um weiter reichende Expressionsdaten zu erheben, wurde eine *XPT*-Promotor-Reportergen-Fusion konstruiert (V. Maurino). Diese bestand aus der 1.276 bp großen Promotorregion und 431 bp der kodierenden Sequenz des XPT, die translational an das β -Glukuronidase (GUS)-Reportergen aus *E. coli* fusioniert wurden (Jefferson et al., 1987). Dieses Konstrukt wurde mit *Agrobacterium tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer in *Arabidopsis* eingebracht. Neun transgene Linien wurden auf ihr GUS-Expressionsmuster hin untersucht. Die in allen neun Linien gleiche histochemische Färbung ist in Abbildung 11 exemplarisch dargestellt.

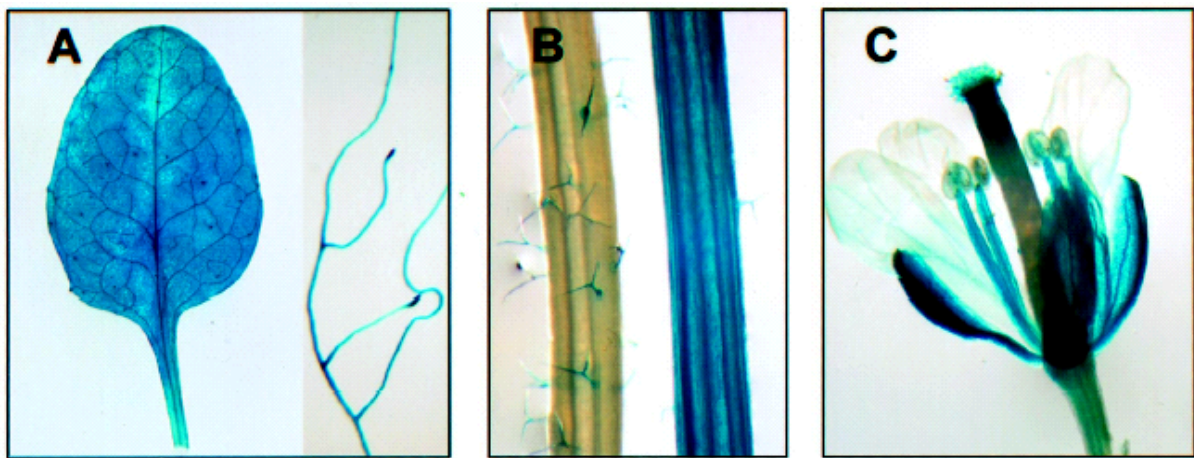


Abbildung 11. Histochemische Lokalisierung der GUS-Aktivität des *XPT*-Promotor-Reportergen-Konstruktes. A: Voll differenziertes Rosettenblatt mit gleichmäßiger Färbung von Mesophyll und Leitgewebe (links) und Färbung der Wurzeln (rechts). B: Färbung von Spross und Trichomen vor (links) und nach (rechts) Längsschnitt. C: Ältere Blüte mit elongiertem Fruchtknoten, mit Färbung in Kelchblättern, Staubfäden, dem oberen Teil des Griffels und der Narbe.

GUS-Färbung konnte in vegetativen Pflanzenteilen wie Blättern (zu allen Entwicklungsstadien) und Wurzeln, hier insbesondere in den Wurzelspitzen beobachtet werden. Ebenso waren Trichome und Spross (nach Längsschnitt) intensiv gefärbt. In der Blüte war die Färbung auf Kelchblätter, Staubfäden und den oberen Teil von Griffel und Narbe beschränkt. Kronblätter, Pollensäcke und junge Fruchtknoten waren hingegen nicht gefärbt. Darüber hinaus war während früher Fruchtentwicklungsstadien keinerlei Färbung zu beobachten. Reife Schoten und Samen hingegen waren stark gefärbt.

3.2. Die *xpt-1*-Insertionsmutante

Wie eingangs erwähnt (1.3.1) ist die Verfügbarkeit von Insertionsmutanten in *Arabidopsis* mittlerweile so gut, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit für jedes beliebige Gen eine *knock-out*-Mutante gefunden werden kann (A. Schneider, persönliche Mitteilung). Unter Kenntnis der Gen- oder cDNA-Sequenz ist es möglich, in den verschiedenen frei zugänglichen Datenbanken nach einer Insertion zu suchen. Im Erfolgsfall werden Samen der mutierten Pflanzenlinie bestellt, um diese dann selbst weiter zu kultivieren und zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde in der Population der *AKF* (1.3.1) nach einer T-DNA Insertionsmutante im *XPT*-Gen gesucht. Es konnte eine Linie identifiziert werden, die eine Insertion 471 bp unterhalb des Startkodons trug. Da es nur möglich war Samen eines 9er *pools* von Pflanzenlinien zu bestellen, musste die Linie, welche die Insertion trug, zunächst daraus isoliert werden. Dazu wurden 144 Pflanzen dieses 9er *pools* wie unter 2.2.1 und 2.2.1.1 beschrieben angezogen.

3.2.1. Molekularbiologische und genetische Charakterisierung

3.2.1.1. PCR-Analysen

Mit Einsetzen der Blüte wurden von jeder einzelnen Pflanze einige Blütenstände geerntet und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus diesem Material wurde wie in 2.2.3.1 beschrieben gDNA isoliert. Die gDNA wurde daraufhin auf die Insertion im *XPT*-Gen untersucht (2.2.3.4). Unter den 144 getesteten Pflanzen befanden sich vier, die mit Insertions-spezifischen Primern (8.4) in der PCR-Analyse ein positives Signal zeigten. Im Weiteren wurde auch der Allelzustand dieser vier Pflanzen überprüft (Abbildung 12).

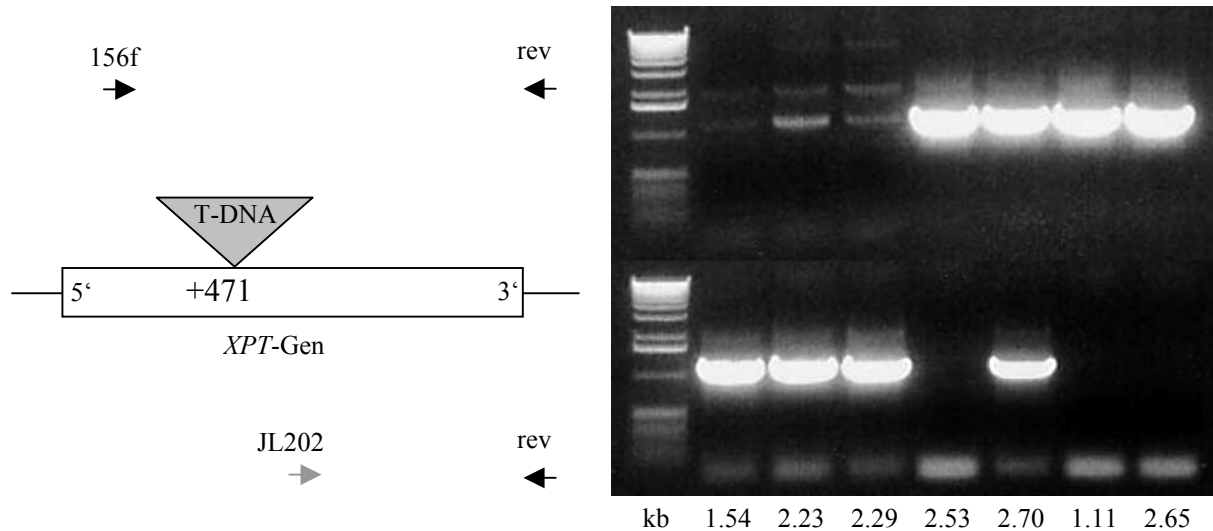


Abbildung 12. PCR-Analyse diverser Pflanzenlinien des 9er pools zur Überprüfung auf T-DNA-Insertionen. Schematische Darstellung des *XPT*-Gens mit Lage der T-DNA-Insertion und der verwendeten Primer (links). Fotografien zweier Agarosegele mit den PCR-Produkten zweier unterschiedlicher Ansätze (rechts). Die genspezifische Primerkombination 156f und rev diente zur Identifikation von Pflanzen mit Wildtyp-Allel des *XPT* (2.53, 2.70, 1.11, 2.65, oben). Die Primerkombination aus T-DNA-spezifischem JL202 (*left border primer*) und genspezifischem rev diente zur Identifizierung von Pflanzen mit mutiertem Allel (1.54, 2.23, 2.29, 2.70, unten). Die Experimente wurden wie unter 2.2.3.4 beschrieben durchgeführt.

Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, konnte von den positiven Pflanzen 1.54, 2.23, 2.29 und 2.70 nur im Falle der Linie 2.70 ein Amplifikat mit den genspezifischen Primern erhalten werden. Für die übrigen hier gezeigten Linien (2.53, 1.11 und 2.65) konnte nur das Wildtyp-Allel amplifiziert werden. Demnach handelte es sich bei den Pflanzen 1.54, 2.23 und 2.29 um homozygote *xpt*-Mutantenlinien, während bei 2.70 der heterozygote Zustand vorlag. Für weitere Experimente wurden die Linien 1.54, 2.23 und 2.29 als homozygote *knock-outs*, die Linie 2.70 als heterozygote sowie die Linien 1.11 und 2.65 als homozygote, wildtypische Linien ausgewählt.

3.2.1.2. RT-PCR-Analysen

Die auf gDNA-Ebene untersuchten Pflanzen (3.2.1.1) wurden auf die *XPT*-Expression untersucht. Dazu wurde wie unter 2.2.3.5 beschrieben RNA isoliert und diese zur Synthese von Erststrang-cDNA benutzt (2.2.3.13). Diese wurde dann mittels PCR mit unterschiedlichen Primerkombinationen auf das Vorhandensein von *XPT*-cDNA untersucht (Abbildung 13).

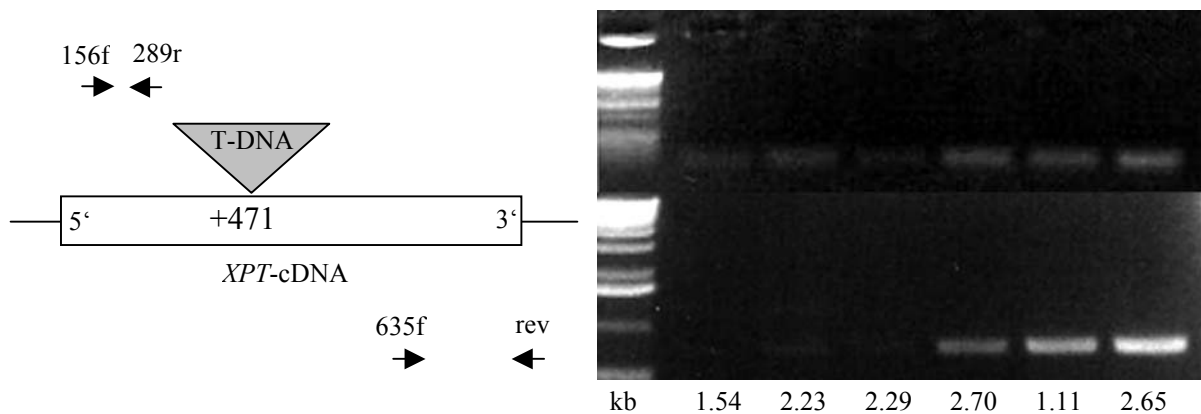


Abbildung 13. RT-PCR-Analyse verschiedener Pflanzenlinien. Schematische Darstellung der *XPT*-cDNA mit Lage der T-DNA-Insertion und der verwendeten Primer (links). Fotografien zweier Agarosegele mit den PCR-Produkten zweier unterschiedlicher Ansätze (rechts). Die genspezifische Primerkombination 156f und 289r amplifizierte ein Stück der cDNA 5' der T-DNA-Insertion in allen getesteten Linien, auch den homozygoten *knock-outs* (1.54, 2.23, oben). Mit der ebenfalls genspezifischen, aber 3' der T-DNA-Insertion gelegenen Primerkombination 635f und rev konnte ein Stück cDNA nur in den Linien, die noch ein WT-Allel besaßen (2.70, 1.11, 2.65, s. 3.2.1.1), amplifiziert werden (unten). Die Experimente wurden wie unter 2.2.3.13 beschrieben durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass in allen getesteten Linien zum 5'-Bereich des *XPT*-Gens komplementäre Transkripte vorhanden waren. Die Expression in den *knock-out* Linien 1.54, 2.23 und 2.29 war schwächer als in den übrigen drei Linien. Allerdings waren die Transkripte in den homozygoten *knock-out*-Linien verkürzt, da in keinem dieser Fälle zum 3'-Bereich des *XPT*-Gens komplementäre Transkripte nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich wurden in RT-PCR-Experimenten mit der genspezifischen Primerkombination 156f und rev (3.2.1.1, Abbildung 12) nur mit cDNA der heterozygoten bzw. wildtypischen Linien ein Amplifikat erhalten, nicht aber mit den *knock-out* Linien (nicht gezeigt). Die Expression des AtGPT1 in Linie 1.54 unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (3.2.2.1) wurde später ebenso überprüft. Es stellte sich heraus, dass GPT-spezifische Transkripte im Blatt nachweisbar, gegenüber dem Wildtyp aber nicht quantitativ verändert waren (nicht gezeigt).

3.2.1.3. Southern-Blot und Segregation

Um das Vorhandensein anderer T-DNA-Insertionen im Genom zu untersuchen, wurde eine *Southern*-Blot Analyse (2.2.3.3) mit gDNA der Pflanzenlinie 1.54, die exemplarisch ausgewählt wurde, durchgeführt. Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*

geschnitten, in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Als Hybridisierungssonde diente ein *left border*-spezifisches, 250 bp langes Fragment des *Bar*-Gens. Abbildung 14 zeigt schematisch das *XPT*-Gen, die Lage der Restriktionsschnittstellen und die Detektion der Hybridisierungssignale (2.2.3.12).

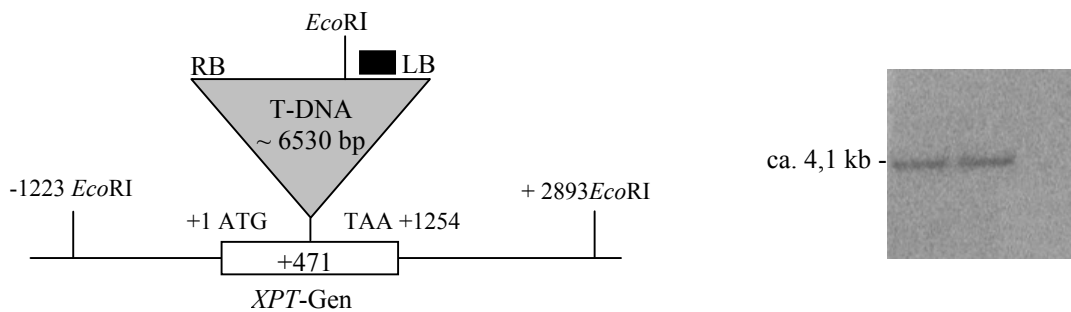


Abbildung 14. Southern-Blot Analyse der insertionsmutagenisierten Pflanzenlinie 1.54 (3.2.1.1). Schematische Darstellung der genomischen Region des *XPT*-Gens (links) und Detektion der radioaktiven Hybridisierungssignale (1.54-Doppelprobe, WS-2 als Kontrolle, Ausschnitt, rechts). Links sind die maßgeblichen Restriktionsschnittstellen und die Hybridisierungsstelle der radioaktiven Sonde (schwarzes Rechteck) eingezeichnet. Genomische DNA (2.2.3.2) wurde mit *EcoRI* verdaut (2.2.3) und wie unter 2.2.3.3 beschrieben weiterverarbeitet.

Das berechnete *EcoRI*-Fragment von 4120 bp Länge konnte nach der Hybridisierung in der 1.54-Probe detektiert werden. Im Wildtyp zeigte sich dagegen kein Signal. Da weitere hybridisierende Banden fehlten, konnte eine zweite T-DNA-Insertion im Genom mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Parallel zum *Southern*-Blot wurde die homozygote Pflanzenlinie 1.54 mit dem Wildtyp rückgekreuzt. Die T-DNA enthält als Selektionsmarker das *Bar*-Gen, das für eine Phosphinotricin-Acetyl-Transferase kodiert und die Resistenz gegen BASTA[®] vermittelt. Die F₂-Generation wurde mittels BASTA[®]-Behandlung (2.1.4) auf die Segregation der Resistenz gegen dieses Herbizid und damit auf das Vorhandensein der T-DNA im Genom (d.h. im *XPT*-Gen) untersucht. Von 308 F₂-Pflanzen waren 228 BASTA[®]-resistent, was einer Segregationsrate von ca. 3:1 entsprach. Dieses Verhältnis erwartet man bei einer singulären T-DNA-Insertion im Genom. Von den 228 resistenten Pflanzen wiederum wurden 24 willkürlich ausgewählt und mittels PCR (2.2.3.4) auf Insertion und Allelstatus (3.2.1.1) überprüft. Hierbei zeigte sich, dass alle Pflanzen eine Insertion im *XPT*-Gen trugen, wobei 15 Pflanzen heterozygot und neun Pflanzen homozygot vorlagen. Auch dieses Verhältnis von ca. 2:1 entsprach den Erwartungen. Die Linie wurde daraufhin *xpt-1* genannt.

3.2.2. Physiologische Untersuchungen

3.2.2.1. Anzucht unter Hochlicht und UV-B-Strahlung

Erhöhte Lichtintensität und UV-B-Strahlung sind Faktoren, die eine vermehrte Produktion von Anthocyanen und anderen Lichtschutzpigmenten auslösen (Dixon and Paiva, 1995; Li et al., 1993). Vermutlich mindern diese Substanzen die Lichtmenge, die die photosynthetisch aktiven Mesophyllzellen erreicht. Eine Überenergetisierung und Überreduktion des photosynthetischen Elektronentransportes wird so durch Drosselung der Lichtreaktion erreicht (Beggs et al., 1987). UV-Strahlung induziert die Bildung von u.a. Flavonoiden in *Arabidopsis* (Lois and Buchanan, 1994). Diese Schirmpigmente absorbieren die UV-B-Strahlung und schützen dadurch die DNA vor Schäden. Die homozygote *xpt-1*-Mutante zeigte während der Anzucht im Gewächshaus (2.2.1.1) keinerlei Auffälligkeiten und war vom Wildtyp phänotypisch nicht zu unterscheiden. Um einen eventuell veränderten Phänotyp zu provozieren, wurden Anzuchtbedingungen erwogen, die eine erhöhte Produktion von Anthocyanen und anderen Lichtschutzpigmenten erforderten. Unter diesen Umständen wäre die *xpt-1*-Pflanzen aufgrund des Fehlens des XPT und in Anlehnung an die unter 3.1.6 bereits beschriebenen Annahmen möglicherweise gegenüber dem Wildtyp benachteiligt. Hier bot sich die Anzucht unter Hochlicht und UV-B-Strahlung an, zumal diese Bedingungen in einer Klimakammer eingestellt und kontrolliert werden konnten (2.2.1.3). Zum Vergleich wurden Pflanzen unter Kurztagbedingungen in der Phytokammer (2.2.1.2) oder unter Langtagbedingungen im Gewächshaus angezogen.

3.2.2.2. Wachstums-Charakteristika

Zur Bestimmung des spezifischen Frischgewichts wurden Rosettenblätter sieben Wochen alter Pflanzen herangezogen. Diese wurden geerntet und gewogen, die Blattfläche wurde wie unter 2.2.5.2 beschrieben bestimmt (Abbildung 15).

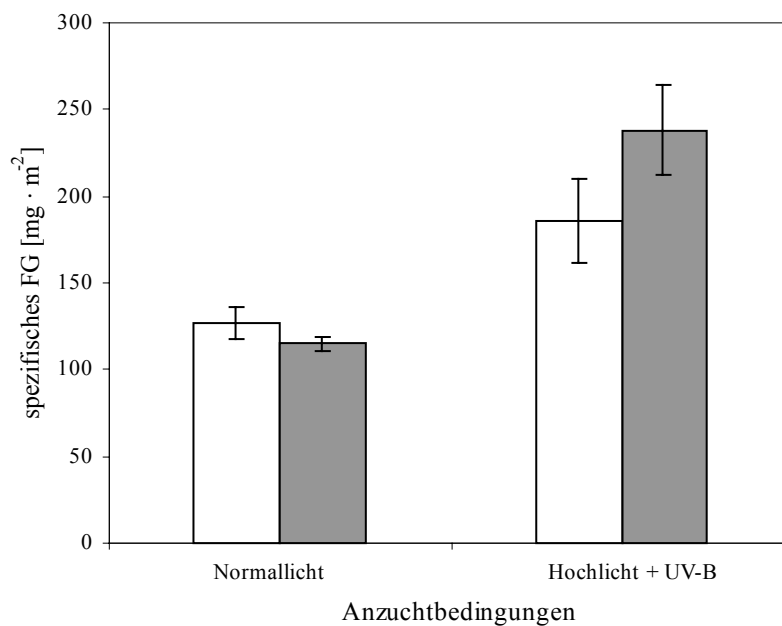


Abbildung 15. Spezifisches Frischgewicht (FG) von Wildtyp (Ws-2, weiße Balken) und *xpt-1* (graue Balken) unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Für die Bestimmungen wurden jeweils fünf Rosettenblätter sieben Wochen alter Pflanzen vermessen. Normallicht $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Hochlicht $650 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; UV-B 280-320 nm, $1,5 \text{ W}/\text{m}^2$. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Unter normalen Lichtbedingungen unterschieden sich Wildtyp und *xpt-1* nicht voneinander, jedoch war bei Hochlicht und zusätzlicher UV-B-Bestrahlung eine deutliche Zunahme des spezifischen FG zu verzeichnen. Im Wildtyp war der Wert um ca. 50% erhöht, in *xpt-1* um ca. 100%. Dies entsprach der Beobachtung, dass die Pflanzen unter Hochlicht und UV-B einen kleineren und kompakteren Wuchs zeigten. Bei der ersten Anzucht unter diesen Wachstumsbedingung wurde auch ein vermeintlich früherer Blühzeitpunkt der *xpt-1* beobachtet, der sich jedoch in weiteren Anzuchten nicht reproduzieren ließ. Unter Lang- und Kurztag-Wachstumsbedingungen (2.2.1.1 und 2.2.1.2) konnte dagegen ein verfrühtes Blühen der *xpt-1*- im Vergleich zum Wildtyp eindeutig ausgeschlossen werden (O. Zobell, persönliche Mitteilung).

3.2.2.3. Chlorophyll- und Anthocyangehalte

Die Gehalte an Chlorophyll und Anthocyanen wurden wie unter 2.2.5.8 bzw. 2.2.5.9.2 beschrieben gemessen. In Abbildung 16 sind zunächst die Chlorophyllgehalte zusammengefasst.

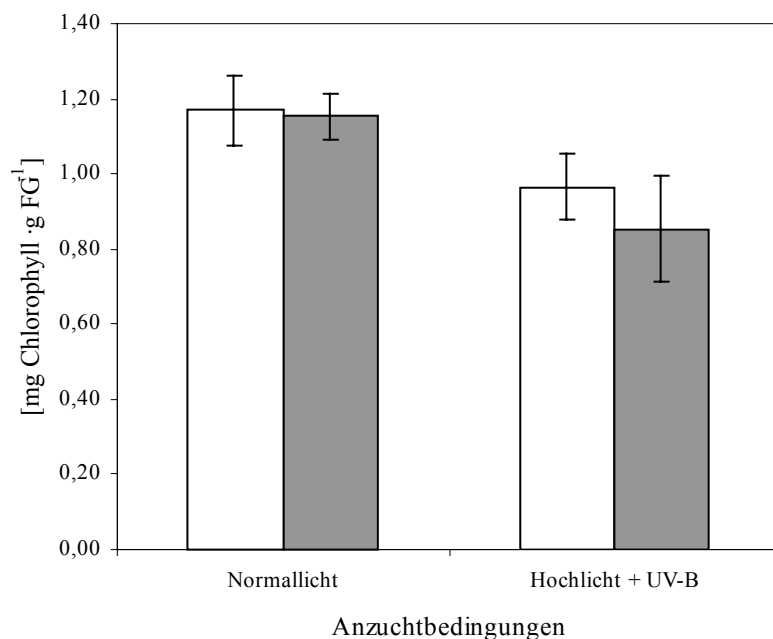


Abbildung 16. Chlorophyllgehalte von Wildtyp (Ws-2, weiße Balken) und *xpt-1* (graue Balken) unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Die Gehalte an Chlorophyll wurden wie unter 2.2.5.8 beschrieben gemessen. Die Pflanzen waren ca. sechs Wochen alt. Normallicht $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Hochlicht $650 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; UV-B 280-320 nm, $1,5 \text{ W}/\text{m}^2$. Angegeben sind die Mittelwerte fünf unabhängiger Experimente \pm Standardfehler.

Unter den getesteten Lichtbedingungen und im Rahmen der Messgenauigkeit unterschieden sich die Chlorophyllgehalte von Ws-2 und *xpt-1* nicht bzw. nur geringfügig voneinander. Unter Hochlicht und UV-B war lediglich eine leichte Abnahme der Chlorophyllgehalte festzustellen, die bei *xpt-1* tendenziell stärker ausfiel als im Wildtyp. Die Chlorophyll a/b-Verhältnisse blieben unter den getesteten Bedingungen in Wildtyp und *xpt-1* unverändert bei ca. 3:1 (nicht gezeigt).

Abbildung 17 zeigt die relativen Anthocyangehalte in den Blättern.

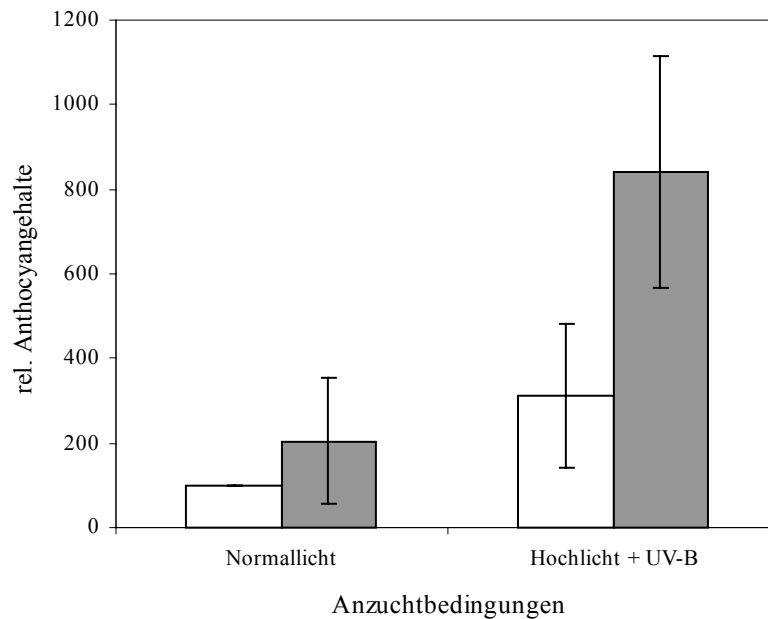


Abbildung 17. Relative Anthocyangehalte von Ws-2 (weiße Balken) und *xpt-1* (graue Balken) unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Die Gehalte an Anthocyanen wurden wie unter 2.2.5.9.2 beschrieben gemessen. Die Pflanzen waren fünf bis sieben Wochen alt. Normallicht $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Hochlicht $650 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; UV-B 280-320 nm, $1,5 \text{ W}/\text{m}^2$. Wegen der großen Schwankungsbreite der Gehalte ($A_{530}\cdot\text{g FG}^{-1}$) sind relative Werte angegeben, bezogen auf Ws-2 unter Normallicht. Es wurden unabhängige Messungen zweier verschiedener Anzuchten (2.2.1.3) gemittelt \pm Standardabweichung.

Unter Normallicht akkumulierte *xpt-1* nur tendenziell mehr Anthocyane als der Wildtyp. Dieser Effekt verstärkte sich unter Hochlicht und UV-B; während der Anthocyangehalt im Wildtyp ca. auf das Dreifache anstieg, war der Gehalt in den *xpt-1*-Pflanzen ca. um den Faktor vier erhöht.

3.2.2.4. Bestimmung der Flavonoidprofile

Die Messung des Flavonoidspektrums wurde wie unter 2.2.5.9 und 2.2.5.9.1 beschrieben durchgeführt. Die Ausdrücke des Detektors wurden am Computer eingelesen und unterschiedlich gefärbt. Abbildung 18 zeigt die übereinandergelegten Chromatogramme von Wildtyp und *xpt-1*, jeweils für Normallicht (A) und Hochlicht plus UV-B (B), sowie den quantitativen Vergleich der relativen Signalstärke einiger ausgewählter Komponenten (Normallicht: C; Hochlicht + UV-B: D). Die Grundlinie wurde mit reinem Methanol bestimmt.

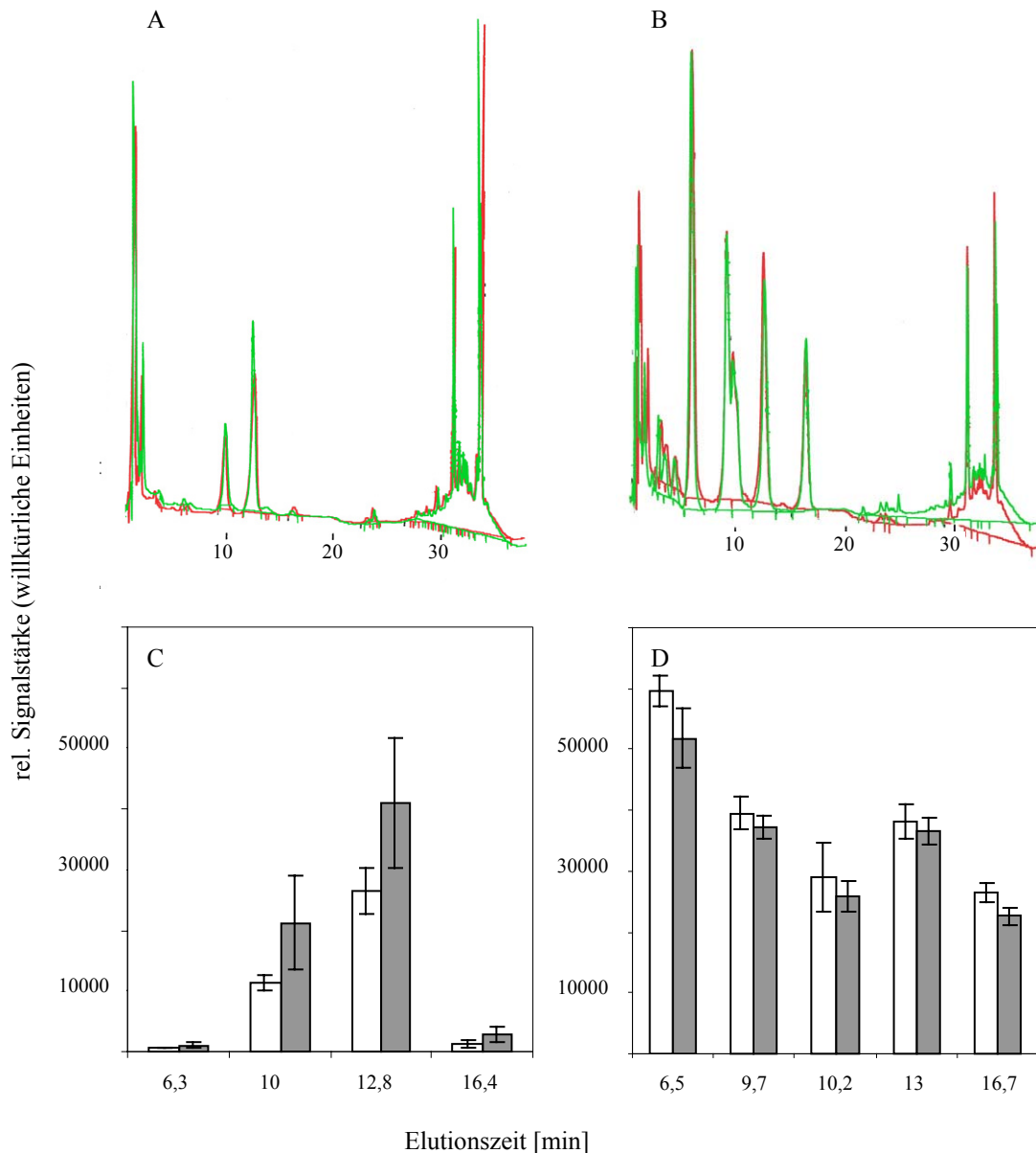


Abbildung 18. Repräsentative Flavonoid-HPLC-Elutionsprofile (A, B) und quantitativer Vergleich einiger Komponenten (C, D) aus Ws-2 und *xpt-1*-Blättern. Elutionsprofile von Ws-2 (grüne Linie) und *xpt-1* (rote Linie) unter Normallicht ($150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, A) und unter Hochlicht ($650 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) + UV-B (280-320 nm, $1,5 \text{ W}/\text{m}^2$, B). Die Detektion erfolgte bei 315 nm (2.2.5.9.1). Quantitativer Vergleich der relativen Signalstärke einiger ausgewählter Komponenten von Ws-2 (weiße Balken) und *xpt-1* (graue Balken) unter Normallicht (C) und Hochlicht + UV-B (D). Daten auf Basis der *peak areas* aus zwei unabhängigen Messungen gemittelt \pm Standardabweichung.

Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, unterschieden sich die Elutionsprofile von Wildtyp und *xpt-1* unter gleichen Anzuchtbedingungen nur unwesentlich voneinander (A, B). Anzahl und Verteilung der detektierten Komponenten glichen sich sowohl unter Normallicht als auch unter Hochlicht und UV-B. Allerdings konnten hier mehr Komponenten detektiert werden. Beim quantitativen Vergleich ausgewählter Komponenten auf Basis ihrer *peak area* wurden geringfügige Unterschiede deutlich (C, D). Waren z.B. unter Normallicht die

Komponenten bei 10 und 12,8 min Elutionszeit in *xpt-1* höher als im Wildtyp (C), so wurde dieser Unterschied durch eine stärkere Induktion im Wildtyp unter Hochlicht und UV-B ausgeglichen (D, dort bei 9,7 min bzw. 13 min Elutionszeit). Die Induktion der Komponenten bei 6,3 bis 6,5 min sowie 16,4 bis 16,7 min Elutionszeit war bei Wildtyp und *xpt-1* in etwa gleich stark. Weiterhin war unter Hochlicht und UV-B eine weitere Komponente sichtbar, die im Elutionsprofil als "Schulter" der vorherigen Komponente (9,7 bis 10 min) bei 10,2 min. folgte.

3.2.2.5. Photosynthesemessungen

Um weitere Hinweise auf eine mögliche Beeinträchtigung von *xpt-1* gegenüber dem Wildtyp zu erhalten, wurde die Photosyntheseleistung bestimmt. Dazu wurden Pflanzen verwendet, die einerseits unter Langtag-Bedingungen im Gewächshaus (2.2.1.1) und andererseits unter Hochlicht und UV-B angezogen wurden. Die Messungen der unterschiedlichen Parameter wurden wie unter 2.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

	Ws-2		<i>xpt-1</i>	
	Gewächshaus ^a	Hochlicht + UV-B ^b	Gewächshaus	Hochlicht + UV-B
F_v/F_m	0,779 ± 0,019	0,787 ± 0,029	0,798 ± 0,007	0,816 ± 0,004
ETR ^c	66,22 ± 0,85	83,91 ± 6,47	55,09 ± 1,45	97,63 ± 4,22
Φ_{PSII}	0,313 ± 0,004	0,383 ± 0,028	0,26 ± 0,006	0,473 ± 0,023
q_p	0,578 ± 0,008	0,729 ± 0,023	0,541 ± 0,007	0,815 ± 0,017
q_N	0,677 ± 0,005	0,723 ± 0,026	0,758 ± 0,006	0,646 ± 0,031

Tabelle 4. Fließgleichgewichts-Photosyntheseparameter von Ws-2 und *xpt-1* unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Die Messungen wurden wie unter 2.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Die Photonendichte (PFD, aktinisches Licht) während der Messung betrug $500 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. ^a Pflanzen wie unter 2.2.1.1 beschrieben angezogen. Daten einer repräsentativen Messung ± Standardfehler innerhalb von 10 Messpunkten. ^b Pflanzen wie unter 2.2.1.3 beschrieben angezogen. Daten aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt ± Standardabweichung. ^c Elektronentransportrate (ETR) in $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Die ETR war unter Gewächshausbedingungen im Wildtyp höher als in *xpt-1*. Unter Hochlicht und UV-B zeigte jedoch die Mutante eine erhöhte ETR. Sowohl Φ PSII als auch q_p waren unter Gewächshausbedingungen im Wildtyp höher als bei *xpt-1*. Auch hier trat unter Hochlicht und UV-B eine Umkehrung auf; die Werte stiegen in der Mutante deutlich über die Werte des Wildtyps. q_N war hingegen unter Gewächshausbedingungen in *xpt-1* stärker ausgeprägt als im Wildtyp, unter Hochlicht und UV-B jedoch stieg q_N im Wildtyp an und nahm in der Mutante ab.

Diese Ergebnisse konnten in Lichtsättigungskurven (Abbildung 19) bestätigt werden. Während unter Gewächshausbedingungen angezogene *xpt-1* ab einer Beleuchtungsstärke von ca. $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in der Sättigung der ETR waren, stieg die ETR beim Wildtyp weiter an und war bei $1000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ um den Faktor 1,7 höher. Unter Hochlicht zeigte die Mutante jedoch ab ca. $250 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ einen steileren Anstieg der ETR in Anhängigkeit von der Beleuchtungsstärke als der Wildtyp und erreichte bei ca. $750 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ einen 1,2-fach höheren Wert, wobei weder *xpt-1* noch *Ws-2* eine Sättigung der ETR zeigten. In ähnlicher Weise bestätigten sich auch die Ergebnisse für Φ PSII, q_p und q_N (nicht gezeigt).

Bei der Messung von Induktionskinetiken dunkeladaptierter Blätter für ETR und Φ PSII zeigten sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante innerhalb gleicher Anzuchtbedingungen (nicht gezeigt). ETR und Φ PSII der *Ws-2*- und *xpt-1*-Gewächshauspflanzen zeigten bei ca. $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bzw. ca. 0,5 eine Sättigung. Unter Hochlicht und UV-B stiegen die ETR von Wildtyp und auch *xpt-1* gleichermaßen an (Sättigung bei ca. $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), während die Φ PSII unter diesen Bedingungen in beiden Fällen abnahm (Sättigung bei ca. 0,35). Die während dieser Experimente gemessenen relativen Werte für die Reoxidation des primären Elektronenakzeptors im PSII ($\%Q_A^-$) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und *xpt-1*. Sowohl unter Gewächshausbedingungen als auch unter Hochlicht und UV-B waren Initialgeschwindigkeit und Quantität der Reoxidation in etwa gleich (beide ca. 25% nach elfminütiger Belichtung; nicht gezeigt).

Die im dunkeladaptierten Zustand gemessenen F_v/F_m -Verhältnisse als Maß der maximalen Fluoreszenzausbeute waren zwischen Wildtyp und Mutante innerhalb der Messgenauigkeit sowohl unter Normallicht als auch unter Hochlicht und UV-B gleich; allerdings im letzteren Fall tendenziell erhöht (Tabelle 4).

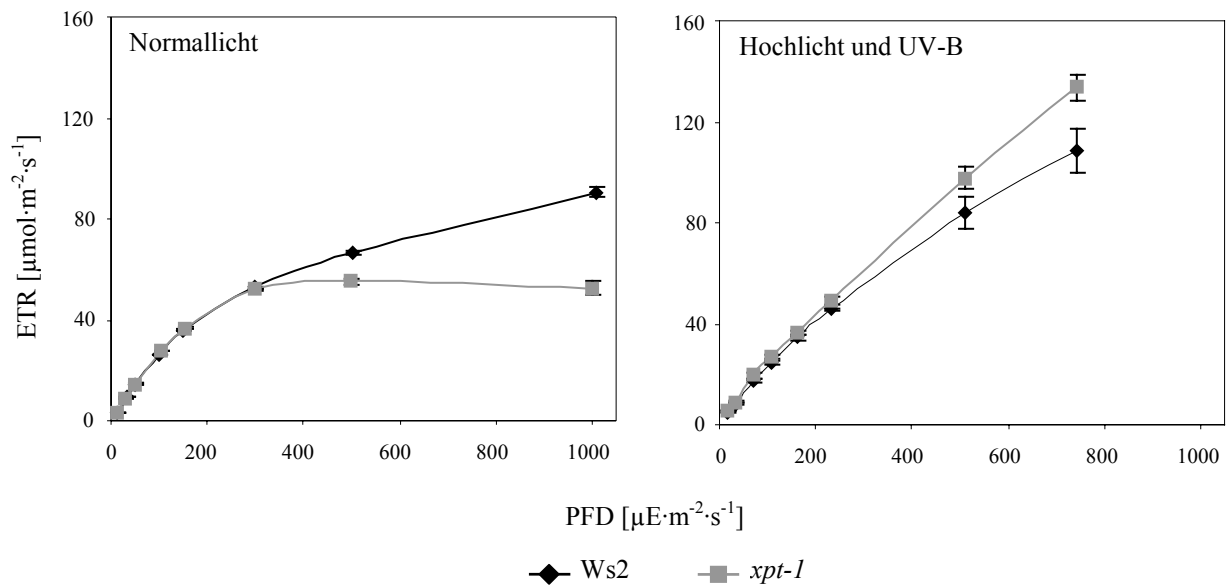


Abbildung 19. Lichtsättigungskurven der ETR von Ws-2 und *xpt-1* unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Links Pflanzen, die im Gewächshaus (2.2.1.1) angezogen wurden. Rechts Pflanzen, die unter Hochlicht und UV-B angezogen wurden. An dunkeladaptierten (2.2.5.1) Pflanzen wurden zunächst für 10 min bei einer PFD von ca. $240 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Induktionskinetiken gemessen (s. Text). Danach wurde die PFD alle 5 min von $10 - 1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Normallicht) bzw. von $20 - 720 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Hochlicht und UV-B) gesteigert. Die ETR wurde während einer PFD-Stufe alle 30 s bestimmt. Dargestellt sind gemittelte Werte \pm Standardfehler.

3.2.2.6. Bestimmung der Gehalte an löslichen Zuckern und Stärke

Die Gehalte der löslichen Zucker Glk, Fru, Saccharose (Sac) wurden aus ethanolischen Blattextrakten der Pflanzen bestimmt (2.2.5.7). Die Stärkegehalte (in Glk-Einheiten) wurden aus den ausgebleichten Blattstückchen dieser Extrakte bestimmt (2.2.5.4). Die Ergebnisse der Zucker- und Stärkebestimmungen sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Gehalte an Glk und Fru im Wildtyp unter normalen Lichtbedingungen entsprachen den Literaturwerten, auch im Bezug auf die diurnale Schwankung. Unter Hochlicht und UV-B stiegen die absoluten Werte nach 9-stündiger Belichtung (9 h L, Lichtwerte) und auch der Umsatz von Glk und, weniger deutlich, Fru an. Die Fru-Gehalte waren generell jedoch sehr klein und variant. Die Gehalte an Sac verhielten sich ähnlich; während unter Normallicht kein nennenswerter Umsatz stattfand, stiegen die Lichtwerte unter Hochlicht und UV-B an, und es war ein deutlicher Umsatz zu beobachten.

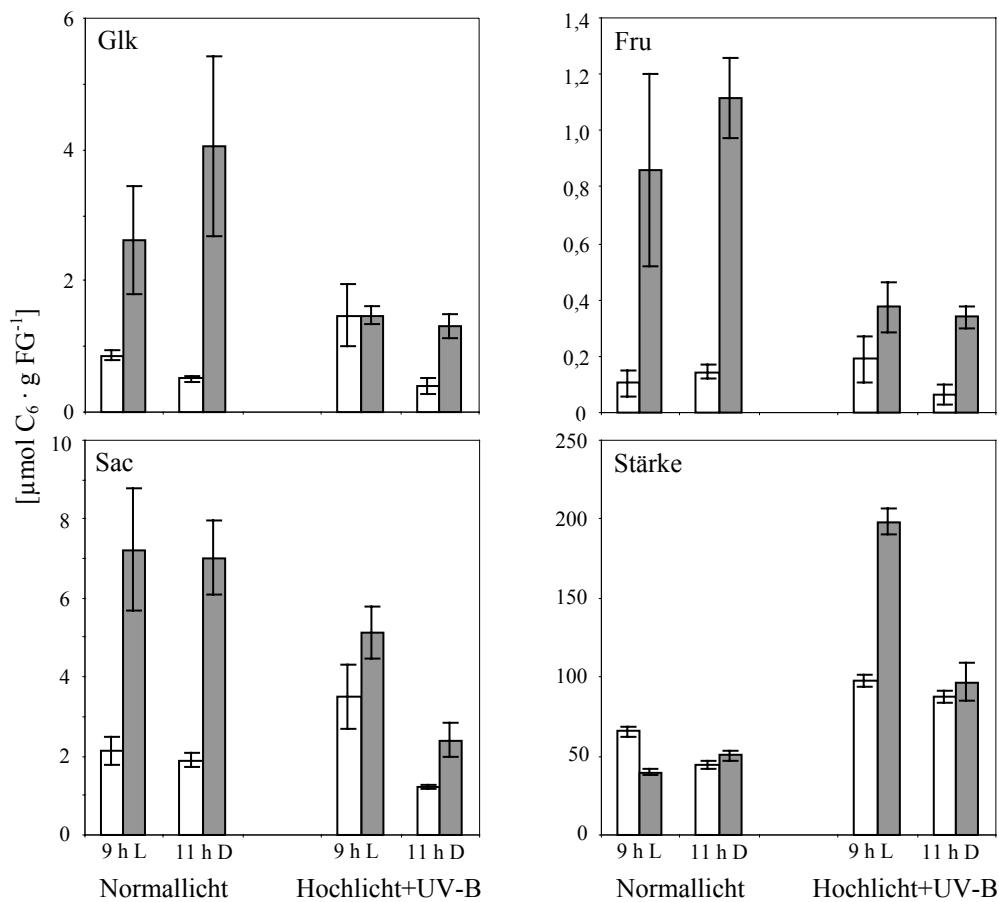


Abbildung 20. Gehalte löslicher Zucker (Glk, Fru, Sac) und Stärke. Gemessen wurde Ws-2 (weiße Balken)- und *xpt-1* (graue Balken), die entweder unter Normallicht (2.2.1.2) oder Hochlicht und UV-B (2.2.1.3) angezogen worden waren. Proben wurden gegen Ende der Lichtperiode (Lichtwerte, 9 h L) und gegen Ende der Dunkelperiode (Dunkelwerte, 11 h D) genommen und wie unter 2.2.5.7 bzw. 2.2.5.4 beschrieben verarbeitet. Daten aus vier unabhängigen Messungen \pm Standardfehler.

In der Mutante waren die Gehalte unter Normallicht generell höher als im Wildtyp, wenn auch mit größeren Fehlern behaftet. Der Glk-Gehalt war um den Faktor drei (Lichtwerte) bis acht (Dunkelwerte, 11 h D) höher, wobei im Gegensatz zum Wildtyp eine Tendenz zu noch höheren Gehalten am Ende der Dunkelperiode festzustellen war. Gleiches galt für die Fru- und Sac-Gehalte, die ebenfalls deutlich höher waren, aber im Vergleich zum Wildtyp ähnliche diurnale Schwankungen zeigten. Im Gegensatz zum Wildtyp sanken die Gehalte unter Hochlicht und UV-B generell. Die Glk-Gehalte waren hier in der Mutante nur am Ende der Dunkelperiode höher als im Wildtyp, zeigten aber, bis auf Sac, keine diurnale Veränderung. Die Fru-Gehalte waren sowohl nach Ende der Licht- als auch der Dunkelperiode gegenüber dem Wildtyp erhöht. Die Tag- und Nachtgehalte an Sac waren in *xpt-1* zwar höher, zeigten aber eine dem Wildtyp unter Normallicht vergleichbare Schwankung.

Die Stärkegehalte entsprachen im Wildtyp unter Normallicht den Erwartungen, wenn auch während der Dunkelperiode fast keine Mobilisierung stattfand. Die Mutante hatte unter diesen Bedingungen geringere Gehalte und zeigte keinen nächtlichen Abbau, sondern eine Akkumulation von Stärke. Unter Hochlicht und UV-B stiegen die Stärkegehalte sowohl im Wildtyp als auch in *xpt-1* sehr deutlich an. Während im Wildtyp der Umsatz weiterhin sehr gering war, konnte in der Mutante eine deutliche diurnale Schwankung der Stärkegehalte beobachtet werden. Die Stärkegehalte konnten durch Jod-Kaliumjodid-Färbung (modifiziert nach Caspar et al., 1985) von Blattproben bestätigt werden (nicht gezeigt).

3.2.2.7. Aktivitätsmessung von OPPP-Enzymen und GAP-DH

Der cytosolische OPPP könnte, wie bereits erläutert (3.1.6), als Lieferant für C₅-Körper, die der XPT in die Plastiden transportiert, unter Stressbedingungen (Hochlicht und UV-B) eine erhöhte Aktivität zeigen. Messungen der G6P-DH und 6PG-DH wurden durchgeführt, um Aufschluss über eine eventuell in der Mutante veränderte Aktivität des cytosolischen OPPP zu geben. Mercaptoethanol (ME) und Dithiothreitol (DTT) als reduzierende Agenzien im Aufschlusspuffer (2.2.5.5.1) sollten dabei die plastidäre Isoform der G6P-DH hemmen (Hauschild and von Schaewen, 2003). Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. NADP-GAP-DH fungierte als vom OPPP unabhängige Kontrolle.

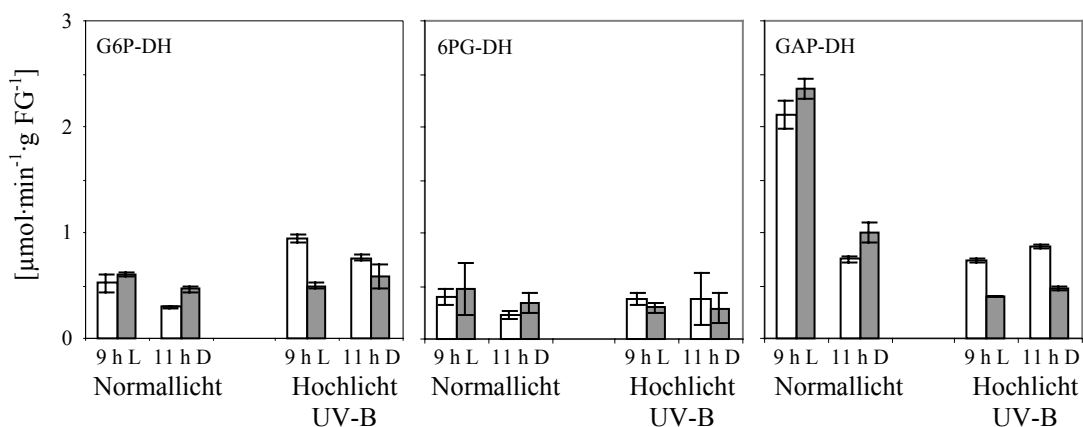


Abbildung 21. Aktivitäten von G6P-DH, 6PG-DH und NADP-GAP-DH. Gemessen wurden Blattextrakte von *Ws-2* (weiße Balken) und *xpt-1* (graue Balken), die entweder unter Normallicht (2.2.1.2) oder Hochlicht und UV-B (2.2.1.3) angezogen worden waren. Proben wurden gegen Ende der Lichtperiode (Lichtwerte, 9 h L) und gegen Ende der Dunkelperiode (Dunkelwerte, 11 h D) genommen und wie unter 2.2.5.5.1 beschrieben weiterverarbeitet. Daten aus vier unabhängigen Messungen \pm Standardfehler.

Die Aktivitäten der G6P-DH waren unter Normallicht in Wildtyp und *xpt-1* gleich. Während der Dunkelphase waren die Aktivitäten etwas niedriger als während der Lichtphase; in beiden Fällen war in der Mutante nur wenig mehr Aktivität zu verzeichnen als im Wildtyp. Unter Hochlicht und UV-B war im Wildtyp eine erhöhte G6P-DH-Aktivität festzustellen, während die Werte in *xpt-1* innerhalb der Messgenauigkeit unverändert blieben. Im Falle der 6PG-DH-Aktivitäten blieben sämtliche Aktivitäten, ungeachtet der experimentellen Variationen und innerhalb der Fehlergrenzen unverändert. Die GAP-DH-Aktivitäten unterlagen dagegen unter Normallicht einer diurnalen Schwankung; während in der Lichtphase eine ungefähr gleiche Aktivität vorhanden war, nahm diese in der Dunkelphase deutlich ab. In beiden Fällen war die Aktivität in der *xpt-1*-Mutante gegenüber der des Wildtyps leicht erhöht. Unter Hochlicht und UV-B waren die GAP-DH-Aktivitäten niedriger bzw. im Falle des Wildtyps gleich dem Dunkelwert unter Normallicht. Die Aktivitäten in der Mutante waren deutlich niedriger. Dieses Verhältnis blieb sowohl zwischen Licht und Dunkel als auch Wildtyp und *xpt-1* unverändert..

3.2.2.8. Glutathiongehalte

Durch Messung der Glutathiongehalte (2.2.5.5.4) sollte der Redoxstatus von Wildtyp und Mutante überprüft werden. Eine wichtige Rolle des OPPP besteht in der Generierung von Reduktionsäquivalenten, die über die NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase (GR) auch den Redoxstatus des Glutathionpools beeinflussen (Noctor et al., 2002). Für die Messungen wurden Blattextrakte von ca. vier bis sechs Wochen alten Pflanzen herangezogen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 22 zusammengefasst. Unter Normallicht zeigten sich innerhalb der Messgenauigkeit zwischen Wildtyp und *xpt-1* keine Unterschiede in den GSH-Gehalten. In unter Hochlicht und UV-B angezogenen Pflanzen stiegen die Gehalte generell an. In den Lichtphasen waren dabei die Gehalte gegenüber über den Dunkelphasen leicht erhöht, jedoch zwischen Wildtyp und Mutante jeweils gleich. Insgesamt waren die GSH-Gehalte während der Lichtphasen unter Normal- und Hochlicht und UV-B beim Wildtyp gegenüber *xpt-1* tendenziell erhöht. Die Gehalte an GSSG, oxidiertem Glutathion, waren generell geringer als die GSH-Gehalte. Innerhalb der Messgenauigkeit unterschieden sich hier die Werte von Wildtyp und Mutante unter den experimentellen Variationen jedoch nicht deutlich. Der Wildtyp zeigte lediglich eine Tendenz zu erhöhten Gehalten gegenüber der Mutante.

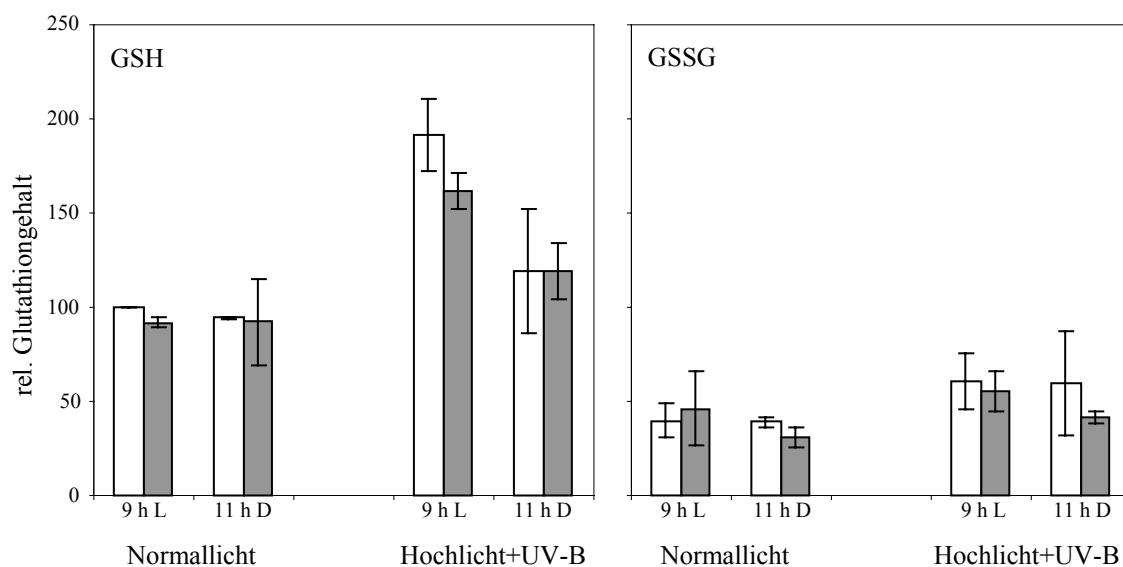


Abbildung 22. Relative Glutathiongehalte von Ws-2 (weiße Balken) und *xpt-1* (graue Balken) unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Die Pflanzen wurden entweder unter Normallicht (2.2.1.2) oder Hochlicht und UV-B (2.2.1.3) angezogen. Proben wurden gegen Ende der Lichtperiode (Lichtwerte, 9 h L) und gegen Ende der Dunkelperiode (Dunkelwerte, 11 h D) genommen und wie unter 2.2.5.5.4 beschrieben weiterverarbeitet. Die Werte sind relativ zum GSH-Gehalt des Wildtyps unter Normallicht und gegen Ende der Lichtperiode angegeben (100% = $234 \pm 72 \text{ nmol} \cdot \text{g FG}^{-1}$). Daten aus zwei Experimenten \pm Standardabweichung.

Die aus diesen Messwerten errechneten Quotienten für der Redoxstatus (GSH/GSSG) und den Reduktionsgrad (prozentualer Anteil von GSH am Gesamtgehalt) sind in Tabelle 5 dargestellt.

	Normallicht		Hochlicht und UV-B	
	9 h L	11 h D	9 h L	11 h D
Redoxstatus				
Ws-2	$2,7 \pm 0,6$	$2,4 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,5$
<i>xpt-1</i>	$2,5 \pm 1,1$	$3,0 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,8$	$2,9 \pm 0,6$
Reduktionsgrad [%]				
Ws-2	72 ± 5	71 ± 1	76 ± 3	68 ± 5
<i>xpt-1</i>	68 ± 10	75 ± 1	75 ± 5	74 ± 4

Tabelle 5. Redoxstatus und Reduktionsgrad von Glutathion in Blattextrakten von Ws-2 und *xpt-1* unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Die Pflanzen wurden entweder unter Normallicht (2.2.1.2) oder Hochlicht und UV-B (2.2.1.3) angezogen. Proben wurden gegen Ende der Lichtperiode (Lichtwerte, 9 h L) und gegen Ende der Dunkelperiode (Dunkelwerte, 11 h D) genommen und wie unter 2.2.5.5.4 beschrieben weiterverarbeitet. Die Werte für den Redoxstatus (GSH/GSSG) und den Reduktionsgrad (prozentualer Anteil GSH am Gesamtgehalt) sind aus den Daten errechnet, die auch Abbildung 22 zugrunde liegen.

Der auf der Basis der Messwerte berechnete Redoxstatus sowie der Reduktionsgrad zeigten ebenfalls kaum Unterschiede. Zwar zeigte *xpt-1* zumindest eine Tendenz zu einem im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Redoxstatus am Ende der Dunkelperiode, die unter Normallicht deutlich war. Jedoch waren die einzelnen Werte des Redoxstatus generell innerhalb der Messgenauigkeit gleich. Mit dem Reduktionsgrad in den einzelnen Proben verhielt es sich ebenso.

3.3. Untersuchungen an plastidären Phosphattranslokatoren aus *Mesembryanthemum crystallinum*

Wie bereits erwähnt (1.2.3), stellt CAM eine bedeutende Adaption an trockene und heiße Standorte und, damit verbunden, eine verringerte Wasserverfügbarkeit dar. Die primäre Fixierung von atmosphärischem CO₂ und der Calvin-Zyklus sind hierbei zeitlich voneinander getrennt. Während der Nacht wird bei geöffneten Stomata CO₂ durch die PEPC vorfixiert und als Malat in der Vakuole gespeichert. Tagsüber sind die Stomata zur Vermeidung von Wasserverlusten geschlossen. Im Falle von *Mesembryanthemum crystallinum* wird das gespeicherte Malat nun durch das NADP-ME decarboxyliert und das freigesetzte CO₂ im Calvin-Zyklus refixiert (Holtum and Osmond, 1981). Die Umstellung von C₃- auf CAM-Stoffwechsel ist bei *Mesembryanthemum* durch Salzstress induzierbar. Da zudem die Reaktionen des CAM auf unterschiedliche Kompartimente verteilt sind, spielen Transportprozesse, insbesondere über die Plastidenhüllmembran, hierbei eine wichtige Rolle. Für verschiedene Metabolite waren bereits Transportaktivitäten gezeigt worden (Kore-eda and Kanai, 1997; Neuhaus et al., 1988; Neuhaus and Schulte, 1996); inwiefern diese allerdings mit der Transition von C₃- zu CAM-Stoffwechsel korrelierten, war nicht bekannt. Um diese Zusammenhänge zu untersuchen, boten sich u.a. Transportversuche im rekonstituierten System an (1.2.4). Durch die Verwendung unterschiedlicher Metabolite für die Vorbeladung der Proteoliposomen (2.2.5.3) sollten die verschiedenen Phosphattranslokator-Klassen (1.2.1) spezifisch angesprochen werden, um deren Rolle im CAM zu analysieren.

3.3.1. Vorbemerkungen

Im Rahmen der Untersuchungen an *Mesembryanthemum* wurden auch von anderen Arbeitsgruppen Experimente durchgeführt, die als Grundlage und zur Ergänzung der Transportversuche hier zunächst erwähnt werden sollen (Häusler et al., 2000).

3.3.1.1. CAM-Induktion

Die Transportmessungen sollten mit Blattmaterial von *Mesembryanthemum*-Pflanzen durchgeführt werden, deren Stoffwechsel bereits auf CAM umgestellt war. Dazu wurden im Gewächshaus angezogene Pflanzen mit 400 mM NaCl-Lösung behandelt. Die Induktion des CAM wurde durch die Überwachung der Aktivitätszunahme CAM-spezifischer Enzyme wie PEPC und NADP-ME überwacht. Nach fünf Tagen war eine deutliche Aktivitätszunahme der beiden Enzyme zu verzeichnen. Parallel dazu wurde in *Northern*-Blot-Experimenten die Expression von PEPC, TPT, PPT und GPT analysiert. Auch hier zeigte sich eine zum Teil sehr deutliche Induktion der Transkriptmengen im selben Zeitraum. Für die weiteren Messungen des CAM wurden daher Pflanzen gewählt, die unter diesen Bedingungen angezogen worden waren (Häusler et al., 2000).

3.3.1.2. Expressionsanalysen der Phosphattranslokator-Gene

Northern-Blot-Untersuchungen über einen Zeitraum von 24 h in CAM-induzierten *Mesembryanthemum*-Pflanzen zeigten, dass während der Lichtperiode generell mehr Phosphattranslokator-Transkripte detektierbar und diese diurnalen Schwankungen unterworfen waren. Der PPT war zur Tagesmitte am höchsten exprimiert, nahm zum Ende der Lichtperiode ab und wurde zum Ende der Dunkelperiode wieder stärker exprimiert. Der GPT war Mitte bis Ende der Lichtperiode besonders stark exprimiert, während der restlichen Zeit schwächer. Der TPT zeigte ein dem PPT ähnliches Expressionsmuster, war insgesamt jedoch stärker exprimiert (Häusler et al., 2000).

3.3.1.3. Physiologische Messungen

Verschiedene Metabolitgehalte und die Aktivitäten von Enzymen aus unterschiedlichen Stoffwechselwegen wurden ebenfalls über einen Zeitraum von 24 h überwacht. Diese Ergebnisse werden, sofern sie im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Transportversuche stehen, später diskutiert (4.4.2).

3.3.2. Transportversuche mit *Mesembryanthemum crystallinum*

Zur Messung der Transportaktivitäten wurde Blattmaterial CAM-induzierter *Mesembryanthemum*-Pflanzen (3.3.1.1) verwendet, das zu verschiedenen Tages- bzw. Nachtzeiten (s.u.) geerntet worden war. Dadurch sollte der diurnale Verlauf der Aktivitäten der zu messenden Phosphattranslokatoren verfolgt werden (siehe auch 3.3.1.2). Das Material wurde wie unter 2.2.5.3.2 geschrieben aufgearbeitet, mit den dort erwähnten Modifikationen. Die Ergebnisse der Transportversuche sind in Abbildung 23 dargestellt.

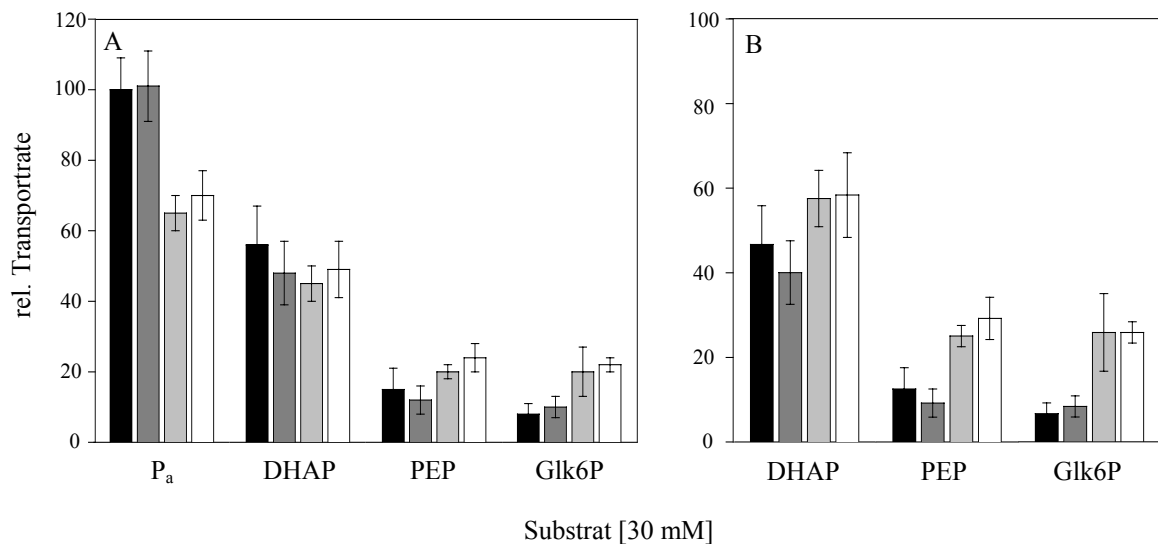


Abbildung 23. Relative Transportraten für Pa, DHAP, PEP und Glk6P in Gesamtmembranfraktionen von CAM-induzierten *Mesembryanthemum*-Blättern. Die Proben wurden nach 6 h (schwarze Balken) und 12 h (dunkelgraue Balken) Dunkel oder 2 h (hellgraue Balken) und 6 h (weiße Balken) Licht geerntet. A: Transportraten relativ zum Pa-Gegentausch nach 6 h Dunkel (100% = 1,8 ± 0,2 nmol·min⁻¹·g FG⁻¹). Daten aus fünf unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. B: Transportraten relativ zum Pa-Gegentausch (100%) der jeweiligen Probe. Daten aus den Werten in A berechnet.

Der Pa-Gegentausch war während der Lichtperiode deutlich niedriger als im Dunkeln, während die DHAP-Transportraten im gemessenen Zeitraum keinen größeren Schwankungen unterworfen waren. Im Falle von PEP und Glk6P zeigte sich im Licht ein leichter Anstieg der Transportraten gegenüber den Dunkelproben (A). Dieser Anstieg wurde jedoch deutlich, wenn die Raten auf den Pa-Gegentausch zum jeweiligen Zeitpunkt bezogen wurden (B). Bei dieser Darstellung war auch ein deutlicherer Anstieg der DHAP-Transportraten während der Lichtperiode feststellbar.

4. Diskussion

Pflanzliche Transportproteine, insbesondere plastidäre Phosphattranslokatoren (1.2.1), sind von unbestrittener Bedeutung für das Funktionieren des pflanzlichen Stoffwechsels (Flügge, 1999). Den in der vorliegenden Arbeit untersuchten, verschiedenen Themenbereichen war das Ziel gemein, einige Vertreter dieser Proteinfamilie genauer zu charakterisieren. Dazu wurden verschiedene experimentelle Ansätze und Strategien verfolgt.

Neben der heterologen Expression und biochemischen Charakterisierung eines Vertreters der pPTs, des XPT aus *Arabidopsis thaliana*, wurde eine T-DNA-Insertionsmutante des *AtXPT*-Gens molekularbiologisch und physiologisch untersucht.

Im Falle der induzierbaren CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* wurde durch Transportversuche mit Gesamtmembranprotein der Pflanzen das Verhalten von Vertretern dreier pPT-Unterfamilien, TPT, PPT und GPT, analysiert.

4.1. Der plastidäre Pentosephosphat/Phosphat-Translokator (XPT)

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war ein bislang unbekannter, zum GPT homologer Phosphattranslokator aus *Arabidopsis thaliana* als Pentosephosphat/Phosphat-Translokator identifiziert worden (Eicks, 1998). Das in *S. pombe* heterolog exprimierte und in Liposomen rekonstituierte Protein transportierte P_a im Gegentausch mit DHAP, 3-PGA und Ru5P, jedoch nicht mit Hexosephosphaten (1.2.2). Davon ausgehend sollte durch Reinigung des heterolog exprimierten Proteins und weitere Transportversuche die Funktion des Proteins genauer beschrieben werden.

4.1.1. Der XPT innerhalb der pPT-Familie

Ein Vergleich von Phosphattranslokatoren auf Basis der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit denen des AtXPT und möglicher XPT-EST-Sequenzen anderer Spezies zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse untereinander auf (Abbildung 2). Neben den bekannten Unterfamilien der TPTs, PPTs und GPTs bilden die XPTs eine eigene Unterfamilie. Dies manifestiert sich in den prozentualen Aminosäureidentitäten, die die Phosphattranslokatoren innerhalb einer Unterfamilie (ca. 80%, auch zwischen pPTs verschiedener Spezies) und zwischen den Unterfamilien (ca. 35%) teilen. Diese Identitäten liegen auch im Fall der XPTs vor. Vermutlich existierten die vier Unterfamilien bereits vor der Trennung von mono- und dikotylen Pflanzen, wie es auch für die *major intrinsic protein* (MIP)-Familie aus *Arabidopsis* gezeigt wurde (Johanson et al., 2001).

Ein genauer Vergleich der Aminosäuresequenzen des XPT mit der von GPTs verschiedener Spezies (Abbildung 3) zeigt Bereiche hoher Sequenzidentität, die in allen vier pPT-Familien konserviert sind (Kammerer et al., 1998). Hier befinden sich drei Lysin- und ein Argininrest. Diese Aminosäuren besitzen positiv geladenen Seitenketten, die für die Bindung der Substrate, meist divalente Anionen (Fliege et al., 1978), in Frage kommen. K₂₇₈ (ZmGPT) scheint zu einem Motiv zu gehören, das sowohl in pPTs als auch in PThs und NSTs konserviert ist (s.u.). Die beiden Aminosäurereste oberhalb des K₂₇₈R₂₇₉-Motivs sind charakteristisch für die jeweilige pPT-Unterfamilie; im Falle der GPT- und XPT-Unterfamilien finden sich die Aminosäuren Thr-Met. Direkt unterhalb des Lys-Arg-Motivs findet man bei GPTs die Aminosäuren Ile-Ser, beim XPT jedoch Val-Val, ebenso wie bei den PPTs. Die Bedeutung dieser Aminosäuren bei Bindung und Transport von Substraten ist noch nicht experimentell geklärt (s. auch 4.1.3).

Mittlerweile sind durch Analysen des komplett sequenzierten Genoms von *Arabidopsis* (Arabidopsis Genome Initiative, 2001) alle sechzehn plastidären Phosphattranslokator-Gene dieser Spezies bekannt, von denen jedoch zehn Pseudogene sind (Knappe et al., 2003a). Zusammen bilden sie eine Familie (pPT) und sind, mit einigen homologen Proteinen aus *Arabidopsis* und anderen Spezies (PTh), Teil der *drug/metabolite transporter superfamily*, DMT. Eine besonders enge Verbindung innerhalb der DMT-Superfamilie besteht zwischen pPTs und den *nucleotide sugar transporters*, NSTs. Beide liegen funktionell als Homodimere vor und sind Antiporter, die phosphorylierte, negativ geladene Moleküle transportieren. Sie gleichen sich in Größe und Anzahl der Membranspannen und werden von dem Inhibitor 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-

disulfonsäure (DIDS), der an Lysinreste bindet, in ihrer Aktivität gehemmt (Flügge and Heldt, 1986; Norambuena et al., 2002). Aus den in den pPT-, PTh- und NST-Familien konservierten Aminosäureresten kann auf eine gemeinsame Substratbindungsstelle geschlossen werden. Das gemeinsame Motiv T[X]₇₍₈₎K ähnelt dem von GDP-Mannose- und UDP-Zucker-Transportern, die im endoplasmatischen Retikulum und im Golgiapparat vorkommen (Gao et al., 2001). Somit handelt es sich bei den pPTs und NSTs um sehr nahe verwandte Proteinfamilien, die auf einen gemeinsamen Ursprung in der endosymbiontischen Wirtszelle zurückzuführen sein könnten (Knappe, 2002; Knappe et al., 2003a).

4.1.2. Heterologe Expression

S. cerevisiae und *S. pombe* werden neben *E. coli* erfolgreich für die heterologe Expression eukaryontischer Genprodukte eingesetzt. Hefen sind Eukaryonten und gleichen somit in der Komplexität ihres Aufbaus und der typischen subzellulären Kompartimentierung tierischen und pflanzlichen Zellen. Sie verfügen aufgrund eines entsprechenden sekretorischen Stoffwechselweges über die Möglichkeit der korrekten Modifikation und Sekretion heterologer Proteine. Es gibt viele Beispiele für die funktionelle Expression unterschiedlicher pflanzlicher Proteine in Hefe (Hashimoto et al., 2004; Sauer and Stolz, 1994; Yamaguchi et al., 2003). Speziell die Expression von pPTs ist in *S. pombe* etabliert und ausführlich beschrieben (Fischer et al., 1997; Kammerer et al., 1998; Loddenkötter et al., 1993). Die Expression in Prokaryoten, z.B. *E. coli*, ist in diesem Fall ungeeignet, da das überexprimierte Protein für die Zellen toxisch ist oder in Form denaturierter Proteinaggregate (*inclusion bodies*) in den Wirtszellen akkumuliert. In *S. pombe* ist im Falle der pPTs gegenüber *S. cerevisiae* eine drei- bis fünffach höhere Expressionsrate möglich (Loddenkötter, 1996). Innerhalb der Wirtszellen findet sich das heterolog exprimierte Protein in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und / oder der Mitochondrien wieder (Loddenkötter et al., 1993). Durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatografie ist eine Aufreinigung des mit einem *his-tag* versehenen Proteins aus den Gesamtmembranfraktionen transgener Hefezellen möglich (Abbildung 4). Das Protein kann nahezu homogen und in nativem Zustand dargestellt werden, um dessen Transportaktivität im rekonstituierten System zu messen.

4.1.3. Transportversuche mit nativem XPT-Protein

Das bei Vorversuchen (Abbildung 5) festgelegte Standard-Eluatvolumen gewährleistet die Messung der Transportraten im linearen Bereich. Die stabile Expressionsrate, die ständige Überprüfung des Reinigungserfolges per SDS-PAGE und *Western-Blot* und schließlich die Aufnahmezeiten selbst (bei ungefähr gleich bleibendem Einsatz an spezifischer Radioaktivität) bieten weiterhin Kontrollmöglichkeiten für den Erfolg der Transportmessungen.

Wie die Überprüfung der Sättigung des P_a -Gegentausches zeigt, folgt der homologe Gegentausch durch den XPT einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 6). Der Verlauf der Regressionsgeraden zeigt drei Phasen. Unterhalb einer Substratkonzentration $[S]$ von 0,4 mM ist der Gegentausch linear (*first-order kinetics*) wobei die Anfangsgeschwindigkeit $[v]$ proportional $[S]$ ist. Von 0,4 bis ca. 2 mM ist diese Linearität nicht mehr gegeben; die Abhängigkeit $[v]$ von $[S]$ ist aber immer noch mess- und sichtbar. Oberhalb 2 mM schließlich bleibt $[v]$ annähernd konstant und von $[S]$ unabhängig (*zero-order kinetics*; Segel, 1968). Eine externe P_a -Konzentration von 0,25 mM, wie sie in den weiteren Experimenten eingestellt wurde, liegt somit eindeutig im linearen Bereich.

Der experimentell ermittelte K_M -Wert des XPT für P_a liegt in einer Größenordnung, die für pPT-Proteine im rekonstituierten System typisch ist (Tabelle 1; Fischer et al., 1997 und Kammerer et al., 1998). Die in etwa gleichen P_a -Affinitäten des XPT und der übrigen pPT-Proteine können, neben den bereits unter 4.1.1 diskutierten Fakten, als weitere Belege für die Identität des XPT als funktionellem Phosphattranslokator gewertet werden.

Zur Überprüfung der bekannten Substratspezifitäten (Eicks, 1998) und zur Bestimmung exakter Umsatzraten ist eine Reinigung des betreffenden Proteins aus den Gesamtmembranen (2.2.4.1) vorzuziehen. Es ist mehrfach gezeigt worden, dass die mit Hefe-Gesamtmembranen gemessenen exakten Transportraten zum Teil erheblich von denen mit gereinigtem Protein oder isolierten Plastiden gemessenen abweichen können (Fischer et al., 1994; Loddenkötter et al., 1993; B. Kammerer und U.-I. Flügge, persönliche Mitteilung). Der Grund für diese Diskrepanz liegt wahrscheinlich im höheren Anteil an Hefeproteinen, die eventuell mit den Substratmolekülen interagieren könnten, und der geringeren spezifischen Aktivität des heterologen Proteins in Gesamtmembranen.

Im Vergleich mit Gesamtmembranen zeigen sich zum Teil Unterschiede in den gemessenen Transportaktivitäten (Tabelle 2). Die DHAP-Transportrate ist annähernd verdoppelt, während die für Ru5P auf weniger als die Hälfte abnimmt. Xu5P, das neben

Ru5P und Rib5P dritte, im OPPP entstehende Pentosephosphat, wird mit einer Rate transportiert, die der von DHAP gleicht; auch 3-PGA wird mit hoher Rate transportiert. Mit Ru5P und Ery4P werden Transportraten erreicht, die bereits deutlich niedriger sind; kaum transportiert werden dagegen PEP, Rib5P und Glk6P.

Unter physiologischen Bedingungen, d.h. im Allgemeinen unter nicht-sättigenden Substratkonzentrationen, sind die Affinitäten der Metabolite zum Translokator entscheidend. Dazu müssen die Ergebnisse der Wettbewerbsversuche und der Bestimmung der K_i -Werte mit einbezogen werden. Aus Tabelle 3 geht hervor, dass DHAP und Xu5P sehr niedrige K_i -Werte besitzen und somit in der Lage sind, bereits bei Konzentrationen von 0,4 mM bzw. 0,8 mM wirkungsvoll mit P_a (K_M -Wert 1 mM) um den Transport durch den XPT zu konkurrieren. Somit können DHAP und Xu5P als Hauptsubstrate des XPT angesehen werden. Im Falle der übrigen Metabolite ist der Transport durch den XPT *in vivo* nahezu (3-PGA, PEP, Ery4P und Ru5P) oder definitiv (Rib5P und Glk6P) ausgeschlossen. Dies ist im Bezug auf Glk6P besonders interessant, weil der XPT innerhalb der pPTs die größte Homologie zum GPT zeigt. Jedoch sind, wie bereits unter 4.1.1 diskutiert, die in der Sequenz direkt unterhalb des Lys-Arg-Motivs liegenden GTP-spezifischen Aminosäuren (Ile-Ser) beim XPT (Val-Val) geändert, ebenso der drittnächste Aminosäurerest (GPT: Val; XPT: Ile). Ein experimenteller Beweis für die Rolle dieser Aminosäuren bei der Bindung und dem Transport des Substrates ist jedoch noch nicht erbracht worden.

4.1.3.1. Pentosephosphat-Transport durch den GPT?

Der rekombinant exprimierte GPT aus Erbsenwurzeln transportiert, ebenso wie der XPT, kein Glk1P und Fru6P, ist aber in der Lage, Pentosephosphate zu transportieren (Tabelle 2; Kammerer et al., 1998). Somit existieren, vorbehaltlich der Kenntnis der spezifischen Substrataffinitäten des GPT, zwei verschiedene Translokatoren, die in der Lage sind, Pentosephosphate zu transportieren. Jedoch erscheint diese Aktivität des GPT *in vivo* unwahrscheinlich, da diese Metabolite mit Glk6P-Konzentrationen von ca. 1 mM im Stroma und bis zu 6 mM im Cytosol konkurrieren müssen (Gerhardt et al., 1987; Stitt et al., 1980; Winter et al., 1994). Zusätzlich liegen in Stroma und Cytosol millimolare Konzentrationen an TP, 3-PGA und P_a vor, die für den GPT ebenfalls Substrate darstellen. Dem gegenüber stehen stromale Pentosephosphat-Gesamtkonzentrationen von ca. 0,1 mM (Flügge et al., 1980; Flügge et al., 1982; Heldt et al., 1980), d.h. jedes der drei

Pentosephosphate ist in noch geringerer Konzentration vorhanden. Die Konzentrationen an Pentosephosphaten im Cytosol sind unbekannt, man kann aber annehmen, dass sie nicht wesentlich über den stromalen Konzentrationen liegen. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass unter physiologischen Bedingungen der Transport von Pentosephosphaten, insbesondere Xu5P, allein vom XPT bewerkstelligt wird. Dieser Transport kann auch nicht durch Glk6P beeinträchtigt werden, da es kein Substrat des XPT darstellt.

Der Transport von Rib5P durch den XPT kann *de facto* ausgeschlossen werden (s.o.). Im Gegensatz dazu wurde in heterotrophen Plastiden aus Erbsenwurzel ein Import von Rib5P und Ru5P gezeigt (Debnam and Emes, 1999; Hartwell et al., 1996), wofür es folgende Erklärungen geben könnte. Entweder besitzen diese Plastiden einen "XPT" mit anderen Substratspezifitäten, oder der Transport wird durch den GPT bewerkstelligt. Ebenso besteht die Möglichkeit einer Kontamination der Plastidenpräparation mit stromalen Enzymen (RPE, RPI) aus aufgebrochenen Plastiden. Diese könnten dann Ru5P und Rib5P in Xu5P umwandeln, welches dann importiert würde (s. dazu auch 4.1.5).

4.1.4. Der OPPP in *Arabidopsis thaliana*

Da Xu5P als einziges der drei Pentosephosphate unter physiologischen Bedingungen für den XPT als Substrat in Betracht kommt (4.1.3), stellt sich die Frage nach der Verfügbarkeit dieses Metaboliten in *Arabidopsis*. Ru5P ist eines der Produkte des oxidativen Teils des OPPP und wird im Laufe des nicht-oxidativen Teils durch die Aktivität der RPI zu Rib5P und durch die RPEase zu Xu5P umgesetzt. Über die Verteilung der Enzyme des OPPP innerhalb der pflanzlichen Zelle, d.h. zwischen Cytosol und Plastiden, sind in der Literatur eine Reihe von Untersuchungen beschrieben. Es wird allgemein angenommen, dass im Cytosol lediglich ein unvollständiger OPPP vorhanden ist. Dieser könnte z.B. in Spinat nur bis zur Stufe von Ru5P, dem Endprodukt des oxidativen Teils, ablaufen; sämtliche Enzyme des nicht-oxidativen Teils wären strikt plastidär (Schnarrenberger et al., 1995). Debnam und Emes zeigten 1999, dass in Tabak ein Teil der TK- und TA-Aktivitäten cytosolisch ist. Dagegen berichteten Henkes und Mitarbeiter (2001), dass keine signifikanten Aktivitäten dieser beiden Enzyme im Cytosol von Tabak festzustellen seien. Es wurden auch einzelne Enzyme kloniert, die jedoch ausschließlich plastidäre Isoformen repräsentieren (RPI, Martin et al., 1996; TK, Flechner et al., 1996; RPE, Nowitzki et al., 1995). Erst vor kurzem konnten cytosolische RPEasen aus Reis, Mais und *Arabidopsis* charakterisiert werden (Kopriva et al., 2000). Vor diesem

Hintergrund zum Teil widersprüchlicher Ergebnisse war es von Interesse, die Situation in *Arabidopsis* genauer zu untersuchen. Dazu wurde ein *in silico*-Ansatz gewählt. Das vollständig sequenzierte und veröffentlichte Genom dieser Pflanze (Arabidopsis Genome Initiative, 2001) ermöglicht eine schnelle und umfassende Suche nach Isoformen bestimmter Enzyme auf der Basis von Sequenzhomologien. Falls die gesuchten Gene nicht als solche annotiert sind, können bereits charakterisierte Isoformen aus anderen Spezies (s.o.) als Vorlage dienen. Zusammen mit der mittlerweile sehr zuverlässigen *in silico*-Vorhersage von Proteinlokalisierungen (Schwacke et al., 2003) ist es so möglich, mit großer Sicherheit plastidäre von cytosolischen Isoformen zu unterscheiden.

Die Untersuchung der *GenBank*-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Benson et al., 2002) zeigt, dass in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen von Kopriva und Mitarbeitern cytosolische Isoformen der RPE und RPI in höheren Pflanzen weit verbreitet sind. Die Aminosäuresequenz der cytosolischen RPE aus *Arabidopsis* weist dabei eine größere Identität zu RPEasen aus Hefe und tierischen Zellen auf, als zu den plastidären Isoformen anderer Pflanzen (Nowitzki et al., 1995). Es kann also davon ausgegangen werden, dass in Pflanzenzellen cytosolisches Ru5P sowohl zu Rib5P als Substrat für die Nukleotidbiosynthese als auch zu Xu5P als Substrat des XPT umgewandelt werden kann. Im Gegensatz dazu konnten keine cytosolischen Isoformen der TK und TA gefunden werden; beide Enzyme sind auf die Plastiden beschränkt. Das bedeutet, dass es im Cytosol der Zelle nicht möglich ist, Pentosephosphate in TP und Hexosephosphate umzuwandeln. Obwohl natürlich nicht ausgeschlossen werden kann, dass weniger oder nicht-homologe *TK*- und *TA*-Gene übersehen wurden, erscheint es doch unwahrscheinlich. Im Ausnahmefall der trockenoleranten *Craterostigma plantagineum* (Wiederauferstehungspflanze) existieren zwei cytosolische und eine plastidäre Isoform der TK, wobei die beiden ersten eine Rolle im Trockenresistenz-spezifischen Oktulose-Metabolismus der Pflanze spielen. Alle drei Isoformen werden jedoch von sehr homologen Genen kodiert (Bernacchia et al., 1995). Bis auf den Bericht von Debnam und Emes (1999) sprechen somit die experimentellen Daten aus Spinat, Mais und Erbse gegen das Vorhandensein von TK und TA im Cytosol höherer Pflanzen (Henkes et al., 2001).

Insgesamt kann der OPPP im Cytosol von *Arabidopsis* bis zur Stufe der isomeren bzw. epimeren Pentosephosphate Ru5P, Rib5P und Xu5P ablaufen, aber nicht darüber hinaus. Zu diesem Ergebnis kommen auch Kruger und von Schaewen (2003). Dadurch gewinnt der Transport von Xu5P durch den XPT an Bedeutung, da dieser Metabolit nur innerhalb der Plastiden weiter umgesetzt werden kann. Es sei jedoch einschränkend gesagt, dass die

Verteilung der OPPP-Enzyme in *Arabidopsis* nicht generell auf alle höheren Pflanzen zutreffen muss.

4.1.5. Pentosephosphattransport unter Staunässe

Die bisherigen Daten weisen dem XPT eine möglicherweise wichtige Rolle bei der Verbindung von cytosolischem OPPP und plastidärem oxidativem und reduktivem Pentosephosphatweg zu. Unter der Annahme, dass auch der cytosolische OPPP einen erhöhten Bedarf an Shikimatweg-Derivaten zu decken hilft, könnte diese Funktion zum Tragen kommen. Es wurde gezeigt, dass der Calvinzyklus nur in sehr begrenztem Umfang Ery4P für den Shikimatweg zur Verfügung stellen kann, ohne selbst zum Erliegen zu kommen (Geiger and Servaites, 1994). Der cytosolische OPPP hingegen könnte diesen Metaboliten in größeren Mengen liefern, sofern der Nachschub an Xu5P durch den XPT gewährleistet würde. Dies wäre insbesondere unter Bedingungen von Belang, die zu einem erhöhten Bedarf an den Ausgangsmetaboliten des Shikimatswegs führen. Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* unter Staunässe führt zu einer vermehrten Akkumulation von Stärke und Anthocyanen; ein Effekt, der zuerst bei Zuckerfütterung beschrieben wurde (Tsukaya et al., 1991). Anthocyane lassen sich direkt auf den Shikimatweg zurückführen; deren massive Akkumulation sollte somit auch den Bedarf an Ery4P erhöhen. Eine Beteiligung des cytosolischen OPPP über den XPT könnte dabei durch eine erhöhte Transportaktivität von Xu5P gekennzeichnet sein.

Der Transport von P_a und Pentosephosphaten in Gesamtblattprotein von unter Staunässe angezogenen *Arabidopsis* ist im Vergleich zu Kontrollpflanzen deutlich erhöht (Abbildung 9 A). Die Erhöhung der P_a -Transportrate ist im Verhältnis stärker als die der Pentosephosphat-Transportraten, was wahrscheinlich an einer gesteigerten Aktivität auch anderer pPTs unter diesen Anzuchtbedingungen liegt. Dennoch ist auch ein Anstieg der XPT-Aktivität messbar. Ru5P und Xu5P werden mit in etwa gleichen Raten transportiert, und mit Rib5P zeigt sich eine geringere, aber nachweisbare Transportaktivität. Eine Möglichkeit zur Erklärung besteht in der Transportaktivität des AtGPT1. In Blättern von *Arabidopsis* ist *GPT1*-spezifisches Transkript nachweisbar. Dessen Expressionshöhe ist zwar schwach, aber nur wenig niedriger als die des *XPT*; allerdings konnte bislang keine Glk6P-Transportaktivität im Blatt festgestellt werden (Knappe, 2002). Gegen eine Beteiligung des GPT1 spricht auch im vorliegenden Fall die kaum messbare und stark schwankende Glk6P-Transportaktivität. Vermutlich kommt es durch die Verwendung von

Blattgesamtprotein für die Rekonstitution in Liposomen zu einer Kontamination mit löslichen Proteinen, die während der Aufarbeitung der Liposomen nicht oder nur teilweise beseitigt werden kann. Die löslichen Enzyme RPE und RPI könnten daher die Pentosephosphate in den Liposomen ineinander umwandeln (s. auch 4.1.3.1). Das bedeutet, dass der XPT wahrscheinlich für die erhöhten Transportraten aller drei getesteten Pentosephosphate verantwortlich ist und somit eine sehr deutliche Aktivitätszunahme zeigt.

4.1.6. Expressionsanalysen und Genstruktur

Während für den *AtGPT1* die Expression, jedoch nicht die Aktivität, in grünem Gewebe (Blättern) gezeigt wurde, wird das Gen in anderen Spezies vorwiegend in heterotrophen Geweben exprimiert, die z.B. der Langzeitspeicherung von Photoassimilaten dienen (Kammerer et al., 1998). Im Gegensatz dazu findet sich *XPT*-spezifisches Transkript in Blüte, Blatt, Stängel und Wurzel (Abbildung 10). Dieses Expressionsmuster lässt auf eine generelle Rolle des XPT-Proteins im Stoffwechsel schließen, wobei die Expression im Vergleich zu der des *TPT* deutlich schwächer ist. Dies wurde durch quantitative RT-PCR-Experimente bestätigt (Knappe, 2002). Der Grund für das offensichtliche Fehlen der *XPT*-Expression in Kronblättern, männlichen reproduktiven Organen (Abbildung 11) und zu Beginn der Fruchtentwicklung bleibt jedoch unklar. Das *XPT*-Gen ist, wie das des *TPT*, nur einmal im Genom von *Arabidopsis* vorhanden, während von *PPT* und *GPT* jeweils zwei Gene und eine Reihe von Pseudogenen existieren. Das *XPT*-Gen enthält im Gegensatz zu allen anderen pPT-Genen keine Introns. Die Bedeutung dieser Tatsache ist nicht klar, die Rolle von Introns in der Regulation einiger Gene in Mais (Rethmeier et al., 1997) ist bekannt; eine Rolle in der Evolution von Genstrukturen (Gilbert and Glynias, 1993) wird diskutiert (zusammengefasst in Knappe, 2002). Die Erstellung einer Datenbank ausschließlich 'Intron-loser' Gene soll die Möglichkeit bieten, Gemeinsamkeiten besser untersuchen zu können und so zur Aufklärung der Rolle von Introns in der Evolution von Genstrukturen beitragen (Sakharkar et al., 2002).

4.2. Die *xpt-1*-Mutante

In der vorliegenden Arbeit wurde in der Population der *AKF* eine *Arabidopsis*-Linie identifiziert, die eine Insertion im *XPT*-Gen trägt. Aus den Samen eines 9er *pools* wurden vier mutierte Linien isoliert. Aufgrund der molekularbiologischen und genetischen Analysen kann davon ausgegangen werden, dass die mutierte Pflanzenlinie 1.54 eine *knock-out*-Mutante des *XPT*-Gens darstellt. Die Mutante synthetisiert kein XPT-Protein mehr und kann daher als *xpt-1* bezeichnet werden. Diese Linie wurde weiteren Analysen unterzogen.

4.2.1. Phänotypen und pPT-Mutanten

Bei der Anzucht im Gewächshaus zeigt *xpt-1* im Vergleich zum Wildtyp keinen veränderten Phänotyp. Dieses Phänomen ist verbreitet (Thornycroft et al., 2001), und hat mehrere Gründe. Ein Grund liegt in der Redundanz von Genen. Bei *Arabidopsis* sind bis zu 70% der Gene in mehr als einer Kopie vorhanden, also redundant (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2001; Martinssen, 2000). In einem solchen Fall kann die ausgeschaltete Genfunktion von einer weiteren Kopie des Gens übernommen werden. Ein anderer Grund kann eine nicht vollständige Ausschaltung des von der Insertion betroffenen Gens sein. Im Fall der *tpt-1*-Mutante aus *Arabidopsis*, die unter Gewächshausbedingungen keinen veränderten Phänotyp hat, wurde gezeigt, dass eine T-DNA-Insertion 24 bp oberhalb des Startkodons noch zu einer schwachen, mittels RT-PCR detektierbaren Genexpression führt.

Der damit verbundene, fast völlige Verlust der TPT-Transportaktivität ist trotzdem nicht ausreichend, um einen veränderten Phänotyp hervorzurufen. Vielmehr wird die defekte Stoffwechselfunktion durch einen erhöhten Transport anderer Metabolite umgangen. In *tpt-1* wird verstärkt Glk durch den plastidären Glukosetransporter exportiert (Schneider et al., 2002). Es besteht also auch die Möglichkeit einer biochemischen Kompensation der fehlenden Genfunktion. Bei den pPTs könnte eine Kompensation sowohl durch ein zweites, funktionelles Gen (im Fall von *GPT*, *PPT*) als auch, aufgrund der sich überlappenden Substratspezifitäten, einen Translokator einer anderen Unterfamilie möglich sein. In *tpt-1* wurde jedoch keine erhöhte Aktivität anderer pPT-Proteine festgestellt. In der *cue-1*-Mutante aus *Arabidopsis*, die einen Defekt im *PPT1* hat und einen retikulierten

Blattphänotyp zeigt (Streatfield et al., 1999), ist das funktionelle, endogene PPT2-Protein nicht in der Lage, den Ausfall zu kompensieren. Der Grund hierfür liegt in der differentiellen räumlichen Expression der beiden Gene (Knappe et al., 2003b). *AtGPT1* ist zur Zeit Gegenstand intensiver Untersuchungen, scheinbar ist jedoch eine homozygote *knock-out*-Mutation lethal (P. Niewiadomsky, persönliche Mitteilung). Auch in diesem Fall kann der endogene *GPT2* aufgrund seiner differentiellen räumlichen Expression (Knappe, 2002) den Ausfall offensichtlich nicht kompensieren. Diese Beispiele zeigen, dass eine pPT-interne Kompensation bisher nicht evident ist und dadurch unterschiedlichste Phänotypen hervorgerufen werden.

Im Fall von *xpt-1* ist wie in *tpt-1* ein *single-copy*-Gen betroffen, ohne dass unter Gewächshausbedingungen ein veränderter Phänotyp zu beobachten wäre. Zusätzlich existiert mit *GPT1* ein zweiter Translokator, der prinzipiell XPT-Funktionen übernehmen könnte und dessen Transkript auch im Blatt nachweisbar ist. Dem gegenüber steht, dass eine *GPT*-Aktivität im Blatt bisher nicht beobachtet werden konnte (4.1.5; Knappe 2002). Welche Auswirkungen auf den Stoffwechsel sind vor diesem Hintergrund in *xpt-1* zu erwarten?

4.2.2. Veränderungen im Metabolismus von *xpt-1*

4.2.2.1. Sekundärmetabolite

Eine Steigerung der Gehalte an Lichtschutzpigmenten wie Anthocyanen und Flavonen ist unter Anzuchtbedingungen wie Hochlicht und UV-B zu erwarten (Dixon and Paiva, 1995; Li et al., 1993) und als Reaktion auf diesen Stress zu werten. Überraschenderweise akkumulieren in *xpt-1* deutlich mehr Anthocyane in den Blättern als im Wildtyp. Die Anthocyanengehalte der Blätter sind in *xpt-1* bereits unter Normallicht tendenziell gegenüber dem Wildtyp erhöht. Der Anstieg unter Hochlicht und UV-B ist jedoch mit einer Vervierfachung sehr viel stärker als im Wildtyp, wo sich die Gehalte verdreifachen (Abbildung 17). Vor dem Hintergrund der bisherigen Untersuchungen und der darauf aufbauenden Annahmen zur Funktion des XPT *in vivo* ist dieser Befund unerwartet und wird u.a. noch im Kontext von Zuckergehalten (4.2.2.2) und Photosynthese (4.2.2.3) weiter diskutiert.

Bei Betrachtung der Flavonoidprofile zeigt sich ein ähnlicher Trend, der hier allerdings unter Normallicht-Bedingungen auftritt. Wie der quantitative Vergleich (Abbildung 18 C)

der relativen Signalstärken (*peak areas*) zeigt, sind in *xpt-1* die beiden Hauptkomponenten zumindest tendenziell stärker vertreten als im Wildtyp. Die unter Hochlicht und UV-B offensichtliche Induktion (Abbildung 18 D) gleicht diese Unterschiede jedoch aus. Gehalte und Elutionsprofile (Abbildung 18 B) sind unter diesen Anzuchtbedingungen in Wildtyp und Mutante gleich, so dass insgesamt ein Effekt von Hochlicht und UV-B auf das Profil und die Menge der Flavonoide feststellbar ist, was zu erwarten war (Lois, 1994; Lois and Buchanan, 1994).

4.2.2.2. Zucker- und Stärkegehalte

Die gemessenen Gehalte löslicher Zucker im Wildtyp sind durchaus vergleichbar mit Literatur- (Kofler, 2000; Schneider et al., 2002; Voll, 2001) und Erfahrungswerten. Naturgemäß schwanken die Gehalte, ähnlich den Photosyntheseparametern (4.2.2.3), generell zwischen verschiedenen Ökotypen und Anzuchtbedingungen, was die Interpretation der Messergebnisse im Bezug auf metabolische Veränderungen erschwert. Im Wildtyp sind die Gehalte an Glk, Fru und Sac relativ niedrig und im Fall von Glk einer leichten diurnalen Schwankung unterworfen (Abbildung 20). Die Gehalte an löslichen Zuckern in *xpt-1* sind unter Normallicht auffällig höher als im Wildtyp, wobei im Tagesverlauf keinerlei Änderungen festzustellen sind. In der Literatur ist die Abhängigkeit der Anthocyangehalte von löslichen Zuckern bereits beschrieben worden (Mita et al., 1997; Mita et al., 1995). Der Promotor eines der Schlüsselenzyme der Flavonoidsynthese, der Chalconsynthase (CHS), reagiert positiv auf Zucker (Tsukaya et al., 1991). Eine positive Korrelation der Zuckergehalte (inklusive Stärke) mit den Anthocyangehalten wurde auch von Voll (2001) für den Ökotyp Col-0 gezeigt. Somit können die bereits unter Normallicht in *xpt-1* tendenziell erhöhten Anthocyangehalte (4.2.2.1) durch die hohen Gehalte löslicher Zucker hervorgerufen werden. Auch ist ein Einfluss auf die unter Normallicht niedrigere ETR in *xpt-1* (4.2.2.3) vorstellbar. Die Beteiligung von Zuckern in der Repression von Photosynthesegenen ist bekannt (Jang et al., 1997; Jang and Sheen, 1994), und könnte auch hier vorliegen.

Die deutliche Abnahme der Gehalte unter Hochlicht und UV-B ist wahrscheinlich eine Folge des verstärkten Stoffwechselflusses in Richtung der Stärkesynthese. Der massive Anstieg der Stärkegehalte in *xpt-1* unter Hochlicht und UV-B korreliert mit dem starken Anstieg der Anthocyangehalte, der wiederum auf den zusätzlich wirkenden Licht- und UV-

B-Stress zurückgeführt werden kann (Dixon and Paiva, 1995; Li et al., 1993). Die genauen Zusammenhänge sind noch nicht eingehend untersucht worden.

Somit ist in *xpt-1* eine positive Korrelation der Gehalte löslicher Zucker und Anthocyane unter Normallicht bzw. der Stärke- und Anthocyangehalte unter Hochlicht und UV-B evident. In abgeschwächter Form findet sich dieser Effekt auch im Wildtyp wieder, wo sich eine weniger drastische Steigerung der Stärkegehalte ebenfalls in einer messbaren Erhöhung der Anthocyangehalte widerspiegelt.

4.2.2.3. Photosyntheseleistung

Die Photosynthese ist, in Reaktion auf kleinste Veränderungen der äußeren Bedingungen, Schwankungen unterworfen (Bailey et al., 2004), was insbesondere bei einer nicht ausreichend großen Anzahl von Messungen unter exakt gleichen Bedingungen ins Gewicht fallen kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine tiefgreifende Untersuchung der einzelnen Parameter in diesem Sinne nicht durchgeführt, was die Aussagekraft der Messungen zwar einschränkt, jedoch Hinweise auf die tatsächlichen Verhältnisse liefert.

Die Messung der Photosyntheseleistung unter Fließgleichgewichtsbedingungen zeigt geringe Unterschiede zwischen Wildtyp und *xpt-1*, wie aus Tabelle 4 hervorgeht. Auffällig ist die in der Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlichere Erhöhung von ETR, Φ PSII und q_p . Unter Normallicht ist die ETR in *xpt-1* niedriger als im Wildtyp, unter Hochlicht und UV-B jedoch höher. Diese größere Differenz lässt auf eine höhere Flexibilität in der Anzahl aktiver PSII-Reaktionszentren in *xpt-1* schließen, da die ETR direkt mit der Quantenausbeute des PSII korreliert (Genty et al., 1989). Somit scheint *xpt-1* sich besser an veränderte bzw. höhere Lichtintensitäten anpassen zu können als der Wildtyp. Dies kann eine direkte Folge der erhöhten Anthocyangehalte sein. Wahrscheinlich ist der Photosyntheseapparat hier aufgrund einer besseren Abschirmung weniger stark beeinträchtigt (Beggs et al., 1987).

Bei q_p ist ein ähnliches Verhalten zu beobachten. q_p bezeichnet den Anteil der Gesamtfluoreszenzlöschung durch linearen Elektronentransport und korreliert mit dem Redoxzustand des primären Chinon-Redoxakzeptors im PSII, Q_A^- . Die Q_A^- -Reoxidationskinetiken zeigen keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante bzw. Normallicht und Hochlicht und UV-B. Dies bedeutet, dass nachgeschaltete Reaktionen, in denen letztendlich die Elektronen verbraucht werden (wie z.B. der Calvinzyklus), gleich schnell angeschaltet werden. Die unter Hochlicht und UV-B in *xpt-1* höhere Akzeptanz für

Elektronen aus dem linearen Elektronentransport (q_p) muss sich nicht unbedingt in den Kinetiken widerspiegeln. Möglicherweise liegt in *xpt-1* ein im Vergleich zu anderen Photosynthesekomponenten vergrößerter Plastochinonpool vor, der zwar gleich schnell reoxidiert wird, aber mehr Elektronen aufnehmen kann als im Wildtyp (s.u.).

Im Vergleich zur ETR und zu q_p verhält sich q_N umgekehrt. Während q_N in *xpt-1* unter Normallicht gegenüber dem Wildtyp erhöht ist, sinkt der Wert unter Hochlicht und UV-B und ist niedriger als im Wildtyp. Man kann hier einen in *xpt-1* unter Hochlicht und UV-B weniger steilen pH-Gradienten über der Thylakoidmembran (q_{NE}) als maßgebliche Komponente vermuten (Krause and Weis, 1991). Der geringere Anteil thermischer Dissipation von Anregungsenergie am PSII könnte mit dem erhöhten q_p , also der vermehrten "regulären" Dissipation von Anregungsenergie, zusammenhängen bzw. mit dem bereits erwähnten, vergrößerten Plastochinonpool, dessen Reduktion mehr Elektronen erfordert. Als weitere Möglichkeit kann eine stärkere Photoinhibition im Wildtyp unter Hochlicht und UV-B nicht ausgeschlossen werden.

Die Lichtsättigungskurven (Abbildung 19) zeigen, dass unter Normallicht die ETR in *xpt-1* deutlich früher gesättigt ist als im Wildtyp. Unter Hochlicht und UV-B zeigt die Mutante jedoch eine bessere Adaption an die hohen Lichtintensitäten; die ETR ist mit steigender PFD höher als im Wildtyp. Eine Sättigung ist bis zu einer PFD von ca. $750 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ nicht zu beobachten. Auch q_N und q_p zeigen bei Aufnahme der Lichtsättigungskurven das bereits oben beschriebene Verhalten. Insgesamt werden die Messungen unter Fließgleichgewichtsbedingungen dadurch bestätigt.

Die F_v/F_m -Verhältnisse bleiben in *xpt-1* und Wildtyp innerhalb der Anzuchtbedingungen nahezu gleich. Ein in *xpt-1* gegenüber *Ws-2* tendenziell höheres F_v/F_m -Verhältnis unter Hochlicht und UV-B zeigt, dass weniger Antennenpigmente vorliegen bzw. nötig sind. Dies kann als weiterer Hinweis auf eine in der Mutante bessere Adaption an die hohen Lichtintensitäten gewertet werden.

4.2.2.4. Wachstumsverhalten und Chlorophyllgehalte

Unter Hochlicht und UV-B-Strahlung ist gegenüber Normallicht eine deutliche Zunahme des spezifischen FG in Wildtyp und Mutante zu beobachten (Abbildung 15). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass beide Linien unter diesen Bedingungen einen kleineren und kompakteren Wuchs zeigen. Es ist berichtet worden, dass UV-B-Strahlung einen solchen Effekt auf das Wachstum von Pflanzen ausübt (Tevini and Teramura, 1989). Insofern kann

das gegenüber dem Wildtyp in *xpt-1* nur leicht erhöhte spezifische FG unter Hochlicht und UV-B nicht als ein durch die Mutation verursachter Effekt gedeutet werden. Die Blühzeitpunkte von unter Kurz- und Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen zeigen darüber hinaus keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante (O. Zobell, persönliche Mitteilung). Die Gehalte an Chlorophyll sind beim Wildtyp und bei *xpt-1* sowohl unter Normallicht als auch unter Hochlicht und UV-B gleich; unter Hochlicht und UV-B sinken die Gehalte. Eine Abnahme der Chlorophyllgehalte oder eine verminderte Akkumulation von Chlorophyll unter Hochlicht ist bei Gräsern mehrfach gezeigt worden (Jagtap et al., 1998; Król et al., 1999). Das unveränderte Chlorophyll a/b-Verhältnis zeigt, dass die Stöchiometrie der photosynthetischen Protein-Pigmentkomplexe zwischen Wildtyp und Mutante bzw. Normallicht und Hochlicht und UV-B keinen Änderungen unterworfen ist. Bei Chlorophyllgehalten und -komposition ist keine Benachteiligung der Mutante gegenüber dem Wildtyp vorzuliegen.

4.2.2.5. Cytosolische OPPP-Aktivitäten und Redoxstatus

Der cytosolische OPPP kommt als Lieferant von C₅-Körpern für die Plastiden in Frage. Darüber hinaus wurde von Averill und Mitarbeitern (1998) gezeigt, dass der cytosolische OPPP, neben der Versorgung des Cytosols mit NADPH, unter Bedingungen erhöhten Bedarfs auch eine Rolle in der Versorgung der Plastiden mit Reduktionsäquivalenten spielt. Die Untersuchung der Aktivitäten des Schlüsselenzyms in *xpt-1* und Wildtyp könnte Aufschluss über eine mögliche Funktion des XPT in diesem Zusammenhang geben. Die gemessenen G6P-DH-Aktivitäten zeigen lediglich minimale Unterschiede (Abbildung 21). Unter Hochlicht und UV-B ist eine Erhöhung der Enzymaktivität im Wildtyp feststellbar, die einen unter Lichtstress erhöhten Bedarf an Reduktionsäquivalenten oder eine erhöhte Forderung von C₅-Körpern aus dem Cytosol widerspiegeln könnte. Eventuell besteht hier ein Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit von löslichen Zuckern und der höheren Belichtung; vor kurzem wurde gezeigt, dass die cytosolische G6P-DH aus Kartoffel auf transkriptioneller Ebene durch die Zuckerverfügbarkeit und durch kontinuierlich eingestrahktes Licht hochreguliert wird (Hauschild and von Schaewen, 2003). Ein Einfluss auf die Erhöhung der G6P-DH-Aktivitäten im Wildtyp unter Hochlicht und UV-B ist in diesem Sinn zu erwarten, da zusätzlich zum Licht die Zuckergehalte erhöht sind. In *xpt-1* bleibt die G6P-DH-Aktivität unter Normallicht sowie Hochlicht und UV-B unverändert. Vorstellbar wäre ein Rückstau von Pentosephosphaten in *xpt-1*, wodurch die G6P-DH bzw.

eine Steigerung ihrer Aktivität inhibiert wird. Eine solche Produkthemmung der cytosolischen G6P-DH durch NADPH ist bekannt, jedoch für andere Metabolite bisher nicht gezeigt worden. Insgesamt bleiben die Aktivitätsänderungen klein, darüber hinaus sind die subzellulären Zuckergehalte bzw. Konzentrationen unbekannt, was eine Aussage über die möglicherweise vorliegenden Ursachen und Wirkungen weiter relativiert.

Im OPPP generierte Reduktionsäquivalente können über die NADPH-abhängige GR auch den Redoxstatus des Glutathionpools beeinflussen (Noctor et al., 2002). Die gemessenen GSH- und GSSG-Gehalte und der Redoxstatus (Abbildung 22, Tabelle 5) jedoch zeigen, dass zwischen *xpt-1* und Wildtyp bzw. den Anzuchtbedingungen keine deutlichen Unterschiede auftreten. Die Gehalte an GSH unter Normallicht entsprechen denen aus Pappel (Noctor et al., 1996) und auch aus *Arabidopsis* (D. Wormuth, persönliche Mitteilung). Unter Hochlicht und UV-B kommt es zu einem Anstieg der Expression von "antioxidativen" Genen (Rossel et al., 2002). Die deutliche Steigerung der GSH-Gehalte ist wahrscheinlich auch eine direkte Folge dieser Anzuchtbedingungen. GSH spielt eine wichtige Rolle beim Schutz von Proteinen vor Oxidation und in der zellulären Abwehr (Baier and Dietz, 1998). Darüber hinaus ist der Reduktionsgrad, also der Anteil reduzierten Glutathions am Gesamtglutathiongehalt zwischen Wildtyp und Mutante gleich (ca. 72%).

4.3. XPT und *xpt-1*: Fazit und Versuch einer Integration

Die aufgrund der biochemischen Charakterisierung anzunehmende physiologische Funktion des XPT ist der Transport von cytosolischem Xu5P in die Plastiden, um dort die weitere Umsetzung dieses Pentosephosphates zu ermöglichen (Abbildung 24).

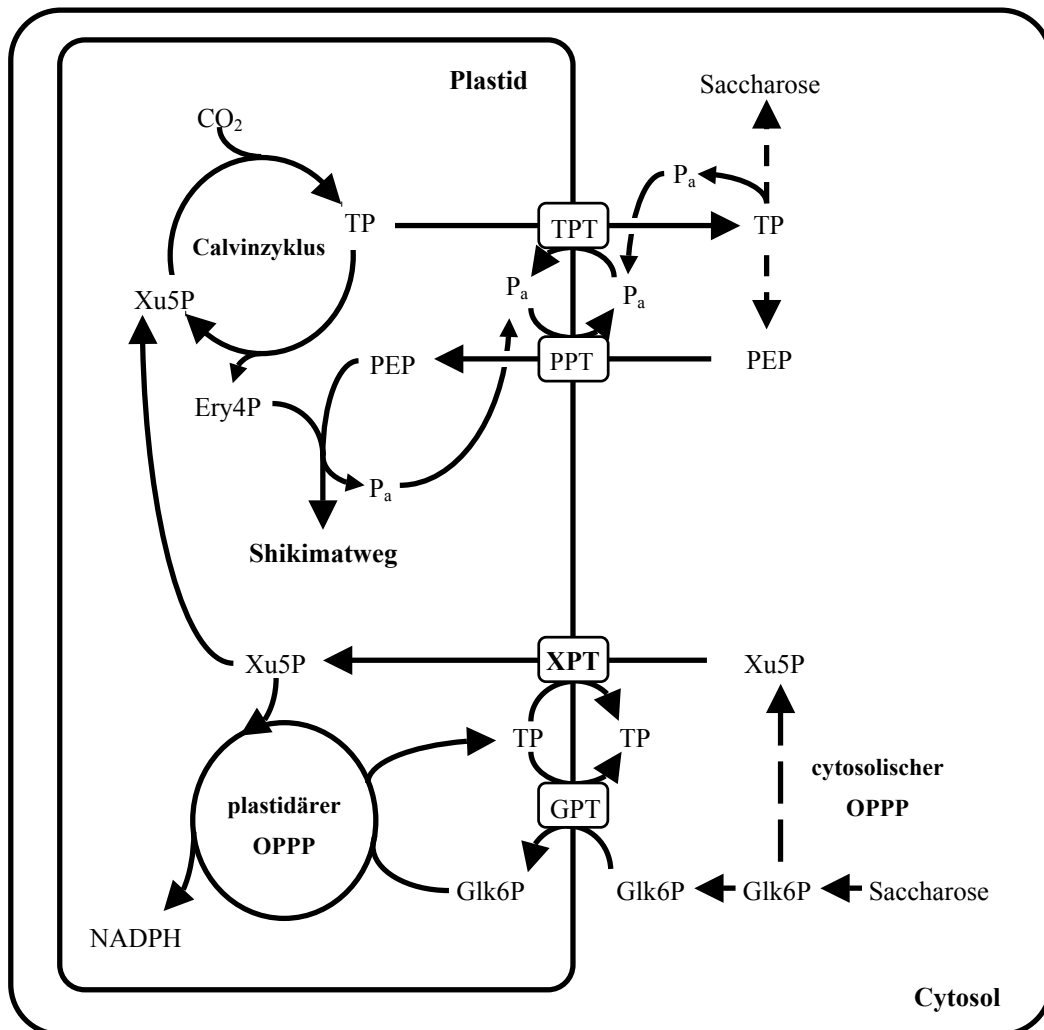


Abbildung 24. Schematische Darstellung der möglichen Funktionen und Interaktionen der vier pPT-Proteine im Stoffwechsel von *Arabidopsis*. Der TPT exportiert Photoassimilate aus dem Calvinzyklus in Form von TP in das Cytosol. Dort werden diese glykolytisch zu PEP umgesetzt. PEP wird vom PPT in die Plastiden importiert und dient als Substrat des Shikimatwegs. Der GPT importiert Glk6P als Substrat für Stärke- und Fettsäurebiosynthese (nicht gezeigt), aber auch für den OPPP in die Plastiden. Es entstehen u.a. NADPH und TP; letztere können als Gegentauchsubstrat für den GPT und den XPT dienen. Der XPT transportiert Xu5P, das im cytosolischen OPPP aus Glk6P gebildet wird, in die Plastiden. Xu5P kann sowohl im plastidären OPPP als auch im Calvinzyklus als Substrat dienen.

Xu5P ist ein Zwischenprodukt sowohl des Calvinzyklus als auch des OPPP. Beide Stoffwechselwege liefern u.a. Kohlenstoffgerüste für andere Biosynthesewege. Rib5P ist Ausgangsmolekül der Synthese von Nukleotiden, Ery4P ist, zusammen mit PEP, Ausgangsmolekül des Shikimatwegs, aus dem eine große Anzahl an Sekundärmetaboliten entsteht (Dennis et al., 1997). Es ist gezeigt worden, dass unter bestimmten Bedingungen bis zu 20% des von der Pflanze fixierten Kohlenstoffs in die Synthese aromatischer Verbindungen fließen, die dem Shikimatweg entstammen (Herrmann and Weaver, 1999). Der Calvinzyklus ist kaum in der Lage, den Bedarf an Ery4P zu decken, ohne selbst zum Erliegen zu kommen (Geiger and Servaites, 1994). In Tabak führt eine Reduktion der plastidären TK-Aktivität, und damit ein eingeschränktes Angebot an Ery4P, zur Inhibition der Photosynthese und einer signifikant verringerten Verfügbarkeit aromatischer Aminosäuren und löslicher Phenylpropanoide (Henkes et al., 2001). Die *cue1*-Mutante, die einen Defekt im *PPT* und damit in der Versorgung des Stromas mit PEP aus dem Cytosol aufweist, zeigt u.a. geringere Gehalte an Phenylalanin und einen verringerten Sekundärstoffwechsel (Voll et al., 2003). Es ist offensichtlich, dass der pflanzliche Sekundärmetabolismus bei einer mangelnden Versorgung mit Produkten des Primärmetabolismus deutlichen Einschränkungen unterworfen sein kann. Unter Bedingungen eines erhöhten Bedarfs an Metaboliten des Calvinzyklus und des OPPP könnte der XPT die Plastiden mit Kohlenstoffgerüsten in Form von Xu5P aus dem Cytosol versorgen und so eine Schlüsselrolle in der Kooperation des cytosolischen und plastidären OPPP spielen. Die bereits diskutierten Ergebnisse der Transportmessungen unter Staunässe (4.1.5) unterstützen diese These. Die tatsächliche Funktion *in planta* kann jedoch nicht auf dieser Basis allein bewertet werden. Bei *xpt-1* handelt es sich um eine *knock-out*-Mutante, die nicht mehr in der Lage ist, funktionelles XPT-Protein zu synthetisieren. Wie reagiert die Pflanze auf den Wegfall des XPT?

Wie die in der Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhten Anthocyangehalte zeigen, ist *xpt-1* aufgrund des fehlendes Proteins keinesfalls in der Synthese von Anthocyanen limitiert. Dies spricht gegen die postulierte physiologische Funktion, denn im Sinne der bisherigen Überlegungen hätte man gerade hier ein Defizit erwartet. Im Gegenteil zeigt die Mutante noch eine sehr viel stärkere Reaktion als der Wildtyp. Flavonoide, die sich wie Anthocyane auf den Shikimatweg zurückführen lassen, sind in *xpt-1* kaum verändert und werden, wie auch im Wildtyp, unter UV-Licht verstärkt gebildet. Insgesamt ist keine Limitation des Shikimatwegs feststellbar, so dass man annehmen muss, dass die plastidären Pentosephosphatwege, OPPP und Calvinzyklus, jederzeit genügend Vorstufen zur Verfügung stellen können und nicht auf eine Versorgung aus dem Cytosol

durch den XPT angewiesen sind. Die ETR der Mutante ist gegenüber dem Wildtyp unter Normallicht niedriger, unter Hochlicht und UV-B höher, was im Zusammenhang mit den Gehalten an löslichen Zuckern bzw. den Anthocyangehalten stehen könnte. Dabei stellt sich die prinzipielle Frage, inwiefern die beobachteten Änderungen der photosynthetischen Parameter bedeutsam sind. Die Gehalte an löslichen Zuckern sind in der Mutante unter Normallicht deutlich höher als im Wildtyp, was mit tendenziell erhöhten Anthocyangehalten korreliert. Unter Hochlicht und UV-B hingegen ist der Stärkegehalt, parallel zur Anthocyanakkumulation, drastisch erhöht. Das Zusammenspiel von Zucker-, Stärke- und Anthocyanakkumulation ist als allgemeines Stresssymptom bekannt (Li et al., 1993; Mita et al., 1997; Tsukaya et al., 1991) und auch bei *xpt-1* feststellbar. Die kausalen Zusammenhänge sind hingegen noch nicht genügend untersucht. Die Analyse einer Mutante aus Mais mit einem Defekt der cytosolischen 6PG-DH zeigt, dass der cytosolische OPPP unter Bedingungen erhöhten Bedarfs an NADPH auch eine Rolle in der Versorgung der Plastiden mit Reduktionsäquivalenten spielt (Averill et al., 1998). Der Mechanismus dieses Transfers ist zwar unklar, könnte aber die Aktivität des XPT mit einbeziehen. Cytosolisches Xu5P könnte im plastidären OPPP zu Hexosephosphaten regeneriert und zur Gewinnung von NADPH genutzt werden. Eine weitere Funktion hat der OPPP bei der Reaktion der Pflanzenzelle auf oxidativen Stress. Die im OPPP generierten NADPH liefern Elektronen zur Reduktion sogenannter reaktiver Sauerstoffspezies wie Superoxid (O_2^-) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2). In Pflanzen läuft dieser Prozess über den Ascorbat-Glutathion-Zyklus ab (Noctor and Foyer, 1998); hierbei ist die Glutathion-Reduktase von NADPH aus dem OPPP abhängig (Noctor et al., 2002). Die Aktivität der cytosolischen G6P-DH in *xpt-1* gibt jedoch keine konkreten Hinweise auf das Fehlen des XPT-Proteins. Die Glutathionpools und der Redoxstatus in Wildtyp und Mutante zeigen ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede, darüber hinaus ist der Anstieg der GSH-Gehalte unter Hochlicht und UV-B in Wildtyp und Mutante gleich stark. Eine Beteiligung des XPT an der Versorgung der Plastiden mit cytosolischem NADPH kann somit ausgeschlossen werden. Die überprüften Wachstums-Charakteristika der Mutante sind im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert, gleiches gilt für Chlorophyllgehalte und -komposition.

Die Differenzen zwischen Mutante und Wildtyp bezüglich der Sekundärmetabolite und Photosyntheseparameter lassen sich möglicherweise direkt oder indirekt auf die Zuckergehalte und/oder den Lichtstress zurückführen. Interpretiert man die unter Normallicht-Bedingungen in *xpt-1* höheren Zuckergehalte als zentrales Merkmal, so lassen sich die leicht erhöhten Anthocyangehalte und niedrigere ETR im Vergleich zum Wildtyp

darauf zurückführen. Ein direkter Beweis fehlt, jedoch ist es nicht abwegig, in den veränderten Zuckergehalten einen direkten oder indirekten Effekt des fehlenden XPT zu vermuten. Wie bereits erwähnt, hängt der Shikimatweg nicht von der Zufuhr von cytosolischen Pentosephosphaten ab. Der Import von Xu5P würde also lediglich der "Entlastung" des Cytosols von diesen Metaboliten dienen. Unter diesem Gesichtspunkt wäre eine massive Akkumulation von Pentosephosphaten im Cytosol infolge des fehlenden XPT als Ursache für metabolische Störungen denkbar, die sich auf die Zuckergehalte auswirken, was wiederum eine unspezifische Stressreaktion auslöst. Mit der Anzucht unter Hochlicht und UV-B kommt ein zusätzlicher Stress zum Tragen, der zur überproportional verstärkten Akkumulation von Anthocyanen und Stärke in *xpt-1* führt. Dies hat wiederum Auswirkungen auf die Photosynthese, die besser angepasst erscheint bzw. die Zuckergehalte, die sinken. Hinsichtlich des Einflusses von Hochlicht und UV-B auf die Anthocyan- und Stärkeakkumulation zeigt der Wildtyp ein ähnliches, wenn auch schwächer ausgeprägtes Muster. Stark vereinfachend könnte man unter Normallicht von einem "Grundstress" in *xpt-1* gegenüber dem Wildtyp sprechen, der sich bei Anzucht unter Hochlicht und UV-B in beiden Fällen durch zusätzliche Effekte noch verstärkt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen diejenigen der biochemischen Charakterisierung nicht belegen, aber auch nicht widerlegen können. Die beobachteten Symptome und deren Zusammenhang mit der Mutation im *XPT*-Gen bleiben weitgehend unklar. Die Abfrage der diversen Stoffwechselfparameter trägt somit nur ansatzweise zur Aufklärung der physiologischen Funktion des XPT bei. Insgesamt sind in *xpt-1* nur relativ unspezifische Stresssymptome und veränderte Zuckergehalte feststellbar, welche die wesentlichen Funktionen der Pflanze nicht beeinträchtigen. Welche Ursachen gibt es für das Ausbleiben eines veränderten Phänotyps? Offen bleibt die Frage hinsichtlich einer biochemischen Kompensation des XPT-Ausfalls in *Arabidopsis* durch den endogenen GPT1. Eine verstärkte *GPT*-Expression in Blättern bei Zuckerfütterung ist u.a. aus Kartoffel bekannt (F. Ludewig, persönliche Mitteilung); möglicherweise entsteht durch das Fehlen des XPT eine vergleichbare, metabolische *sink*-Situation. Die Expression von *AtGPT1* in *xpt-1* ist, wenn auch in Blättern nachweisbar, im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht. Unter Umständen ist diese geringe Expression bereits ausreichend, um den Wegfall des XPT-Proteins größtenteils zu kompensieren. Allerdings wurde eine entsprechende Aktivität in Blättern bisher nicht nachgewiesen.

4.4. Plastidäre Phosphattranslokatoren aus *Mesembryanthemum crystallinum*

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass Chloroplasten der CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* Transportsysteme für DHAP, PEP (Neuhaus et al., 1988), sowie Glk und Glk6P (Kore-eda and Kanai, 1997; Neuhaus and Schulte, 1996) enthalten. Da diese Metabolite u.a. Substrate plastidärer Phosphattranslokatoren darstellen, konnte von einer Beteiligung dieser Proteine an den Transportaktivitäten ausgegangen werden. Diese waren jedoch weder isoliert noch ihre physiologische Funktion im CAM untersucht worden. Die Ergebnisse anderer, an diesem Projekt beteiligter Arbeitsgruppen (Häusler et al., 2000) sollen zunächst diskutiert werden (4.4.1), soweit sie als Grundlage der Transportversuche angesehen werden können. Die Ergebnisse der physiologischen Messungen werden, sofern ein Zusammenhang besteht, mit den Ergebnissen der Transportversuche (4.4.2) diskutiert.

4.4.1. CAM-Induktion und Expressionsmuster

Fünf Tage nach Beginn des Salzstresses (3.3.1.1) zeigen sich in den Pflanzen deutliche Anzeichen für ein Einsetzen des CAM. *PPT*- und *GPT*-spezifische Transkripte steigen drastisch an (3.3.1.2) bzw. sind erst jetzt detektierbar. Die Induktion der Genexpression ist vergleichbar mit der des *PEPC*-Gens, das ebenfalls CAM-spezifisch hochreguliert wird (Cushman et al., 1989). Im Gegensatz dazu bleibt die Transkriptmenge des *TPT* (und des plastidären Glk-Transporters, *pGlkT*) in etwa gleich. Sie werden durch Salzstress nicht oder kaum induziert, was für andere Gene des C₃-Stoffwechsels bereits gezeigt wurde (Holtum and Winter, 1982; Winter et al., 1982). Die Expressionsstärke von *PPT* und *GPT* variiert im Tagesverlauf. Nach zwei bis drei Stunden im Licht erreichen beide ein Expressionsmaximum, vermutlich um einen erhöhten Bedarf an Transportaktivität zu decken. Zum Ende der Lichtperiode fallen die Transkriptmengen dann wieder ab. Die *TPT*-Transkriptmenge ist im Licht höher als im Dunkeln, ein Effekt, der sich auch in C₃-Pflanzen beobachten lässt. Der Promotor des *TPT* aus *Arabidopsis* enthält einige mögliche Lichtregulationselemente (Knappe, 2002); für den *TPT* aus Kartoffel ist eine lichtabhängige Expression ebenfalls gezeigt worden (Schulz et al., 1993). Das Expressionsmuster des *pGlkT* zeigt einen Anstieg gegen Ende des Tages, der bis sechs

Stunden in die Dunkelperiode anhält. Dies legt den Schluss nahe, dass ein vermehrter Transport von Glk aufgrund der hydrolytischen Stärkemobilisierung gegen Ende des Tages und zu Beginn der Dunkelperiode nötig ist.

4.4.2. Die Transportaktivitäten im Rahmen des CAM

4.4.2.1. Während der Dunkelperiode

Die tagsüber synthetisierte, transitorische Stärke wird nachts sowohl phosphorolytisch als auch hydrolytisch mobilisiert (Paul et al., 1993), über den glykolytischen Weg zu PEP umgesetzt und dient schließlich als Substrat für die PEPC. Analysen zeigten, dass neben Glk auch 3-PGA, TP und Glk6P Produkte dieses Abbaus sind (Neuhaus and Schulte, 1996). Zu Beginn der Dunkelphase akkumuliert Glk6P transient im Chloroplasten und schafft so einen steilen, auswärts gerichteten Gradienten. Dieser wird für den Export von Glk6P über den GPT ausgenutzt, der mit zunehmender Länge der Dunkelperiode schwächer exprimiert wird und auch weniger Transportaktivität zeigt.

Die für eine vermutlich chloroplastidäre Phosphofruktokinase (PFK, Häusler et al., 1987) spezifische Transkriptmenge steigt im Laufe der Dunkelperiode an, worin sich ein vermehrter stromalen Fluss von Glk6P über den glykolytischen Weg andeutet. Folglich können gegen Ende der Dunkelperiode vermehrt TP und 3-PGA aus den Chloroplasten exportiert werden, um im Cytosol die PEP-Synthese zu unterstützen. Dafür spricht auch der zu dieser Zeit auftretende Anstieg der *TPT*-Expression. Insgesamt erfordert also der Export der Produkte der nächtlichen Stärkemobilisierung ein konzertiertes Zusammenspiel von GPT und TPT (Abbildung 25, links).

4.4.2.2. Während der Lichtperiode

Der Anstieg der *PPT*-Transkriptmenge ca. 2 Stunden nach Einsetzen der Lichtphase und die Expression während derselben, gehen einher mit einer deutlichen Zunahme der Transportrate für PEP in diesem Zeitraum. Gleichzeitig steigt die Aktivität der plastidären Pyruvat-Phosphat-Dikinase (PPDK). Da sich das Enzym nur dort befindet (Winter et al., 1982), wird Pyruvat als Substrat für die PPDK in die Chloroplasten transportiert und dort unter Verbrauch von ATP und P_a zu PEP umgesetzt. Chloroplasten von *M. crystallinum*

können PEP jedoch nicht zu 3-PGA umsetzen, da ihnen die Phosphoglycerat-Mutase fehlt (Winter et al., 1982). Daher wird PEP vom PPT im Gegentausch mit P_a in das Cytosol transportiert. Hier wird PEP zu Glk6P umgesetzt, das importierte P_a wird für die chloroplastidäre PPK-Reaktion verwendet.

Die physiologischen Daten sprechen dafür, dass im Chloroplasten aus refixiertem CO_2 gebildete TP exportiert werden, um im Cytosol die Saccharosesynthese zu unterstützen. Die Transportaktivität für DHAP und die Expression des *TPT* sind während der Lichtphase leicht erhöht und ermöglichen dies. Der TPT liefert also wahrscheinlich in C_3 - und CAM-induzierten *Mesembryanthemum* TP für die während des Tages stattfindende Saccharosesynthese (Abbildung 25 rechts).

Um einen hohen, auswärts gerichteten TP-Gradienten aufrecht zu erhalten, muss ein umgekehrter Gradient für ein Gegentauschsubstrat, z.B. Glk6P, bestehen. Daraus kann man schließen, dass Glk6P für die Stärkebiosynthese durch den GPT in die Chloroplasten importiert wird, wofür mehrere Beobachtungen sprechen. Die *GPT*-Transkriptmenge und die Transportrate für Glk6P erreichen ihr Maximum parallel zur stromalen Stärkesynthese. In einer vergleichbaren Situation, nämlich in heterotrophen Plastiden von C_3 -Pflanzen, wird Glk6P ebenfalls für die Stärkesynthese importiert (Bowsher et al., 1992). Auch bei *source-sink*-Transitionen photoautotropher Gewebe ist die Induktion des *GPT* beobachtet worden (Quick et al., 1995). Scheinbar erlangen Chloroplasten die Fähigkeit zum Import von Glk6P, wenn die Stärkebiosynthese von der Zufuhr exogener Kohlenstoffgerüste abhängt.

4.4.3. Fazit

Die Chloroplasten CAM-induzierter *Mesembryanthemum crystallinum*-Pflanzen enthalten sowohl TPT-, PPT- als auch GPT-Aktivität (Abbildung 25). Die nur leichte CAM-spezifische Induktion und die größtenteils konstante Expressionshöhe des *TPT* reflektieren dessen Rolle im steten Export von TP aus den Chloroplasten, die in beiden Stoffwechselmodi die Biosynthese von Saccharose im Cytosol unterstützt. Während des CAM ist die TPT-Transportaktivität allerdings im Gegensatz zum C_3 -Stoffwechsel auch während der Nacht vorhanden. Die deutliche, CAM-spezifische Induktion von *PPT* und *GPT* und die ausgeprägten Tag/Nacht-Schwankungen in Expressionstärke und Transportaktivität deuten auf die besonderen Funktionen dieser Translokatoren im CAM hin. Der PPT importiert im C_3 -Stoffwechsel PEP als Vorstufe des Shikimatwegs in die

Chloroplasten. Im CAM hingegen exportiert er tagsüber PEP aus den Chloroplasten zur Synthese von Hexosephosphaten in das Cytosol. Diese dienen als Substrat des GPT, der Glk6P tagsüber zur Synthese transitorischer Stärke in die Chloroplasten importiert und damit in im photoautotrophen CAM-Gewebe die gleiche Funktion wie in heterotrophen Geweben des C₃-Stoffwechsels übernimmt. Nachts wird Glk6P als ein Produkt der Stärkemobilisierung durch den GPT wieder exportiert.

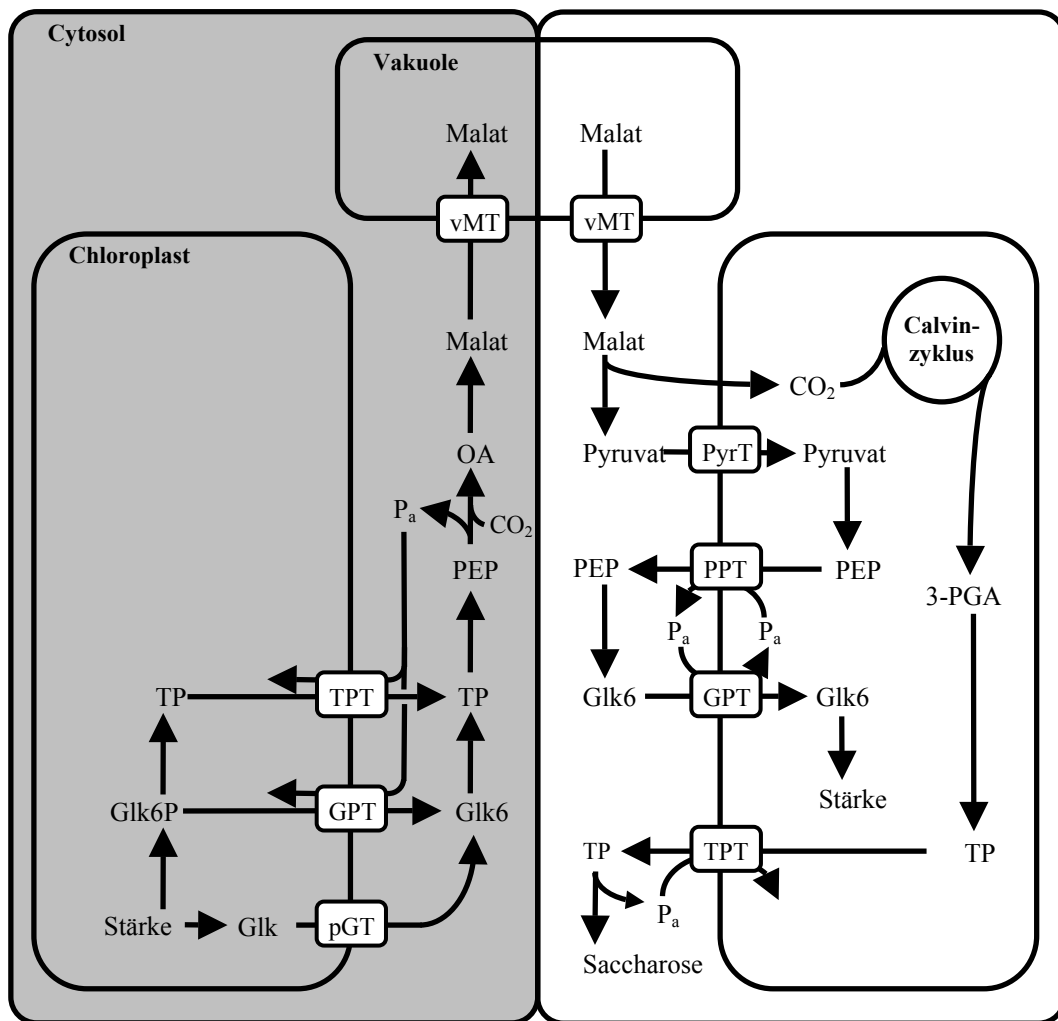


Abbildung 25. Schematische Darstellung der maßgeblichen metabolischen Vorgänge während des CAM in Blättern von *Mesembryanthemum crystallinum*. Während der nächtlichen Stärkedegradation (linke Hälfte, grau unterlegt) entstehen Glk, Glk6P und TP, die als Produkte aus den Plastiden exportiert werden können (pGT, plastidärer Glukosetransporter). Diese werden im Cytosol letztendlich zu PEP umgewandelt, das der Fixierung von CO₂ dient. Das Produkt, Malat, akkumuliert schließlich in der Vakuole (vMT, vakuolärer Malattransporter). Tagsüber (rechte Hälfte) wird Malat wieder aus der Vakuole transportiert und decarboxyliert. Das frei gewordene CO₂ wird im Calvinzyklus fixiert, wobei TP entstehen. Diese werden als Vorstufen der Saccharosesynthese in das Cytosol exportiert. Pyruvat als zweites Produkt der Malat-Decarboxylierung wird in die Plastiden importiert (PyrT, Pyruvattransporter) und dort zu PEP umgesetzt. PEP wiederum wird exportiert und im Cytosol zu Glk6P umgesetzt. Glk6P wird schließlich in die Plastiden importiert und dient als Vorstufe der Stärkebiosynthese. OA, Oxalacetat.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der ursprünglich als GPT-homologer Phosphatranslokator eingestufte EST-Klon 121I21T7 aus *Arabidopsis thaliana* für einen Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokator (AtXPT) kodiert. Der AtXPT bildet zusammen mit homologen Proteinen anderer Spezies die vierte Unterfamilie pflanzlicher Phosphatranslokatoren (pPT). Das rekombinante Protein wurde heterolog exprimiert und in nativem Zustand nahezu homogen dargestellt. Transportversuche im rekonstituierten System und Untersuchungen der kinetischen Eigenschaften des Proteins ergaben, dass unter physiologischen Bedingungen P_a , TP und Xu5P als Substrate des XPT in Frage kommen, nicht jedoch Hexosephosphate. Es stellte sich heraus, dass auch der rekombinante GPT aus Erbsenwurzel in der Lage ist, Pentosephosphate zu transportieren. Datenbankanalysen bezüglich der subzellulären Verteilung von Enzymen des OPPP in *Arabidopsis* zeigten, dass dieser Stoffwechselweg im Cytosol der Spezies nur bis zu den Pentosephosphaten Ru5P, Rib5P und Xu5P ablaufen kann, während in Plastiden ein vollständiger OPPP operiert. Transportversuche mit unter Staunässe angezogenen *Arabidopsis* zeigten zudem eine Erhöhung der Transportaktivität mit Pentosephosphaten im Vergleich zu normalen Anzuchtbedingungen. Auf dieser Basis wurde eine mögliche Funktion des XPT postuliert. Darin übernimmt der Translokator eine wichtige Rolle in der Kooperation zwischen cytosolischem und plastidärem OPPP, indem er Xu5P als Endprodukt des cytosolischen OPPP in die Plastiden transportiert. Dieser Funktion wurde eine potentiell große Bedeutung unter Bedingungen eines erhöhten Bedarfs an Ery4P für den Shikimatweg beigemessen.

Die Analyse der *knock-out*-Mutante des Translokators, *xpt-1*, konnte jedoch gerade den letzten Punkt widerlegen. Wie die massive Akkumulation von Anthocyanen und die Flavonoidprofile in der Mutante unter Hochlicht und UV-B zeigten, ist der Shikimatweg quantitativ und qualitativ nicht durch den Ausfall des XPT und das damit verbundene Ausbleiben des Imports von cytosolischem Xu5P limitiert. Vielmehr scheint sich durch die Mutation eine messbare Veränderung im Zuckerstoffwechsel zu ergeben, die, auf noch ungeklärte Weise, unspezifische Stresssymptome hervorruft. Insgesamt kommt es in *xpt-1* jedoch nicht zu einer wesentlichen Einschränkung der pflanzlichen Funktionen. Eine biochemische Kompensation durch den endogenen GPT1 ist unwahrscheinlich, kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

In der induzierbaren CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* wurden durch Transportversuche im rekonstituierten System sowohl TPT-, PPT- als auch GPT-Transportaktivitäten nachgewiesen. In Übereinstimmung mit physiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten die CAM-spezifischen Funktionen dieser pPT-Proteine aufgedeckt werden. Der TPT unterstützt in beiden Stoffwechselmodi die Synthese von Saccharose im Cytosol durch den Export von TP aus den Chloroplasten. Allerdings ist im Gegensatz zum C₃-Stoffwechsel auch während der Nacht eine TPT-Transportaktivität messbar. PPT und GPT zeigen starke diurnale Schwankungen der Transportaktivität, was auf ihre besonderen Funktionen im CAM hindeutet. Der PPT importiert im C₃-Stoffwechsel PEP als Vorstufe des Shikimatwegs in die Chloroplasten. Im CAM hingegen exportiert er tagsüber PEP aus den Chloroplasten zur Synthese von Hexosephosphaten in das Cytosol. Der GPT importiert tagsüber Glk6P zur Synthese transitorischer Stärke in die Chloroplasten und übernimmt damit in einem photoautotrophen Gewebe die gleiche Funktion wie in heterotrophen Geweben des C₃-Stoffwechsels. Nachts wird Glk6P als ein Produkt der Stärkemobilisierung durch den GPT wieder exportiert.

6. Abkürzungen

Abbildung	Abbildung
Ac	Acetat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CAM	engl.: <i>crassulacean acid metabolism</i> , Crassulaceen-Säurestoffwechsel
cDNA	engl.: <i>copy</i> -, (von mRNA) kodierte DNA
Ci	Curie
cpm	engl.: <i>counts per minute</i> , radioaktive Zerfälle pro Minute
d	Tag(e)
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DM	n-Dodecyl- β -D-maltopyranosid
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch

Ery4P	Erythrose-4-phosphat
EST	engl.: <i>expressed sequence tag</i> , ansequenzierter cDNA-Klon
Fru6P	Fruktose-6-phosphat
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
Glk1P	Glukose-1-phosphat
Glk6P	Glukose-6-phosphat
GPT	Glukose-6-phosphat/Phosphat Translokator
[Zahl] x g	-fache Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kbp	Kilobasenpaare (1000 bp)
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molarität
mA	Miliampère
min	Minute(n)
U · min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
mRNA	engl.: <i>messenger-</i> , Boten-RNA
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OD	optische Dichte
[³² P]	radioaktives Phosphorisotop mit dem Atomgewicht 32
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
2-PGA	2-Phosphoglycerat
3-PGA	3-Phosphoglycerat
P _a	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid

PPT	Phosphoenolpyruvat/Phosphat Translokator
pPT	plastidärer Phosphattranslokator
Pyr	Pyruvat
Rib5P	Ribose-5-phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
Ru5P	Ribulose-5-phosphat
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
[³⁵ S]	radioaktives Schwefelisotop mit dem Atomgewicht 35
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Bäckerhefe
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , Spaltheefe
s, sek	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tabelle	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TCA	Trichloressigsäure
TPT	Triosephosphat/Phosphat-Translokator
TP	Triosephosphat
Tricine	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100, Octylphenolpoly(ethylenglycolether) ₁₀
U	engl.: <i>unit</i> , Enzymeinheit
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	volumenbezogenes Gewichtsprozent
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid
XPT	Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokator
Xu5P	Xylulose-5-phosphat

7. Literaturverzeichnis

- Arabidopsis Genome Initiative. (2001) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **410**, 299.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Snuth, F.A., Seidman, J.G. and Struhl, K. (1997) Current protocols in molecular biology. *Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences, New York*.
- Averill, R.H., Bailey-Serres, J. and Kruger, N.J. (1998) Co-operation between cytosolic and plastidic oxidative pentose phosphate pathways revealed by 6-phosphogluconate dehydrogenase-deficient genotypes of maize. *Plant J*, **14**, 449-457.
- Baier, M. and Dietz, K.J. (1998) The costs and benefits of oxygen for photosynthesizing plant cells. *Prog Bot*, **60**, 282-314.
- Baier, M., Noctor, G., Foyer, C.H. and Dietz, K.J. (2000) Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin in *Arabidopsis* specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism. *Plant Physiol*, **124**, 823-832.
- Bailey, S., Horton, P. and Walters, R.G. (2004) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the relationship between photosynthetic function and chloroplast composition. *Planta*, **218**, 793-802.
- Bancroft, I., Bhatt, A.M., Sjodin, C., Scofield, S., Jones, J.D. and Dean, C. (1992) Development of an efficient two-element transposon tagging system in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, **233**, 449-461.
- Beggs, C.J., Kuhn, K., Böcker, R. and Wellmann, E. (1987) Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons: Enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta*, **172**, 21-126.
- Behringer, F.J. and Medford, J.I. (1992) A plasmid rescue technique for the recovery of plant DNA disrupted by T-DNA insertion. *Plant Mol Biol Repr*, **10**, 190-198.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A. and Wheeler, D.L. (2002) GenBank. *Nucleic Acids Res*, **30**, 17-20.
- Bergmeyer, H.U. (1970) Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Auflage. *Verlag Chemie Weinheim*.
- Bernacchia, G., Schwall, G., Lottspeich, F., Salamini, F. and Bartels, D. (1995) The transketolase gene family of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*: differential expression during the rehydration phase. *Embo J*, **14**, 610-618.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Borchert, S., Harborth, J., Schunemann, D., Hoferichter, P. and Heldt, H.W. (1993) Studies of the Enzymic Capacities and Transport Properties of Pea Root Plastids. *Plant Physiol*, **101**, 303-312.
- Bowsher, C.G., Boulton, E.L., Rose, J., Nayagam, S. and Emes, M.J. (1992) Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic root plastids. *Plant J*, **2**, 893-896.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bröker, M. (1993) Rapid transformation of cryopreserved competent *Schizosaccharomyces pombe* cells. *BioTechniques*, **15**, 599-600.

- Caspar, R., Huber, S.C. and Sommerville, C. (1985) Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol*, **79**, 11-17.
- Cavalier-Smith, T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci*, **5**, 174-182.
- Chomczynski, P. (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem*, **201**, 134-139.
- Chung, C.T. and Miller, M.H. (1993) Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. *Meth Enzymol*, **218**, 621-627.
- Cushman, J.C., Meyer, G., Michalowski, C.B., Schmitt, J.M. and Bohnert, H.J. (1989) Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during Crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Cell*, **1**, 715-725.
- Debnam, P.M. and Emes, M.J. (1999) Subcellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway in root and leaf tissues. *J Exp Bot*, **50**, 1653-1661.
- Dennis, D.T., Huang, Y. and Negm, F.B. (1997) Glycolysis, the pentose phosphate pathway and anaerobic respiration. In: *DT Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell, eds, Plant Metabolism, Longman, London*, 105-127.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L. (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, **7**, 1085-1097.
- Edwards, K., Johnston, C. and Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR-analysis. *Nucl Acids Res*, **19**, 1349.
- Eggermont, K., Goderis, I.J. and Broekaert, W.F. (1996) High-throughput RNA extraction from plant samples based on homogenisation by reciprocal shaking in the presence of a mixture of sand and glass beads. *Plant Mol Biol Rep*, **14**, 273-279.
- Eicks, M. (1998) Expression rekombinanter Phosphattranslokatoren in Hefe. *Diplomarbeit, Universität zu Köln*.
- Entwistle, G. and ap Rees, T. (1991) Lack of fructose-1,6-bisphosphatase in a range of higher plants that store starch. *Biochem J*, **271**, 467-472.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, **132**, 6-13.
- Fischer, K., Arbinger, B., Kammerer, B., Busch, C., Brink, S., Wallmeier, H., Sauer, N., Eckerskorn, C. and Flügge, U.I. (1994) Cloning and in vivo expression of functional triose phosphate/phosphate translocators from C3- and C4-plants: evidence for the putative participation of specific amino acid residues in the recognition of phosphoenolpyruvate. *Plant J*, **5**, 215-226.
- Fischer, K., Kammerer, B., Gutensohn, M., Arbinger, B., Weber, A., Häusler, R.E. and Flügge, U.I. (1997) A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. *Plant Cell*, **9**, 453-462.
- Flechner, A., Dressen, U., Westhoff, P., Henze, K., Schnarrenberger, C. and Martin, W. (1996) Molecular characterization of transketolase (EC 2.2.1.1) active in the Calvin cycle of spinach chloroplasts. *Plant Mol Biol*, **32**, 475-484.
- Fliege, R., Flügge, U.I., Werdan, K. and Heldt, H.W. (1978) Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, **502**, 232-247.
- Flügge, U.I. (1992) Reaction mechanism and asymmetric orientation of the reconstituted chloroplast phosphate translocator. *Biochim Biophys Acta*, **1110**, 112-118.
- Flügge, U.I. (1995) Phosphate translocation in the regulation of photosynthesis. *J Exp Bot*, **46**, 1317-1323.
- Flügge, U.I. (1998) Metabolite transporters in plastids. *Curr Opin Plant Biol*, **1**, 201-206.

- Flügge, U.I. (1999) Phosphate Translocators in Plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **50**, 27-45.
- Flügge, U.I. (2000) Transport in and out of plastids: does the outer envelope membrane control the flow? *Trends Plant Sci*, **5**, 135-137.
- Flügge, U.I., Freisl, M. and Heldt, H.W. (1980) Balance between metabolite accumulation and transport in relation to photosynthesis by isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol*, **65**, 574-577.
- Flügge, U.I. and Heldt, H.W. (1977) Specific labelling of a protein involved in phosphate transport of chloroplasts by pyridoxal-5'-phosphate. *FEBS Lett*, **82**, 29-33.
- Flügge, U.I. and Heldt, H.W. (1979) Phosphate translocators in chloroplasts: identification of the functional protein and characterization of its binding site. In: *Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport*. E Quagliariello, F Palmieri, EM Klingenberg, eds, Elsevier / North Holland. Biomedical Press, Amsterdam, 373-382.
- Flügge, U.I. and Heldt, H.W. (1981) The phosphate translocator of the chloroplast envelope. Isolation of the carrier protein and reconstitution of transport. *Biochim Biophys Acta*, **683**, 296-304.
- Flügge, U.I. and Heldt, H.W. (1986) Chloroplast phosphate-triose phosphate-phosphoglycerate translocator: its identification, isolation and reconstitution. *Meth Enzymol*, **125**, 716-730.
- Flügge, U.I. and Heldt, H.W. (1991) Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **42**, 129-144.
- Flügge, U.I., Stitt, M., Freisl, M. and Heldt, H.W. (1982) On the participation of phosphoribulokinase in the light regulation of CO₂ fixation. *Plant Physiol*, **69**, 235-256.
- Flügge, U.I. and Weber, A. (1994) A rapid method for measuring organelle-specific substrate transport in homogenates from plant tissues. *Planta*, **194**, 181-185.
- Forsthoefel, N.R., Wu, Y., Schulz, B., Bennet, M.J. and Feldmann, K.A. (1992) T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: prospects and perspectives. *Aust J Plant Physiol*, **19**, 353-366.
- Fritze, K., Czaja, I. and Walden, R. (1995) T-DNA tagging of genes influencing polyamine metabolism: isolation of mutant plant lines and rescue of DNA promoting growth in the presence of a polyamine biosynthetic inhibitor. *Plant J*, **7**, 261-271.
- Gao, X.D., Nishikawa, A. and Dean, N. (2001) Identification of a conserved motif in the yeast golgi GDP-mannose transporter required for binding to nucleotide sugar. *J Biol Chem*, **276**, 4424-4432.
- Gasch, A., Aoyama, T., Foster, R. and Chua, N.H. (1992) Gene isolation with the polymerase chain reaction. In: *Methods in Arabidopsis research* (Koncz, C., Chua, N. H. ans Schell, J., eds.). London: World Scientific, 342-356.
- Geiger, D.R. and Servaites, J.C. (1994) Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C₃ plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **45**, 235-256.
- Genty, B., Briantis, J.M. and Baker, N.R. (1989) The relation between quantum yield of photosynthetic transport and the quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, **990**, 87-92.
- Gerhardt, R., Stitt, M. and Heldt, H.W. (1987) Subcellular metabolite levels in spinach leaves: regulation of sucrose synthesis during diurnal alterations in photosynthetic partition. *Plant Physiol*, **83**, 399-407.
- Gilbert, W. and Glynias, M. (1993) On the ancient nature of introns. *Gene*, **135**, 137-144.
- Glock, G.E. and McLean, P. (1953) Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem J*, **55**, 401.

- Graan, T. and Ort, D.R. (1984) Quantitation of the rapid electron donors to P700, the functional plastoquinone pool, and the ratio of the photosystems in spinach chloroplasts. *J Biol Chem*, **259**, 14003-14010.
- Hanke, G., Bowsher, C.G., Jones, M.N., Tetlow, I.J. and Emes, M.J. (1999) Proteoliposomes and plant transport proteins. *J Exp Bot*, **50**, 1715-1726.
- Harrison, C.J., Hedley, C.L. and Wang, T.L. (1998) Evidence that the rug3 locus of pea encodes plastidial phosphoglucomutase confirms that the imported substrate for starch synthesis in pea amyloplasts is glucose 6-phosphate. *Plant J*, **13**, 753-762.
- Hartwell, J., Bowsher, C.G. and Emes, M.J. (1996) Recycling of carbon in the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic plastids. *Planta*, **200**, 107-112.
- Hashimoto, K., Saito, M., Matsuoka, H., Iida, K. and Iida, H. (2004) Functional Analysis of a Rice Putative Voltage-Dependent Ca(2+) Channel, OsTPC1, Expressed in Yeast Cells Lacking its Homologous Gene CCH1. *Plant Cell Physiol*, **45**, 496-500.
- Hatch, M.D. (1988) C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim Biophys Acta*, **895**, 81-106.
- Hauschild, R. and von Schaewen, A. (2003) Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant Physiol*, **133**, 47-62.
- Häusler, R., Holtum, J.A.M. and Latzko, E. (1987) Cytosolic ATP-dependent phosphofructokinase from spinach. *Plant Physiol*, **84**.
- Häusler, R.E., Baur, B., Scharte, J., Teichmann, T., Eicks, M., Fischer, K.L., Flügge, U.I., Schubert, S., Weber, A. and Fischer, K. (2000) Plastidic metabolite transporters and their physiological functions in the inducible crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J*, **24**, 285-296.
- Häusler, R.E., Schlieben, N.H., Schulz, B. and Flügge, U.I. (1998) Compensation of decreased triose phosphate/phosphate translocator activity by accelerated starch turnover and glucose transport in transgenic tobacco. *Planta*, **204**, 366-376.
- Heldt, H.W. (1994) Pflanzenbiochemie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford*.
- Heldt, H.W., Portis, A.R., Lilley, R.M., Mosbach, A. and Chon, C.J. (1980) Assay of nucleotides and other phosphate-containing compounds in isolated chloroplasts by ion exchange chromatography. *Anal Biochem*, **101**, 278-287.
- Henkes, S., Sonnewald, U., Badur, R., Flachmann, R. and Stitt, M. (2001) A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, **13**, 535-551.
- Herrmann, K.M. and Weaver, L.M. (1999) The Shikimate Pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **50**, 473-503.
- Higgins, D.G., Bleasby, A.J. and Fuchs, R. (1992) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput Appl Biosci*, **8**, 189-191.
- Holtum, J.A.M. and Osmond, C.B. (1981) The gluconeogenic metabolism of pyruvate during deacidification in plants with crassulacean acid metabolism. *Aust J Plant Physiol*, **8**, 31-44.
- Holtum, J.A.M. and Winter, K. (1982) Activities of carbon metabolism during the induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta*, **155**, 8-16.
- Jagtap, V., Bhargava, S. and Feierabend, J. (1998) Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor*(L.) Moench. *J Exp Bot*, **49**, 1715-1721.
- Jahnknecht, R., De Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R.A., Nordheim, A. and Stunnenberg, H.G. (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8972-8976.

- Jang, J.C., Leon, P., Zhou, L. and Sheen, J. (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell*, **9**, 5-19.
- Jang, J.C. and Sheen, J. (1994) Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell*, **6**, 1665-1679.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J*, **6**, 3901-3907.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjoval, S., Fraysse, L., Weig, A.R. and Kjellbom, P. (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol*, **126**, 1358-1369.
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A. and Flügge, U.I. (1998) Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell*, **10**, 105-117.
- Kampfenkel, K., Möhlmann, T., Batz, O., Van Montagu, M., Inze, D. and Neuhaus, H.E. (1995) Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants. *FEBS Lett*, **374**, 351-355.
- Kasahara, M. and Hinkle, P.C. (1977) Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem*, **252**, 7384-7390.
- Keegstra, K., Werner-Washburne, M., Cline, K. and Andrews, J. (1984) The chloroplast envelope: is it homologous with the double membranes of mitochondria and gram-negative bacteria? *J Cell Biochem*, **24**, 55-68.
- Khyse-Anderson, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple Gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-209.
- Knappe, S. (2002) Analyse der Phosphattranslokator-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana*. *Dissertation, Universität zu Köln*.
- Knappe, S., Flügge, U.I. and Fischer, K. (2003a) Analysis of the plastidic phosphate translocator gene family in *Arabidopsis* and identification of new phosphate translocator-homologous transporters, classified by their putative substrate-binding site. *Plant Physiol*, **131**, 1178-1190.
- Knappe, S., Löttgert, T., Schneider, A., Voll, L., Flügge, U.I. and Fischer, K. (2003b) Characterization of two functional phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT) genes in *Arabidopsis*--AtPPT1 may be involved in the provision of signals for correct mesophyll development. *Plant J*, **36**, 411-420.
- Kofler, H. (2000) Defekte im Stärkemetabolismus von *Arabidopsis thaliana*: Analyse der Mutanten *stf1* und *sex1*. *Dissertation, Universität zu Köln*.
- Kofler, H., Häusler, R.E., Schulz, B., Gröner, F., Flügge, U.I. and Weber, A. (2000) Molecular characterisation of a new mutant allele of the plastid phosphoglucomutase in *Arabidopsis*, and complementation of the mutant with the wild-type cDNA. *Mol Gen Genet*, **263**, 978-986.
- Konieczny, A., Voytas, D.F., Cummings, M.P. and Ausubel, F.M. (1991) A superfamily of *Arabidopsis thaliana* retrotransposons. *Genetics*, **127**, 801-809.
- Kopriva, S., Koprivova, A. and Suss, K.H. (2000) Identification, cloning, and properties of cytosolic D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase from higher plants. *J Biol Chem*, **275**, 1294-1299.
- Kore-eda, S. and Kanai, R. (1997) Induction of glucose 6-phosphate transport activity in chloroplasts of *Mesembryanthemum crystallinum* by the C₃-CAM transition. *Plant Cell Physiol*, **38**, 895-901.
- Kramer, R., Aquila, H. and Klingenberg, M. (1977) Isolation of the unliganded adenosine 5'-diphosphate, adenosine 5'-triphosphate carrier-linked binding protein and incorporation into the membranes of liposomes. *Biochemistry*, **16**, 4949-4953.

- Krause, G.H. and Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **42**, 313-349.
- Król, M., Ivanov, A.G., Jansson, S., Kloppstech, K. and Huner, N.P. (1999) Greening under high light or cold temperature affects the level of xanthophyll-cycle pigments, early light-inducible proteins, and light-harvesting polypeptides in wild-type barley and the chlorina f2 mutant. *Plant Physiol*, **120**, 193-204.
- Kruger, N.J. and von Schaewen, A. (2003) The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr Opin Plant Biol*, **6**, 236-246.
- Krysan, P.J., Young, J.C. and Sussman, M.R. (1999) T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. *Plant Cell*, **11**, 2283-2290.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G. and Last, R.L. (1993) Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell*, **5**, 171-179.
- Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. and Whittier, R.F. (1995) Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, **8**, 457-463.
- Liu, Y.G. and Whittier, R.F. (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, **25**, 674-681.
- Loddenkötter, B. (1996) Heterologe Expression chloroplastidärer Phosphattranslokatoren in *Escherichia coli* und Hefe. *Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
- Loddenkötter, B., Kammerer, B., Fischer, K. and Flügge, U.I. (1993) Expression of the functional mature chloroplast triose phosphate translocator in yeast internal membranes and purification of the histidine-tagged protein by a single metal-affinity chromatography step. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2155-2159.
- Lois, R. (1994) Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. *Planta*, **194**, 498-503.
- Lois, R. and Buchanan, B.B. (1994) Severe sensitivity to ultraviolet radiation in *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid accumulation. *Planta*, **194**, 504-509.
- Lu, Y. and Sharkey, T.D. (2004) The role of amyloamylase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta*, **218**, 466-473.
- Martin, W., Henze, K., Kellerman, J., Flechner, A. and Schnarrenberger, C. (1996) Microsequencing and cDNA cloning of the Calvin cycle/OPPP enzyme ribose-5-phosphate isomerase (EC 5.3.1.6) from spinach chloroplasts. *Plant Mol Biol*, **30**, 795-805.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. and Penny, D. (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12246-12251.
- Martinissen, R.A. (2000) Weeding out the genes: the *Arabidopsis* genome project. *Functional Integrated Genomics*, **1**, 2-11.
- May, T. and Soll, J. (1999) Chloroplast precursor protein translocon. *FEBS Lett*, **452**, 52-56.
- McClintock, B. (1951) Chromosome organization and genetic expression. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, **16**, 13-47.
- McFadden, G.I. (1999a) Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 513-519.
- McFadden, G.I. (1999b) Plastids and protein targeting. *J Eukaryot Microbiol*, **46**, 339-346.

- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. and Koornneef, M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, **282**, 662, 679-682.
- Meyerowitz, E.M. (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell*, **56**, 263-269.
- Mita, S., Murano, N., Akaïke, M. and Nakamura, K. (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β -Amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J*, **11**, 841-851.
- Mita, S., Suzuki-Fujii, K. and Nakamura, K. (1995) Sugar-inducible expression of a gene for beta-amylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **107**, 895-904.
- Neuhaus, H.E., Holtum, J.A.M. and Latzko, E. (1988) Transport of phosphoenol-pyruvate by chloroplasts from *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Biochem J*, **318**, 945-953.
- Neuhaus, H.E. and Schulte, N. (1996) Starch degradation in chloroplasts isolated from C3 or CAM (crassulacean acid metabolism)-induced *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Biochem J*, **318 (Pt 3)**, 945-953.
- Neuhaus, H.E., Thom, E., Mohlmann, T., Steup, M. and Kampfenkel, K. (1997) Characterization of a novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant J*, **11**, 73-82.
- Niittyla, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M. and Zeeman, S.C. (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science*, **303**, 87-89.
- Noctor, G. and Foyer, C.H. (1998) ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**, 249-279.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. and Foyer, C.H. (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot*, **53**, 1283-1304.
- Noctor, G., Strohm, M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Foyer, C.H. and Rennenberg, H. (1996) Synthesis of Glutathione in Leaves of Transgenic Poplar Overexpressing [γ]-Glutamylcysteine Synthetase. *Plant Physiol*, **112**, 1071-1078.
- Norambuena, L., Marchant, L., Berninsone, P., Hirschberg, C.B., Silva, H. and Orellana, A. (2002) Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactos/UDP-glucose transporter. *J Biol Chem*, **277**, 32923-32929.
- Nowitzki, U., Wyrich, R., Westhoff, P., Henze, K., Schnarrenberger, C. and Martin, W. (1995) Cloning of the amphibolic Calvin cycle/OPPP enzyme D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase (EC 5.1.3.1) from spinach chloroplasts: functional and evolutionary aspects. *Plant Mol Biol*, **29**, 1279-1291.
- Paul, M.J., Loos, K., Stitt, M. and Ziegler, P. (1993) Starch-degrading enzymes during the induction of CAM in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Environ*, **16**, 531-538.
- Peleman, J., Cottyn, B., Van Camp, W., Van Montagu, M. and Inze, D. (1991) Transient occurrence of extrachromosomal DNA of an *Arabidopsis thaliana* transposon-like element, Tat1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3618-3622.
- Pyke, K.A. (1994) Tansley Review No. 75: *Arabidopsis* - its use in the genetic and molecular analysis of plant morphogenesis. *New Phytol*, **128**, 19-37.
- Quick, W.P., Scheibe, R. and Neuhaus, H.E. (1995) Induction of Hexose-Phosphate Translocator Activity in Spinach Chloroplasts. *Plant Physiol*, **109**, 113-121.
- Rabino, I. and Mancinelli, A.L. (1986) Light, temperature and anthocyanin production. *Plant Physiol*, **81**, 922-924.

- Rethmeier, R., Seurinck, J., Van Montagu, M. and Cornelissen, M. (1997) Intron-mediated enhancement of transgene expression in maize is a nuclear, gene-dependent process. *Plant J*, **12**, 895-899.
- Riesmeier, J.W., Flügge, U.I., Schulz, B., Heineke, D., Heldt, H.W., Willmitzer, L. and Frommer, W.B. (1993) Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon partitioning in transgenic potato plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6160-6164.
- Rossel, J.B., Wilson, I.W. and Pogson, B.J. (2002) Global changes in gene expression in response to high light in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **130**, 1109-1120.
- Rothmaler, W. (1990) Exkursionsflora. In: *Band 2, Gefäßpflanzen, 15. Auflage, Schubert, Werner und Meusel (Herausg.), Volk und Wissen Verlag GmbH, Berlin.*
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, **4**, 406-425.
- Sakharkar, M.K., Kanguane, P., Petrov, D.A., Kolaskar, A.S. and Subbiah, S. (2002) SEGE: A database on 'intron less/single exonic' genes from eukaryotes. *Bioinformatics*, **18**, 1266-1267.
- Sauer, N. and Stolz, J. (1994) SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from Arabidopsis thaliana; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J*, **6**, 67-77.
- Schäfer, G., Heber, U. and Heldt, H.W. (1977) Glucose transport into spinach chloroplasts. *Plant Physiol*, **60**, 286-289.
- Schmid, J. and Amrhein, N. (1995) Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry*, **39**, 737-749.
- Schmitz, R. (2000) UV- Schutz in Primärblättern von Roggen und Gerste: Untersuchungen zur Bedeutung der Flavonoid-Akkumulation und Photoreaktivierung von DNA-Schäden. *Dissertation, Universität zu Köln.*
- Schnarrenberger, C., Flechner, A. and Martin, W. (1995) Enzymatic Evidence for a Complete Oxidative Pentose Phosphate Pathway in Chloroplasts and an Incomplete Pathway in the Cytosol of Spinach Leaves. *Plant Physiol*, **108**, 609-614.
- Schneider, A., Häusler, R.E., Kolukisaoglu, U., Kunze, R., van der Graaff, E., Schwacke, R., Catoni, E., Desimone, M. and Flügge, U.I. (2002) An Arabidopsis thaliana knock-out mutant of the chloroplast triose phosphate/phosphate translocator is severely compromised only when starch synthesis, but not starch mobilisation is abolished. *Plant J*, **32**, 685-699.
- Schneider, A. and Leister, D. (2004) Screening of insertional mutants. In *Vorbereitung.*
- Schreiber, U., Schliwa, U. and Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res*, **10**, 51-62.
- Schulz, B., Frommer, W.B., Flügge, U.I., Hummel, S., Fischer, K. and Willmitzer, L. (1993) Expression of the triose phosphate translocator gene from potato is light dependent and restricted to green tissues. *Mol Gen Genet*, **238**, 357-361.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flügge, U.I. and Kunze, R. (2003) ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiol*, **131**, 16-26.
- Segel, I.H. (1968) Appendix III: Enzyme Kinetics. In: *Biochemical Calculations, John Wiley & Sons Inc., New York, London, Sydney, Toronto.*
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M. and Goff, S.A. (2002) A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell*, **14**, 2985-2994.

- Soll, J., Bolter, B., Wagner, R. and Hinnah, S.C. (2000)...response: the chloroplast outer envelope: a molecular sieve? *Trends Plant Sci*, **5**, 137-138.
- Stitt, M. and ap Rees, T. (1979) Capacities of pea chloroplasts to catalyse the oxidative pentose phosphate pathway and glycolysis. *Phytochemistry*, **18**, 1905-1911.
- Stitt, M., Wirtz, W. and Heldt, H.W. (1980) Metabolite levels during induction in the chloroplast and extrachloroplast compartments of spinach protoplasts. *Biochim Biophys Acta*, **593**, 85-102.
- Streatfield, S.J., Weber, A., Kinsman, E.A., Hausler, R.E., Li, J., Post-Beittenmiller, D., Kaiser, W.M., Pyke, K.A., Flügge, U.I. and Chory, J. (1999) The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression. *Plant Cell*, **11**, 1609-1622.
- Tevini, M. and Teramura, A.H. (1989) UV-B effects on terrestrial plants. *Photochem Photobiol*, **50**, 479-487.
- Thom, E., Möhlmann, T., Quick, W.P., Camara, B. and Neuhaus, H.E. (1998) Sweet pepper plastids: Enzymic equipment, characterisation of the plastidic oxidative pentose-phosphate pathway, and transport of phosphorylated intermediates across the envelope membrane. *Planta*, **204**, 226-233.
- Thornycroft, D., Sherson, S.M. and Smith, S.M. (2001) Using gene knockouts to investigate plant metabolism. *J Exp Bot*, **52**, 1593-1601.
- Truernit, E., Schmid, J., Epple, P., Illig, J. and Sauer, N. (1996) The sink-specific and stress-regulated Arabidopsis STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding, elicitors, and pathogen challenge. *Plant Cell*, **8**, 2169-2182.
- Tsukaya, H., Oshima, T., Naito, S., Chino, M. and Komeda, Y. (1991) Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiol*, **97**.
- Voll, L. (2001) Die Arabidopsis thaliana cue1-Mutante: Die Bedeutung des Phosphoenolpyruvat / Phosphat-Translokators für den Primär- und Sekundärstoffwechsel. *Dissertation, Universität zu Köln*.
- Voll, L., Häusler, R.E., Hecker, R., Weber, A., Weissenböck, G., Fiene, G., Waffenschmidt, S. and Flügge, U.I. (2003) The phenotype of the Arabidopsis cue1 mutant is not simply caused by a general restriction of the shikimate pathway. *Plant J*, **36**, 301-317.
- Wagner, R., Apley, E.C., Gross, A. and Flügge, U.I. (1989) The rotational diffusion of chloroplast phosphate translocator and of lipid molecules in bilayer membranes. *Eur J Biochem*, **182**, 165-173.
- Weber, A., Menzlaff, E., Arbinger, B., Gutensohn, M., Eckerskorn, C. and Flügge, U.I. (1995) The 2-oxoglutarate/malate translocator of chloroplast envelope membranes: molecular cloning of a transporter containing a 12-helix motif and expression of the functional protein in yeast cells. *Biochemistry*, **34**, 2621-2627.
- Weber, A., Servaites, J.C., Geiger, D.R., Kofler, H., Hille, D., Groner, F., Hebbeker, U. and Flügge, U.I. (2000) Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell*, **12**, 787-802.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, **244**, 4406-4412.
- Weissenböck, G., Schnabl, H., Sachs, G., Elbert, C. and Heller, F.-O. (1984) Flavonol content of guard cell and mesophyll cell protoplasts isolated from *Vicia faba* L. leaves. *Physiol Plant*, **62**, 356-362.
- Westhoff, P. (1996) Die genetische Analyse von Entwicklungsvorgängen - Methodik. In: *Molekulare Entwicklungsbiologie, Thieme Verlag*, 43 ff.

- Wiese, A. (2000) Pflanzliche Hexokinasen - Funktion und subzelluläre Lokalisierung. *Dissertation, Universität zu Köln.*
- Winter, H., Robinson, D.G. and Heldt, H.W. (1994) Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta*, **193**, 530-535.
- Winter, K., Foster, J.G., Edwards, G.E. and Holtum, J.A.M. (1982) Intracellular localization of enzymes of carbon metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* exhibiting C₃ photosynthesis characteristics or performing crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol*, **69**, 300-307.
- Woo, K.C., Flügge, U.I. and Heldt, H.W. (1987) A two-translocator model for the transport of 2-oxoglutarate and glutamate in chloroplasts during ammonia assimilation in the light. *Plant Physiol*, **84**, 624-632.
- Yamaguchi, T., Apse, M.P., Shi, H. and Blumwald, E. (2003) Topological analysis of a plant vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12510-12515.
- Yu, T.S., Lue, W.L., Wang, S.M. and Chen, J. (2000) Mutation of Arabidopsis plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. *Plant Physiol*, **123**, 319-326.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Montague, M. and Schwell, J. (1983) Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *Embo J*, **2**, 2143-2150.
- Zupan, J.R. and Zambryski, P. (1995) Transfer of T-DNA from Agrobacterium to the plant cell. *Plant Physiol*, **107**, 1041-1047.

8. Anhang

8.1. Der XPT *in silico* (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>)

8.1.1. Protein- und cDNA-Sequenzen

aramemnon atgac
MTAE close this window

At5g17630 xylulose-5-phosphate/phosphate translocator (AtXPT)

<ul style="list-style-type: none"> • Protein sequence *) • cDNA sequence (ORF) • Genomic sequence 	<ul style="list-style-type: none"> • TIGR: At5g17630 • TAIR: At5g17630 • MIPS: At5g17630 	<ul style="list-style-type: none"> • NCBI is: NP_197265.1 • NCBI probably: AAN18155.1 • NCBI probably: AAK50101.1
--	---	--

*) predictions in the database are based on this protein sequence

Protein sequence (417 aa)

```

0001 MISLNLSPSL NPGLLHKTRT CQQPTRLSAL LVTNPKPFNH RHPLGLSPIP NLQIRDVSAK
0061 PLLSLTNPES SSGFSRKPRS IAAVGSSDSN PDEKSDLGEA EKKEKKAKTL QLGIVFGLWY
0121 FQNIWFNIFN KKALNVFPYP WLLASFQLFA GSIWMLVLWS FKLYPCPKIS KPFIIALLGP
0181 ALFHTIGHIS ACVSFSKVAV SFTHVIKSAE PVFSVIFSSL LGDSYPLAVW ISILPIVMGC
0241 SLAAVTEVSF NLGGLSGAMI SNVGFVLRNI YSKRSLQSFK EIDGLNLYGC ISILSLLYLF
0301 PVAIFVEGSH WVPGYHKAIA SVGTPSTFYF WVLLSGVFIH LYNQSSYQAL DEISPLTFSV
0361 GNTMKRVVVI ISTVLVFRNP VRPLNALGSA IAIFGTFLYS QATAKKKKIE VGGDKKN

```

cDNA sequence (ORF)

```

0001 ATGATCTCCC TGAATCTATC TCCTTCCCTC AATCOGGGTC TCCTCCACAA GACCCGGACC
0061 TGTCACAAC CGACCCGTCT CTCTGCTCTT CTCGTACCCA ACCCTAAACC CTTCAATCAC
0121 AGACACCCAC TAGGGCTTTC ACCGATTCCC AATCTCCAGA TTCGTGATGT TTCGCCAAAA
0181 CCCTTGCTTT CACTCACAAA CCCTGAATCC TCATCTGGGT TCTCGAGAAA ACCCAGATCC
0241 ATCGCCGCCG TTGGCTCATC GGATTCAAAT CCAGACGAAA AATCCGATCT TGGTGAAGCG
0301 GAGAAGAAAG AGAAGAAGGC TAAGACTCTT CAGCTAGGGA TTGTGTTTGG TCTTTGGTAT
0361 TTCCAGAACA TCGTCTTCAA CATCTTCAAC AAAAAGGCAC TCAATGTCTT TCTTATCCA
0421 TGGCTTCTCG CTCGTTTCA GCTCTTCGCA GGTCTATTT GGATGCTTGT CTTATGGTCC
0481 TTTAAGCTTT ACCCCTGCC TAAAATCTCC AAGCCTTTTA TCATTGCTCT CCTTGGTCTC
0541 GCATTGTTCC ACACTATTGG ACATATCTCA GCTTGTGTCT CATTCTCCAA AGTCGCTGTT
0601 TCGTTCAC TCATTATCAA ATCAGCAGAG CCTGTCTTCT CTGTTATCTT CTCGTCTTTA
0661 CTCGGTGATT CGTATCCGTT AGCTGTCTGG TTATCGATT TCOCGATTGT TATGGGTTGT
0721 TCTTTAGCTG CAGTCACTGA AGTGTCAATC AATTTAGGTG GATTATCAGG AGCTATGATT
0781 AGTAACGTTG GTTTGTCTT GAGAAACATT TACTCTAAAC GTAGCTTACA GAGCTTAAAA
0841 GAGATTGATG GATTGAATCT ATACGGTTGC ATCAGTATAC TCTCTCTGCT TTATCTGTTT
0901 CCCGTGGCGA TTTTCGTTGA AGGATCACAT TGGGTTCCAG GTTACCATAA AGCCATTGCA
0961 TCTGTTGGGA CACCATCAAC GTTCTACTTT TGGGTTTTGC TCTCTGGTGT CTTCTATCAT
1021 CTGTACAACC AGTCTTCTTA CCAGGCACTC GACGAGATCA GTCCATTGAC TTTCTCTGTT
1081 GGAACACGA TGAAGCGAGT CGTGGTGATT ATCTCCACTG TTTTGGTGT TAGGAATCCT
1141 GTTAGACCTC TGAATGCTCT TGGATCAGCC ATTGCGATTT TCGGTACCTT CTTGTATTCT
1201 CAGGCCACTG CAAAGAAGAA GAAGATTGAA GTGGGAGGTG ATAAGAAGAA CTA

```

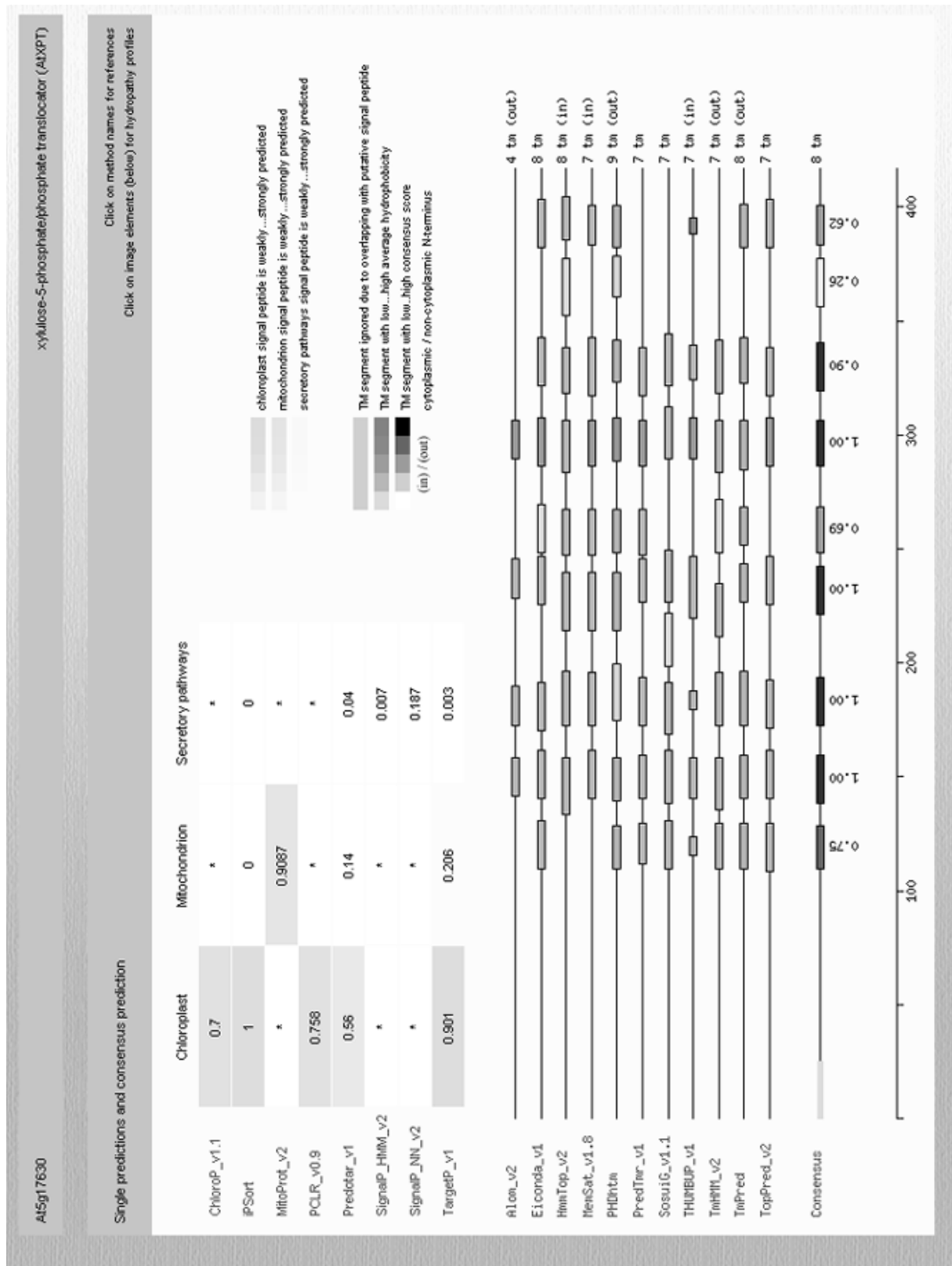
8.1.2. Genomische Sequenz

Genomic sequence						
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Table:</i> exon position(s) relative to the start of the ORF 						begin end
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Sequence:</i> blue uppercase : exon(s) within coding region 						1 0 1253
0001	aagatatcag	atacaagtga	catgtctacc	tccattcttg	attatctgag	aagaggctcg
0061	cctccactaa	atcaacaata	ttgogaagca	tttccatcog	atcttcatag	gttccatgtc
0121	cctaaaagtt	tgaaagattt	gcaaaacaaa	agaaaatga	aaagtggaac	ccatgcttgc
0181	actttgacaa	attatggaac	ttgagcaaat	acaggtaaat	gcataaatcc	agtaaggcta
0241	cttgaacaaa	acttacttga	atggcttcaa	tgtctacagt	tggtgtaatc	ccccaaaact
0301	ttgcaatctc	tgccaaatct	gaaaccgaga	agtcacttac	acatcaaaaa	ctaataatag
0361	ctaagataat	agctaggcaa	tgttcaaagg	ccaacacgat	caaagaaaca	cttacattga
0421	atacgaacag	tttcttcatc	acgaactcca	gcctctcctt	ggagattttg	ctgtgagaaa
0481	ggtgatttat	cacctaaata	ccttcaaaga	cagagccaga	gaagaaacaa	taagtaaacc
0541	ccatcgaaat	ttgtgatcag	agctcgagaa	attcaaaaatg	ttgagagttc	acattgatat
0601	tcaaaatcca	gagaattccc	agcatttttc	tggtagaaga	gaatcgaata	agctataaaa
0661	gaaggagagg	aagaaagagt	tacttgaaaa	agagccattc	gagaagagca	taacgttcca
0721	taacggcgaa	gaggagagac	tgagctggag	catttgcctt	agggtaactt	agcagccgta
0781	gcttctcttg	tatctcttcc	atttgetctg	ccgccaattt	cctatccaac	tgattctggc
0841	gacggcttca	acaccgattc	aaatctcgag	atctgacact	agtctctctt	tcttctctca
0901	aaaacttttt	aaaagcctaa	tttaccacat	tgccccattt	tctcatctcc	agcgtgtaaa
0961	cagtgaaaac	aaaacccaaa	atgaaaaaga	aaaaacaac	ttaagtaatt	taacatcaat
1021	ggacctaaag	ttttctctca	aaactttaaa	aaactaattt	taccatattg	gcctttttct
1081	catctcctgc	gtgtaaaaag	tgaaaacaaa	accgaaagga	aaaaacatta	gtaacttaac
1141	atcaatagac	ctaattgatc	tgggtgatgt	aaaaaggtaa	aatattcgaa	tgattgcggc
1201	ggttagaatg	gacaaaaccg	gtgocggacca	attttaagac	tacttttaca	ttgaaagaaa
1261	ttggatctcg	atagattatt	gttcgctata	aaagaaaatg	gtttaatccg	ttttaccacc
1321	cacattcatt	caaaacccaa	atatttggat	aaacaataaa	aaaatcataa	gcaataacaa
1381	aataatatac	gatatgaaa	aataatgata	aaagacaaat	gatggcatcg	gttccgattt
1441	gtttattgtt	aacaatcaga	acgaaatagt	tttatcgtga	agttttttg	taatctaaca
1501	tttaaaatta	taaaatttac	aaatataaaa	ttcaaaaact	ttcaaatgtg	agtcccattt
1561	ttttgaatct	cgagacattt	tccacaatgc	ttttcaaaata	ggatgggaca	ttttaccaat
1621	tataataacta	aacaaaataa	ttggaataat	tataaaaaga	gtactatatt	cgaagaagga
1681	gcaaagtcca	agaacagagc	tttcaaaaaa	ttgtgttact	tccaacogga	tctctgacgt
1741	ttggtccaga	gocgacgacg	accacaacc	gaaaccaaga	gctatctctt	tttctctctc
1801	tctctctcct	tctctacctg	cgtctgtgct	taaacaaTGA	TCTCCCTGAA	TCTATCTCCT
1861	TCCCTCAATC	CGGGTCTCCT	CCACAAGACC	CGGACCTGTC	AACAACCGAC	CCGTCTCTCT
1921	GCTCTTCTCG	TCACCAACCC	TAAACCCCTC	AATCACAGAC	ACCCACTAGG	GCTTTCACCG
1981	ATTCCCAATC	TCCAGATTCC	TGATGTTTCC	GCAAAAACCT	TGCTTTCACT	CACAAAACCT
2041	GAATCCTCAT	CTGGGTTCTC	GAGAAAACCC	AGATCCATCG	CCGCCGTTGG	CTCATCGGAT
2101	TCAAATCCAG	ACGAAAAATC	CGATCTTGGT	GAAGCGGAGA	AGAAAAGAGAA	GAAGGCTAAG
2161	ACTCTTCAGC	TAGGGATTGT	GTTTGGTCTT	TGATTTTCC	AGAACATCGT	GTTCAACATC
2221	TTCAACAATA	AGGCACTCAA	TGTCTTTCCT	TATCCATGGC	TTCTCGCTTC	GTTTCAGCTC
2281	TTCGCAGGTT	CTATTTGGAT	GCTTGTCTTA	TGGTCCCTTA	AGCTTTACCC	CTGCCCTAAA
2341	ATCTCCAAGC	CTTTTATCAT	TGCTCTCCTT	GGTCTGCAT	TGTTCCACAC	TATTGGACAT
2401	ATCTCAGCTT	GTGTCTCATT	CTCCAAAGTC	GCTGTTTCGT	TCACTCATGT	TATCAAATCA
2461	GCAGAGCCTG	TCTTCTCTGT	TATCTTCTCG	TCTTTACTCG	GTGATTCTGT	TCCGTTAGCT
2521	GTCTGGTTAT	CGATTCTTCC	GATTGTTATG	GGTTGTCTT	TAGCTGCAGT	CACTGAAGTG
2581	TCATTCAATT	TAGGTGGATT	ATCAGGAGCT	ATGATTAGTA	ACGTTGGTTT	TGTCTTGAGA
2641	AACATTTACT	CTAAACGTAG	CTTACAGAGC	TTTAAAGAGA	TTGATGGATT	GAATCTATAC
2701	GGTTGCATCA	GTATACTCTC	TCTGCTTTAT	CTGTTTCCCG	TGGCGATTTT	CGTTGAAGGA
2761	TCACATTGGG	TTCCAGGTTA	CCATAAAGCC	ATTGCATCTG	TTGGGACACC	ATCAACGTTT
2821	TACTTTTGGG	TTTTGCTCTC	TGGTGTCTTC	TATCATCTGT	ACAACCAGTC	TTCTTACCAG

```
2821 TACTTTGGG TTTTGCTCTC TGGTGTCTTC TATCATCTGT ACAACCAGTC TTCTTACCAG
2881 GCACTCGACG AGATCAGTCC ATTGACTTTC TCTGTTGGGA ACACGATGAA GCGAGTCGTG
2941 GTGATTATCT CCACTGTTTT GGTGTTTAGG AATCCTGTTA GACCTCTGAA TGCTCTTGGA
3001 TCAGCCATTG CGATTTTCGG TACCTTCTTG TATTCTCAGG CCACTGCAAA GAAGAAGAAG
3061 ATTGAAAGTGG GAGGTGATAA GAAGAACTAA aggttttaag tgcaaaacca aggtttactt
3121 gagcttttcc tttctttcca agttttttct tttttcttt tgctgttttt gatttcatta
3181 tgagactaga attatcattt ctgttgactg gtttagttgc tttaaagact ttgatctact
3241 tagttcttga cctcgtctac ttgatgtttt tccattgata taaagtgggt ctgattctga
3301 gaagagttaa atttcttaat ccttaagcca gtttcttctt aatacaatga gactttgagt
3361 ccaattcaaa aactgtacac taaaacacac aaaagagagt tcctttcttc accaggagta
3421 atgccggaac cttctccgac tcgttctctt aaaaggttta caagcaagaa tgctaagatc
3481 aacagctgca gcaagtgccg tgaaaatggc tgcatcttcc acacaagtta catgtctcat
3541
```

[Show legend](#) | [Return to top](#) | [Close this window](#)

8.1.3. Lokalisations- und Membranspannvorhersagen



8.2. Verwendete Gleichungen

8.2.1. Michaelis-Menten-Geradengleichung

$$\begin{aligned}v &= \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \\ \frac{1}{v} &= \frac{K_M + [S]}{V_{\max} \cdot [S]} \\ &= \frac{K_M \cdot 1}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{[S] \cdot 1}{V_{\max} \cdot [S]} \\ &= \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}\end{aligned}$$

8.2.2. Umformung der K_i -Gleichung

$$\begin{aligned}K_{Mapp} &= K_M \cdot \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right] \\ K_i &= \frac{[I]}{\left[\frac{K_{Mapp}}{K_M} \right] - 1}\end{aligned}$$

8.3. *In silico*-Lokalisationsvorhersagen der OPPP-Enzyme

8.3.1. D-Ribulose-5-Phosphat 3-Epimerasen

At1g63290				putative D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase	
Single predictions and consensus prediction				Click on method names for references Click on image elements (below) for hydropathy profiles	
	Chloroplast	Mitochondrion	Secretory pathways		
ChloroP_v1.1	0.19	*	*		
iPSort	0	0	0		
MitoProt_v2	*	0.2823	*		
PCLR_v0.9	0.051	*	*		
Predotar_v1	0.02	0.03	0.00		
SignalP_HMM_v2	*	*	0.011	(in) / (out) cytoplasmic / non-cytoplasmic N-terminus	
SignalP_NN_v2	*	*	0.144		
TargetP_v1	0.059	0.074	0.636		

At3g01850				putative D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase	
Single predictions and consensus prediction				Click on method names for references Click on image elements (below) for hydropathy profiles	
	Chloroplast	Mitochondrion	Secretory pathways		
ChloroP_v1.1	0.195	*	*		
iPSort	0	0	0		
MitoProt_v2	*	0.4275	*		
PCLR_v0.9	0.043	*	*		
Predotar_v1	0.02	0.03	0.00		
SignalP_HMM_v2	*	*	0.025	(in) / (out) cytoplasmic / non-cytoplasmic N-terminus	
SignalP_NN_v2	*	*	0.138		
TargetP_v1	0.067	0.044	0.705		

At5g61410				ribulose-5-phosphate-3-epimerase	
Single predictions and consensus prediction				Click on method names for references Click on image elements (below) for hydropathy profiles	
	Chloroplast	Mitochondrion	Secretory pathways		
ChloroP_v1.1	0.835	*	*		
iPSort	1	0	0		
MitoProt_v2	*	0.8155	*		
PCLR_v0.9	0.917	*	*		
Predotar_v1	0.50	0.01	0.00		
SignalP_HMM_v2	*	*	0.630	(in) / (out) cytoplasmic / non-cytoplasmic N-terminus	
SignalP_NN_v2	*	*	0.147		
TargetP_v1	0.925	0.122	0.011		

8.3.2. Ribose-5-Phosphat Isomerasen

At1g71400 putative ribose 5-phosphate isomerase

Single predictions and consensus prediction Click on method names for references
Click on image elements (below) for hydropathy profiles

	Chloroplast	Mitochondrion	Secretory pathways
ChloroP_v1.1	0.2	*	*
iPSort	0	0	0
MitoProt_v2	*	0.1013	*
PCLR_v0.9	0.017	*	*
Predotar_v1	0.01	0.01	0.00
SignalP_HMM_v2	*	*	0.022
SignalP_NN_v2	*	*	0.101
TargetP_v1	0.211	0.042	0.163

chloroplast signal peptide is weakly...strongly predicted
 mitochondrion signal peptide is weakly...strongly predicted
 secretory pathways signal peptide is weakly...strongly predicted
 TM segment ignored due to overlapping with putative signal peptide
 TM segment with low...high average hydrophobicity
 TM segment with low...high consensus score
 cytoplasmic / non-cytoplasmic N-terminus
 (in) / (out)

At2g01290 putative ribose 5-phosphate isomerase

Single predictions and consensus prediction Click on method names for references
Click on image elements (below) for hydropathy profiles

	Chloroplast	Mitochondrion	Secretory pathways
ChloroP_v1.1	0.37	*	*
iPSort	0	0	0
MitoProt_v2	*	0.0272	*
PCLR_v0.9	0.042	*	*
Predotar_v1	0.05	0.01	0.00
SignalP_HMM_v2	*	*	0.005
SignalP_NN_v2	*	*	0.123
TargetP_v1	0.142	0.036	0.243

chloroplast signal peptide is weakly...strongly predicted
 mitochondrion signal peptide is weakly...strongly predicted
 secretory pathways signal peptide is weakly...strongly predicted
 TM segment ignored due to overlapping with putative signal peptide
 TM segment with low...high average hydrophobicity
 TM segment with low...high consensus score
 cytoplasmic / non-cytoplasmic N-terminus
 (in) / (out)

At3g04790 putative ribose 5-phosphate isomerase

Single predictions and consensus prediction Click on method names for references
Click on image elements (below) for hydropathy profiles

	Chloroplast	Mitochondrion	Secretory pathways
ChloroP_v1.1	0.825	*	*
iPSort	1	0	0
MitoProt_v2	*	0.8960	*
PCLR_v0.9	0.933	*	*
Predotar_v1	0.96	0.38	0.01
SignalP_HMM_v2	*	*	0.519
SignalP_NN_v2	*	*	0.434
TargetP_v1	0.735	0.283	0.019

chloroplast signal peptide is weakly...strongly predicted
 mitochondrion signal peptide is weakly...strongly predicted
 secretory pathways signal peptide is weakly...strongly predicted
 TM segment ignored due to overlapping with putative signal peptide
 TM segment with low...high average hydrophobicity
 TM segment with low...high consensus score
 cytoplasmic / non-cytoplasmic N-terminus
 (in) / (out)

8.3.3. Transketolasen

At2g45290				transketolase, putative	
Single predictions and consensus prediction				Click on method names for references Click on image elements (below) for hydropathy profiles	
	Chloroplast	Mitochondrion	Secretory pathways		
ChloroP_v1.1	0.89	*	*		
iPSort	1	0	0		
MitoProt_v2	*	0.9951	*	chloroplast signal peptide is weakly...strongly predicted	
PCLR_v0.9	0.977	*	*	mitochondrion signal peptide is weakly...strongly predicted	
Predotar_v1	0.97	0.08	0.04	secretory pathways signal peptide is weakly...strongly predicted	
SignalP_HMM_v2	*	*	0.965	TM segment ignored due to overlapping with putative signal peptide	
SignalP_NN_v2	*	*	0.454	TM segment with low...high average hydrophobicity	
TargetP_v1	0.970	0.013	0.014	TM segment with low...high consensus score	
				(in) / (out) cytoplasmic / non-cytoplasmic N-terminus	

At3g60750				transketolase, putative	
Single predictions and consensus prediction				Click on method names for references Click on image elements (below) for hydropathy profiles	
	Chloroplast	Mitochondrion	Secretory pathways		
ChloroP_v1.1	0.9	*	*		
iPSort	1	0	0		
MitoProt_v2	*	0.9964	*	chloroplast signal peptide is weakly...strongly predicted	
PCLR_v0.9	0.953	*	*	mitochondrion signal peptide is weakly...strongly predicted	
Predotar_v1	0.97	0.11	0.05	secretory pathways signal peptide is weakly...strongly predicted	
SignalP_HMM_v2	*	*	0.982	TM segment ignored due to overlapping with putative signal peptide	
SignalP_NN_v2	*	*	0.485	TM segment with low...high average hydrophobicity	
TargetP_v1	0.960	0.069	0.010	TM segment with low...high consensus score	
				(in) / (out) cytoplasmic / non-cytoplasmic N-terminus	

8.3.4. Transaldolasen

At1g12230				expressed protein
Single predictions and consensus prediction				Click on method names for references Click on image elements (below) for hydropathy profiles
	Chloroplast	Mitochondrion	Secretory pathways	
ChloroP_v1.1	0.925	*	*	
iPSort	1	0	0	
MitoProt_v2	*	0.9746	*	
PCLR_v0.9	0.980	*	*	
Predotar_v1	0.97	0.01	0.01	
SignalP_HMM_v2	*	*	0.497	
SignalP_NN_v2	*	*	0.172	
TargetP_v1	0.968	0.244	0.002	
				chloroplast signal peptide is weakly...strongly predicted mitochondrion signal peptide is weakly...strongly predicted secretory pathways signal peptide is weakly...strongly predicted TM segment ignored due to overlapping with putative signal peptide TM segment with low...high average hydrophobicity TM segment with low...high consensus score (in) / (out) cytoplasmic / non-cytoplasmic N-terminus

At5g13420				transaldolase, putative
Single predictions and consensus prediction				Click on method names for references Click on image elements (below) for hydropathy profiles
	Chloroplast	Mitochondrion	Secretory pathways	
ChloroP_v1.1	0.985	*	*	
iPSort	1	0	0	
MitoProt_v2	*	0.9472	*	
PCLR_v0.9	0.982	*	*	
Predotar_v1	0.93	0.02	0.00	
SignalP_HMM_v2	*	*	0.017	
SignalP_NN_v2	*	*	0.173	
TargetP_v1	0.978	0.062	0.003	
				chloroplast signal peptide is weakly...strongly predicted mitochondrion signal peptide is weakly...strongly predicted secretory pathways signal peptide is weakly...strongly predicted TM segment ignored due to overlapping with putative signal peptide TM segment with low...high average hydrophobicity TM segment with low...high consensus score (in) / (out) cytoplasmic / non-cytoplasmic N-terminus

8.4. Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

Die Orientierung der angegebenen Primersequenzen ist stets von 5' nach 3'.

156f

GGC TTT CAC CGA TTC CCA A

289r

TGA ATC CGA TGA GCC AAC G

JL202 (*left border* Primer)

CAT TTT ATA ATA ACG CTG CGG ACA TCT AC

635f

TCT TCT CTG TTA TCT TCT CGT CTT TAC TC

RPT rev

ATC AAG TAG ACG AGG TCA AGA ACT AAG TA

Ich danke...

Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge für das interessante Thema, die hervorragende Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und praktische Hilfe, besonders in Sachen Transportversuche, und die Finanzierung all' der Jahre.

Frau Prof. Dr. S. Waffenschmidt für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und ihren Realismus, aber auch für die Aufmunterungen, nicht zuletzt im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Dem Graduiertenkolleg "Molekulare Analyse von Entwicklungsprozessen (bei Pflanzen)"; d.h. der DFG für die Finanzierung, den Dozenten und KollegiatInnen für gute Vorlesungen und Seminare, theoretische wie praktische Hilfe bei diversen Problemen, für den Stammtisch und die Feten; und die externen Seminare erst...

Prof. Dr. G. Weißenböck für die Nutzungserlaubnis der Vötsch-Kammer (ist ja auch nix kaputtgegangen) und dort besonders Katja Kleinschmidt, auch für die Hilfe bei den Flavonoiden.

HD Dr. K. Fischer für seine überragende Art, handfeste Hilfe, konstruktive Vorschläge, gnadenlose Denkanstöße, Diskussionen und Ideen ("Ööh, hör' zu..."), Trost bei Trübsal ("Vor Weihnachten hat jeder grundsätzlich Durchhänger..."), und die - gezwungenermaßen - vielen Gelegenheiten zu Fahrten mit seinem Roller.

Dr. F. Ludewig für die allumfassende Hilfe, Diskussionen bei Kölsch in der Laube, wichtigen Beistand in schwieriger Situation und so manche Musik, die ich vorher nicht kannte. Humppa is a serious thing!

Dr. A. Schneider für ihre Hilfe, u.a. zum Thema Arabidopsis, Pflänzchen, Mutanten, Rückkreuzungen und ihre Geduld, mit der sie mir die Sachverhalte (Genetik für Arme) erklärt hat.

Dr. Rainer Häusler für die Hilfe auf dem Gebiet der Photosynthesemessungen und beim Verstehen des dazugehörigen Hintergrundes – aber so *richtig* habe ich es immer noch nicht...

Dr. Rainer Schwacke für seine (für Norddeutsche erfreulich untypische) Mitteilsamkeit nicht nur in Computerangelegenheiten, und dass er mir das Administratorenpasswort gegeben hat.

Dr. Lars Voll für universelle Hilfe bei so gut wie allem Möglichen; fachlich wie privat, seriös wie zweifelhaft, lustig wie traurig, träge wie sportlich.

Patrycja Niewiadomsky und Diana Hille für die Hilfe bei diversen Himmelsrichtungen - ohne euch hätte ich die nicht geschafft - und Marion Kerstholt für die Einweisung in gDNA-Schnellpräps und die meditativen Aspekte des Pikierens.

Gabi Fiene für die Verbesserung meiner Pikiertechnik, wichtige Hinweise auf vertrocknende Pflanzen und Freibier im Haus Müller. Kölsch Jemölsch Alaaf!

Daniel Marquardt für seine begeisterte Mitarbeit an dem Konstrukte-Projekt (weiter so, Junge) und außerdem, weil auch er Mr. Bungle gut findet – oder?

Kirsten Bell und Claudia Nothelle für die spontane Übernahme von Hefepflege, Anzucht, Ernte, Membranen - der Kühlraum ist hart, ich weiß, aber wir sind härter!

Oliver Zobell für die Hilfe bei den Experimenten zum Frühblüher-Phänotyp und Dennis Wormuth für die GSH/GSSG-Messungen und die gute Zeit in Bielefeld - "I will survive!"

Fr. Lorbeer für die Hilfe bei administrativen Angelegenheiten von A wie Anstellung bis Z wie Zusatzversorgung, ohne die nicht nur ich, sondern die ganze AG schon längst aufgelöst wäre.

Der AG Flügge mit allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern (ohne alle einzeln aufzuzählen, denn es sind derer so viele) – hey, was soll ich sagen? Wenn man so viele Jahre zusammen gearbeitet, voneinander gelernt und was erreicht hat; viele Feste gefeiert, Zigaretten geraucht und Kaffee getrunken hat; in der Mensa, der Kneipe und beim Grillen war; bei Badminton, Jogging und Campuslauf gerannt ist, auf Tagungen oder dem Ijsselmeer war oder durchnässt vom Wandertag heimkam - einfach eine großartige Gruppe. Es war immer klasse mit euch und das werde ich vermissen.

Den Mitarbeitern von Gärtnerei und Werkstatt für's Gießen, Topfen, Pflegen, Bauen, Reparieren, Reinigen, Ausleihen, Reden...

Den "A.B.C."-Korrekturteam - Ha! Fehler übersehen ;-) Ani, Beate und Cacky.

Meinen nicht-Uni Freunden für's Nichts-mit-der-Uni-zu-tun-haben. Ein Glück, dass es euch gibt.

Der Band für manche willkommene Gelegenheit etwas früher Feierabend zu machen (wer proben muss, der kann nix) und "The Return of Lenin Stars'n Stripes"!

Dem Sauerland und seinen Einwohnern der Familie Gland; Irmgard und Siegfried, Michelle, Markus und Timo.

Meiner Familie für die jahrelange Geduld ("dä es jo emmer noch an dä Uni"), die uneingeschränkte Unterstützung in wirklich allem und die Wochenenden in der Eifel - "Die Verwandtschaft ist dicker als Blut!" - stimmt genau, Ela.

Und: Meiner Süßen, meinem Mädchen – was wäre ich ohne dich? Ich liebe dich, T.

Erklärung:

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht publiziert worden ist und dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung der Universität zu Köln sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.-I. Flügge betreut worden.

Teilpublikationen:

Eicks, M., Maurino, V., Knappe, S., Flügge, U.I. and Fischer, K. (2002) The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiol*, 128, 512-522.

Häusler, R.E., Baur, B., Scharte, J., Teichmann, T., Eicks, M., Fischer, K.L., Flügge, U.I., Schubert, S., Weber, A. and Fischer, K. (2000) Plastidic metabolite transporters and their physiological functions in the inducible crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J*, 24, 285-296.

Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen:

Michael Eicks, Véronica Maurino, Silke Knappe, Ulf-Ingo Flügge, Karsten Fischer (2002) Molekulare Charakterisierung eines plastidären Pentosephosphat-Transporters. 15. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen; Poster 38.

Eicks, M., Maurino, V., Knappe, S., Schubert, S., Flügge, U.-I., Fischer K. (2001) The pentose phosphate/phosphat translocator from *Arabidopsis thaliana*: Transport properties and genomic characterization. 12th International Conference on Arabidopsis Research, Madison, Wisconsin, USA; Poster 132

Eicks, M., Deterding, S., Flügge, U.-I., Schubert, S., Fischer, K. (2000) Transport of pentose phosphates across the inner envelope membrane of plastids and characterization of a GPT-homologous phosphate translocator from *Arabidopsis thaliana*. Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Jena; Poster 03-16

M. Eicks, S. Schubert, U.-I. Flügge und K. Fischer (1998) Transport von Ribulose-5-phosphat über die innere Plastidenhüllmembran. Jahrestagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft 1998, Bremen; Poster 8a.30

Kurzzusammenfassung:

Der EST-Klon 121I21T7 aus *Arabidopsis thaliana* kodiert für einen Xylulose-5-phosphat/Phosphat-Translokator (AtXPT), der einer neuen, vierten Unterfamilie plastidärer Phosphattranslokatoren (pPT) angehört. Unter physiologischen Bedingungen kommen anorganisches Phosphat, Triosephosphate und Xylulose-5-phosphat (Xu5P) als Substrate in Frage, nicht jedoch Hexosephosphate. Datenbankanalysen bezüglich der subzellulären Verteilung von Enzymen des oxidativen Pentosephosphatwegs (OPPP) in *Arabidopsis* zeigten, dass dieser im Cytosol bis zur Stufe von Xu5P ablaufen kann, während in Plastiden ein vollständiger OPPP operiert. Der XPT könnte eine Rolle in der Kooperation zwischen beiden OPPPs übernehmen, indem er das Endprodukt des cytosolischen OPPP in die Plastiden transportiert. Dieser Funktion wurde eine potentiell große Bedeutung unter Bedingungen eines erhöhten Bedarfs an Erythrose-4-Phosphat für den Shikimatweg beigemessen. Die Analyse der *knock-out*-Mutante des Translokators (*xpt-1*) konnte jedoch gerade den letzten Punkt widerlegen. Offensichtlich ist der Shikimatweg quantitativ und qualitativ nicht durch den Ausfall des XPT limitiert. Die Überprüfung diverser physiologischer Parameter legte den Schluss nahe, dass es durch die Mutation zu einer messbaren Veränderung im Zuckerstoffwechsel kommt, die auf noch ungeklärte Weise allgemeine Stresssymptome hervorruft. Insgesamt ist in *xpt-1* jedoch keine wesentliche Einschränkung der pflanzlichen Funktionen festzustellen.

In der induzierbaren Crassulaceen-Säurestoffwechsel-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* wurden durch Transportversuche im rekonstituierten System die Transportaktivitäten dreier pPT-Proteine untersucht. In Übereinstimmung mit physiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten dadurch die CAM-spezifischen Funktionen dieser Translokatoren aufgedeckt werden.

Abstract:

The *Arabidopsis* EST-clone 121I21T7 codes for a xylulose 5-phosphate/phosphate-translocator (AtXPT). The AtXPT belongs to a novel, fourth group of plastidic phosphate translocators (pPT). Under physiological conditions, the XPT accepts inorganic phosphate, triose phosphates and xylulose 5-phosphate (Xu5P) as substrates, but not hexose phosphates. Data base analysis revealed that in *Arabidopsis*, the oxidative pentose

phosphate pathway (OPPP) proceeds to the stage of Xu5P, but not further. The XPT protein would therefore function in the cooperation of the two OPPPs of plants, importing Xu5P as the end-product of the cytosolic OPPP into the plastids to be further metabolised. This could be of particular importance under circumstances of higher demand for erythrose 4-phosphate by the shikimate pathway. Analysis of the *xpt-1* knock-out mutant pointed against the latter. The shikimate pathway is not limited by the XPT missing, neither with respect to quantity nor quality. Different physiological parameters indicated a perturbation in sugar metabolism leading, for reasons not yet fully understood, to rather unspecific stress symptoms. In total, the mutation does not have major effects on essential plant functions.

In the inducible Crassulacean acid metabolism-plant *Mesembryanthemum crystallinum*, transport activities of three different pPTs have been studied using the reconstituted system. Together with physiological and molecular analysis provided by other groups, the specific functions of the translocators during Crassulacean acid metabolism were unraveled.

Michael Eicks
Trierer Str. 47
50674 Köln
Tel.: 0221 / 240 73 91

Lebenslauf

Name: Michael Hubert Eicks
Geburtsdatum: 24.11.1969
Geburtsort: Rheinbach
Vater: Hans Eicks, Schreinermeister und Brandschutztechniker
Mutter: Regina Eicks, geb. Schumacher, Hausfrau
Geschwister: Werner Eicks, Rechtsanwalt
Hildegard Poensgen, geb. Eicks, Landesbeamtin
Schule: 1976-1980 Kath. Grundschule, Bad Münstereifel-Arloff
1980-1989 Städt. St. Michael-Gymnasium,
Bad Münstereifel, Abiturnote 2,3
Zivildienst: 1989-1991 auf der Kreisgeschäftsstelle des DRK,
Euskirchen
Studium: ab 10.1991 Studium der Biologie (Diplom) an der
Universität zu Köln
05.1997 Ablegung der Diplom-Prüfungen mit der
Gesamtnote 1,1
08.1997-08.1998 Anfertigung einer molekularbiologischen
Diplomarbeit mit dem Titel "Expression rekombinanter
Phosphattranslokatoren in Hefe" unter der Anleitung von
Prof. Dr. U.I. Flügge mit der Note 1.
Promotion: 12.1998-11.2001 im Graduiertenkolleg "Molekulare
Analyse von Entwicklungsprozessen", ab 08.2000 als
Sprecher der Kollegiaten
12.2001-06.2004 wissenschaftlicher Angestellter im
Botanischen Institut der Universität zu Köln, Lehrstuhl II