

Molekulare Charakterisierung
zweier neuer Purintransporter-Familien
aus *Arabidopsis thaliana*

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Esther Meißner
aus Köln

Köln 2007

Berichterstatter: Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 11.06.2007

Für meine Mutter

Der Weg ist das Ziel (Lao Tse)

Man wird nie fertig (Ulf Ingo Flügge)

The winning is not important
- it is the struggle that counts (D. Gemmell)

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
1. Allgemeines zum Substrattransport über Membranen.....	1
2. Purine und Pyrimidine.....	1
2.1. Allgemeines zum Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel in Pflanzen.....	1
3. Transport von Purinen und Purinderivaten in Pflanzen.....	3
3.1. Purintransporter.....	3
3.2. Die Nukleobasen/Ascorbat Transporter-Familie (NATs).....	7
3.2.1. Die Rolle von Ascorbat in Pflanzen.....	8
3.3 Die Azg Transporter-Familie (Azg´s).....	9
3.3.1. Die Rolle von Cytokininen in der Pflanze.....	11
3.3.2. Der Transport von Cytokininen in der Pflanze.....	14
4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	16
II. Material und Methoden.....	18
1. Materialien.....	18
1.1. Chemikalien und Enzyme.....	18
1.2. Kommerzielle Kits.....	18
1.3. Bakterien- und Hefestämme.....	18
1.3.1. <i>Escherichia coli</i>	18
1.3.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
1.3.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.4. Pflanzenmaterial.....	19
2. Molekularbiologische Methoden.....	20
2.1. Kultivierung von Bakterien.....	20
2.1.1. Nährmedien.....	20
2.1.2. Antibiotika.....	21
2.1.3. Kultivierungsbedingungen.....	21
2.1.4. Lagerung.....	21
2.2. Vektoren.....	22
2.3. Transformation von Bakterien.....	22
2.3.1. Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
<u>2.3.1.1. Herstellung von Rb-Cl-kompetenten Zellen</u>	22
<u>2.3.1.2. Transformation von Rb-Cl-kompetenten Zellen</u>	23
2.3.2. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
<u>2.3.2.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen</u>	23
<u>2.3.2.2. Transformation von elektrokompetenten Zellen</u>	24
2.3.3. Transformation von Hefezellen.....	24

2.4. Methoden zur Aufreinigung und Bearbeitung von DNA.....	25
2.4.1. Isolierung von Plasmid DNA	25
2.4.1.1. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen nach Birnboim & Doly (1979).....	25
2.4.1.2. Plasmidisolierung aus Agrobakterien.....	26
2.4.2. Quantifizierung und Lagerung von DNA.....	26
2.4.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	27
2.4.4. Entsalzen von DNA.....	27
2.4.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	27
2.4.6. Fällung und Aufkonzentrierung von Plasmid-DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	27
2.4.7. Agarose Gelelektrophorese.....	28
2.4.8. Behandlung mit alkalischer Phosphatase.....	28
2.4.9. Umwandlung von überhängenden 5'-Enden in glatte Enden.....	29
2.4.10. Ligation von DNA-Fragmenten.....	29
2.4.11. Gateway® Klonierung	29
2.5. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	30
2.5.1. Allgemeines zu PCR-Reaktionen.....	30
2.5.2. Amplifikation von DNA für Klonierung.....	30
2.5.3. Colony-PCR.....	31
2.6. Sequenzierung.....	32
3. Methoden zur Untersuchung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
3.1. Sterilisation des Saatgutes.....	32
3.1.1. Sterilisation mit Chlorgas.....	32
3.1.2. Flüssigsterilisation	32
3.2. Anzucht auf Erde.....	33
3.2.1. Anzucht unter Trockenstreß und Paraquatbehandlung.....	34
3.2.2. Anzucht von <i>Arabidopsis</i> unter Licht- und UV-Streß.....	34
3.3. Schädlingsbekämpfung.....	35
3.4. Anzucht auf sterilen Platten.....	35
3.4.1. Anzucht unter Streß- und Mangelbedingungen.....	36
3.5. Anzucht in sterilen Schüttelkulturen.....	38
3.6. Probennahme.....	39
3.7. Pflanzenselektion.....	39
3.7.1. Selektion auf sterilen Agar-Platten.....	39
3.7.2. BASTA-Selektion	39
3.8. Vakuuminfiltration (nach Bechthold <i>et al.</i> , 1993).....	40
3.9. Präparation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
3.9.1. DNA-Isolation für PCR-Reaktionen.....	40
3.9.2. Screening von Pflanzenpopulationen für homozygote Linien.....	41
3.10. Präparation von RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
3.10.1. RNA-Isolierung mit Trizol.....	42
3.10.2. Quantifizierung und Lagerung von RNA.....	43

3.10.3. Agarose-Gelelektrophorese von RNA.....	43
<u>3.10.3.1. Zur Kontrolle der RNA-Qualität.....</u>	43
<u>3.10.3.2. Für Northern Blot.....</u>	43
3.11. Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembran (Northern Blot).....	44
3.12. Northern Hybridisierung.....	44
3.13. Radioaktive Markierung von DNA.....	45
3.13.1. Herstellung der Sonde.....	46
3.14. Transkriptnachweis durch Semiquantitative RT-PCR.....	46
3.14.1. DNase Verdau der isolierten RNA.....	47
3.14.2. Reverse Transkription	47
3.14.3. Semiquantitative RT-PCR.....	47
3.15. GUS-Färbung von <i>A. thaliana</i> Gewebe.....	48
3.16. Kalluskultur und Tumorinduktion.....	49
3.17. Transiente Transformation von <i>A. thaliana</i> - und Zwiebelepidermiszellen.....	49
3.18. Cytokinin Bestimmung.....	50
3.19. Ascorbat/Glutathion Messungen in Arabidopsis.....	50
3.20 Transportmessungen in Pflanzen („Pflanzen-Uptakes“)......	50
4. Klonierungen.....	51
4.1. Herstellung der <i>pAtNAT-GUS</i> und <i>pAtAzg-GUS</i> Pflanzen.....	51
4.2. Konstruktion der <i>AtNAT-GFP</i> und <i>AtAzg-GFP</i> Fusionen.....	52
4.3. Herstellung der <i>AtAzgI</i> -überexprimierenden Pflanzenlinien.....	54
5. Mikroskopie und Dokumentation.....	55
6. Internetadressen.....	55
7. Software.....	56
III. Ergebnisse.....	57
1. Nähere Charakterisierung der Nukleobase-Ascorbat Transporter (NAT)- und Azg-Familie aus Arabidopsis <i>thaliana</i>	57
1.1. Phylogenetische Analyse von <i>A. thaliana</i> NAT- und Azg-Genen.....	57
1.2. Die Struktur der <i>AtNAT</i> -Familie.....	58
1.3. Die Struktur der <i>AtAzg</i> -Familie.....	63
2. Expressionsanalysen zur Bestimmung der Promoteraktivität.....	66
2.1. Gewebespezifische Expression der <i>AtNAT</i> -Gene (RT-PCR).....	66
2.2. Gewebespezifische Expression der <i>AtAzg</i> -Gene (RT-PCR).....	66
2.3. Expressionsmuster der <i>pAtNAT::GUS</i> Pflanzen.....	67
2.3.1. <i>AtNAT</i> 's der Subfamilie I.....	67
2.3.2. <i>AtNAT</i> 's der Subfamilie II.....	70
2.3.3. <i>AtNAT</i> 's der Subfamilie III.....	71
2.3.4. <i>AtNAT</i> 's der Subfamilie V.....	73
2.4. Untersuchungen von <i>AtNATs</i> zur Induzierbarkeit der Promoteraktivität in undifferenziertem Gewebe.....	75

2.5. Expressionmuster der <i>pAtAzgI::GUS</i> Pflanzen.....	78
2.6. Untersuchungen von <i>AtAzgI</i> zur Induzierbarkeit der Promoteraktivität durch pflanzliche.....	
Hormone.....	79
2.6.1. Die semiquantitative RT-PCR zeigt eine Reaktion des <i>AtAzgI</i> Promoters auf die Behandlung mit Cytokinin.....	80
2.6.2. <i>pAtAzgI::GUS</i> -Pflanzen zeigen eine <i>GUS</i> -Induktion durch verschiedene Cytokinine..	81
3. Lokalisation der <i>NATs</i> und des <i>AzgI</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit GFP.....	82
3.1. Lokalisation der <i>AtNAT</i> -GFP Fusionsproteine in <i>A. thaliana</i> Zellsuspensionen und <i>Allium cepa</i> Epidermiszellen.....	82
3.2. Lokalisation der <i>AtAzgI</i> -GFP Fusionsproteine in <i>A. thaliana</i> Zellsuspensionen und <i>Allium cepa</i> Epidermiszellen.....	84
4. Untersuchung von <i>A. thaliana NAT</i> Insertionsmutanten.....	86
4.1. Identifikation der <i>AtNAT</i> -Insertionsmutanten.....	86
4.2. Knockout-Pflanzen der <i>AtNAT</i> -Familie zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp.....	87
4.3. Herstellung von Doppel- und Tripelmutanten.....	87
4.4. Experimentelle Untersuchungen von <i>AtNAT</i> Knockout-Pflanzen im Zusammenhang mit Ascorbat und Gluthathion.....	89
5. Untersuchung von <i>A. thaliana AzgI</i> -nsertionsmutanten und Überexpressionslinien.....	90
5.1. Identifikation der <i>AzgI</i> -Insertionsmutanten.....	90
5.2. Isolierung der <i>AzgI</i> -Überexpressionslinien.....	91
5.2.1. Northern-Blot Analyse.....	91
5.3 Phänotypische Charakterisierung und <i>in vivo</i> Transportversuche mit <i>azgI</i> -Knockout- und <i>CaMV35S::AtAzgI</i> -überexprimierenden transgenen Pflanzen.....	92
5.3.1. Wachstum auf Hemmstoffen und Cytokinin.....	92
5.3.1.1. Der Effekt toxischer Purinanaloge auf das Wachstum von Keimlingen.....	92
5.3.1.2. Der Effekt von Cytokinin auf die Entwicklung von Keimlingen.....	93
5.3.2. <i>in vivo</i> Transport von Adenin und Cytokinin durch <i>AtAzgI</i>	96
6. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	99
IV. Diskussion.....	102
1. Nukleobase/Ascorbat-Transporter.....	102
2. <i>Azg</i> -Transporter.....	107
3. Zusammenfassung.....	113
4. Abstract.....	114
V. Literaturverzeichnis.....	115
VI. Anhang.....	128
Tabelle 1.....	128
Tabelle 2.....	129
Tabelle 3.....	130

Tabelle 4.....	130
Tabelle 5.....	131
Tabelle 6.....	132
Tabelle 7.....	132
Abkürzungen.....	133
Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren.....	134
Vektorkarten.....	135
Abbildung 38.....	140
Danksagung.....	141
Teilpublikationen, Tagungsbeiträge, frühere Veröffentlichungen.....	143
Erklärung.....	144
Lebenslauf.....	145

I. Einleitung

1. Allgemeines zum Substrattransport über Membranen

Alle Zellen sind von einer Biomembran umgeben, die aus einer amphiphilen Phospholipid-Doppelschicht besteht. Auch die verschiedenen Kompartimente einer Zelle sind von einer Membran umgeben. Diese Membran stellt für große und geladene Moleküle eine Permeabilitätsbarriere dar, erlaubt aber die Passage apolarer, hydrophober Substanzen. Um mit benachbarten Zellen zu kommunizieren bzw. ihren Metabolismus aufrecht zu erhalten, sind Zellen auf den Austausch von Molekülen verschiedenster Größen mit benachbarten Zellen und dem Transportsystem angewiesen (De Koning und Diallinas, 2000). Der kontrollierte Stoffaustausch über die Membran wird durch Membranproteine vermittelt, die als Kanäle, Pumpen oder „Carrier“ (Transporter) fungieren. Transporter überbrücken die Zellmembranen, um den Stofftransport zu ermöglichen, und zeichnen sich teilweise durch eine hohe Substratspezifität aus. Transporter, die ihre Substrate entgegen dem elektrochemischen Potential anreichern, benötigen für ihre Aktivität Energie in Form von ATP oder dem Membranpotential. Durch biochemische und genomische Analysen konnten die Funktionen von vielen Transportern geklärt werden. Sequenzanalysen und Sequenzvergleiche haben in allen bekannten Genomen (265 Organismen, darunter 210 Bakterienarten, 24 Archaeobakterien und 31 Eukaryota) bisher ca. 550 Transporterfamilien identifiziert, die je nach Organismus 1,2 % (*Endamoeba histolytica*) bis 15,7 % (*Lactobacillus plantarum*) des Genoms ausmachen (TransportDB; Ren *et al.*, 2004; <http://www.membranetransport.org>).

2. Purine und Pyrimidine

2.1. Allgemeines zum Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel in Pflanzen

Purinderivate spielen im pflanzlichen Stoffwechsel eine sehr wichtige Rolle. Purine und Pyrimidine (Abbildung 1) sind Bestandteil von Nukleotiden und Nukleobasen, die im pflanzlichen Stoffwechsel häufige Verwendung finden: Als Bestandteil von DNA und RNA, aber auch als Energieträger und Redox-Übermittler wie z. B. ATP, NAD(P)H und FAD. Purine sind weiterhin wichtige Bestandteile von pflanzlichen Signalmolekülen (cAMP) und

Hormonen wie z.B. Auxine und Cytokinine (Moffatt und Ashihara, 2002; Smith und Atkins, 2002; Stasolla *et al.* 2003; Wormit *et al.* 2004). Auf Grund des hohen Bedarfs an Purinen und Pyrimidinen spielen die Biosynthese und der Stoffwechsel von Nukleotiden eine entscheidende Rolle beim Wachstum und der Entwicklung von allen Organismen. In Pflanzen nimmt die Synthese von Purinen eine Sonderstellung ein, da die Nukleotide Vorstufen für Purinalkaloide, wie zum Beispiel Coffein und Cytokinine sind (Smith und Atkins, 2002). Die Purin-Biosynthese findet in Pflanzen in den Plastiden statt, im tierischen Stoffwechsel ist die Synthese im Cytosol lokalisiert (Smith und Atkins, 2002). In den pflanzlichen Plastiden ist Inosin-Monophosphat (IMP) das erste Produkt der Purin-*de-novo*-Synthese mit einem kompletten Purinring. Es wird anschließend in Xanthin-Monophosphat, AMP, GMP, und Xanthin umgewandelt. Es ist bis heute nicht bekannt, welche dieser Nucleobasen aus den Plastiden exportiert wird, um z.B. im Kern die Nucleinsäure aufzubauen.

Die Pyrimidinsynthese ist ebenfalls in den Plastiden lokalisiert (Moffatt und Ashihara, 2002). Die Eingangsreaktion der Pyrimidin-*de-novo*-Synthese, auch als „Orotatweg“ bezeichnet, umfaßt sechs Reaktionsschritte und wird von der Carbamoylphosphatsynthetase katalysiert (Moffatt und Ashihara, 2002). Diese bewirkt die Bildung von Carbamoylphosphat aus HCO_3^- , ATP und einer Aminogruppe. Drei weitere Reaktionen sind nötig, um den Pyrimidinring aus Carbamoylphosphat zu bilden. UMP wird dann zu UDP und UTP phosphoryliert. Cytosintriphosphat (CTP) wird durch den Transfer einer Aminogruppen von Glutamin auf UTP durch das Enzym CTP-Synthetase gebildet. Aus UDP entsteht außerdem in mehreren Schritten das für die DNA-Synthese wichtige Thymidintriphosphat (TTP) (Moffatt und Ashihara, 2002; Stasolla *et al.*, 2003).

Nucleotide werden entweder via Purin-*de-novo*-Synthese, bzw. Pyrimidin-*de-novo*-Synthese, oder aus bereits vorhandenen Nucleobasen und Nucleosiden durch Recycling gewonnen (Moffatt und Ashihara, 2002; Stasolla *et al.* 2003). Die Strategie des Recyclings und Abbau von Nucleotiden ist für die Zelle energetisch sehr günstig. Bei dem Purinrecycling zeigt der Vergleich, daß die Purinsynthese bei 12 enzymatischen Schritten 5 ATP bzw. GTP benötigt (Moffatt und Ashihara, 2002), wobei das Recycling nur in einem Schritt Energie verbraucht. Sowohl bei Pyrimidinen als auch bei Purinen verläuft das Recycling meist nach dem gleichen Prinzip. Die entsprechende Base, bzw. das entsprechende Nucleosid wird durch Phosphorylierung in das zugehörige Nucleotid umgewandelt (Kafer *et al.* 2004; Moffatt und Ashihara, 2002).

Im Purinabbauweg der Pflanzen werden Purinnukleotide über Xanthin, Harnsäure, Allantoin und Allantoinsäure zu Ammonium (NH_4^+) und Kohlenstoffdioxid (CO_2) degradiert. Bei Menschen und Affen hingegen ist das Endprodukt Harnstoff, in anderen Säugetieren ist Allantoin das Hauptabbauprodukt (Henderson und Paterson, 1973).

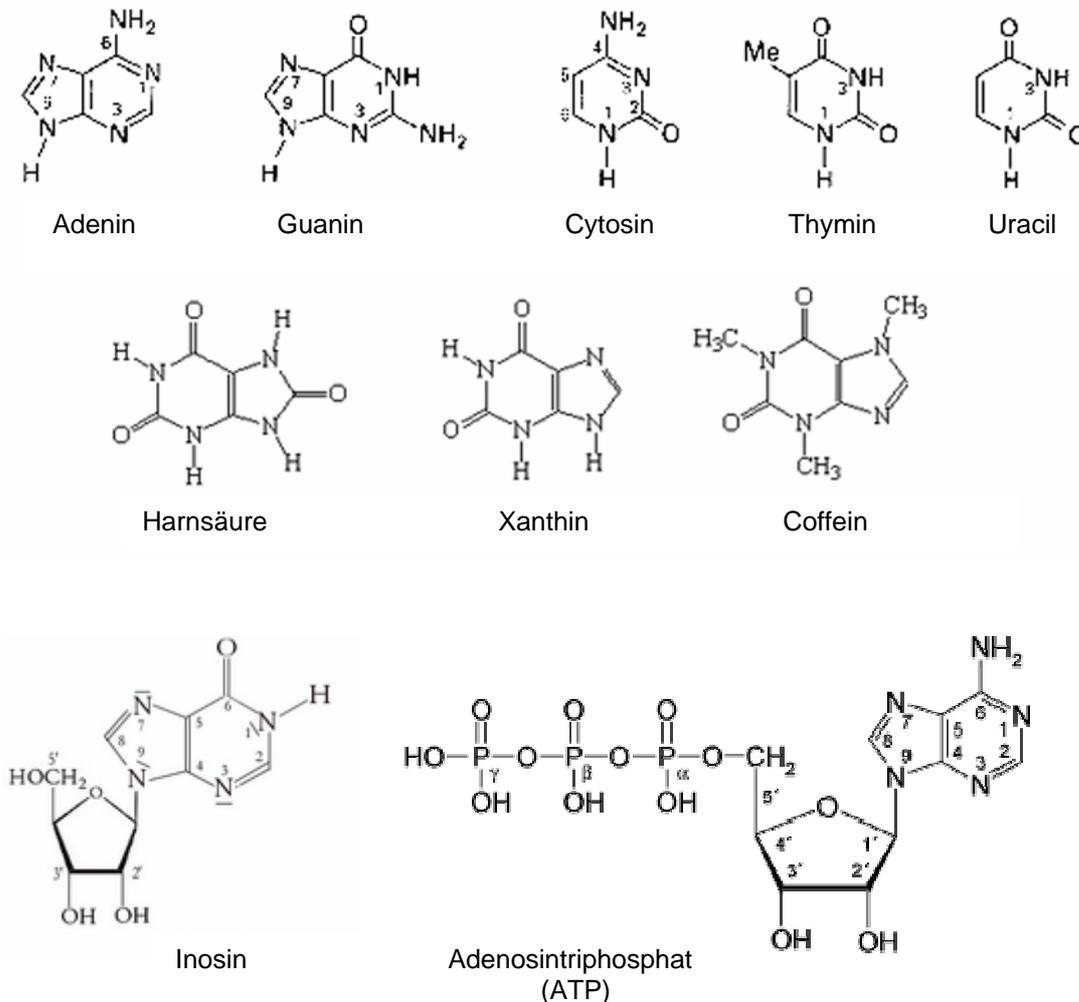


Abbildung 1: Struktur verschiedener Nucleobasen, darunter die Purine Adenin, Guanin, Harnsäure, Xanthin und Coffein und die Pyrimidine Cytosin, Thymin und Uracil. In der unteren Reihe Inosin in der Nucleosidform und das Nucleotid Adenosintriphosphat. Die Zahlen entsprechen dem IUPAC Nummerierungssystem.

3. Transport von Purinen und Purinderivaten in Pflanzen

3.1. Purintransporter

Purine sind für alle Lebewesen essentiell. In Pflanzen müssen sie, ebenso wie die Pyrimidine, von ihrem Synthesort in den Plastiden zu den verschiedenen Zellkompartimenten transportiert werden, um z.B. für die Nucleinsäuresynthese im Kern zur Verfügung zu stehen. Der Nucleobasen-Metabolismus findet in Pflanzen ebenfalls in verschiedenen Kompartimen-

ten der Pflanzenzelle statt. Diese Umstände weisen auf eine Vielzahl an Purin-, bzw. Nucleobasen-Transportern hin, die spezifische Eigenschaften in Bezug auf Substrate, Kompartimente und Membranen besitzen.

Bis heute sind mehrere Transporter in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen entdeckt und beschrieben worden, die spezifisch für Purine und deren Derivate sind (Argyrou *et al.* 2001; De Koning und Diallinas, 2000; Desimone *et al.* 2002; Gillissen *et al.* 2000; Li *et al.* 2003; Owen *et al.* 2006; Wormit *et al.* 2004). Die zugrundeliegenden Transportmechanismen sind noch wenig untersucht. Es konnten bisher insgesamt sechs verschiedene Familien von Purin- und Purinderivattransportern in allen Organismen beschrieben werden. Sie werden in „Concentrative Nucleoside Transporters“ (*CNT's*, Owen *et al.* 2006), „Equilibrative Nucleoside Transporters“ (*ENTs*, Li *et al.* 2003; Wormit *et al.* 2004), „Purine-Related Transporters“ (*PRT's*, De Koning und Diallinas, 2000), „Purine Permeases“ (*PUPs*, De Koning *et al.* 2000; Gillissen *et al.* 2000), „Ureide Permeases“ (*UPS's*, Desimone *et al.* 2002) und „Nucleobase-Ascorbate-Transporters“ (*NATs*, Argyrou *et al.* 2001; De Koning und Diallinas, 2000), unterteilt.

CNT's zeichnen sich durch 12-13 vorhergesagte Transmembrandomänen und entweder einen Na^+ - oder H^+ -energetisierten Cotransport aus (Wormit *et al.*, 2004). Die Substratspezifität ermöglicht eine Unterscheidung der drei Subtypen von *CNTs* in *CNT1*, *CNT2* und *CNT3* (Gray *et al.* 2004). *CNT1* bevorzugt als Substrat Pyrimidinnucleoside, *CNT2* transportiert Purinnucleoside und *CNT3* transportiert sowohl Pyrimidin- als auch Purinnucleoside (Ritzel *et al.* 2001). Der Transport findet über eine Plasmamembran statt und konnte für *CNT1* primär nur in Epithelzellen gezeigt werden (Owen *et al.* 2006; Ritzel *et al.* 2001), wohingegen *CNT2* und *CNT3* gleichmäßig auf alle Gewebe verteilt zu sein scheinen (Gray *et al.* 2004). *CNT* Proteine wurden bisher in einer Reihe von Bakterienarten und in Eukaryoten wie z.B. *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und in Säugetieren entdeckt (Huang *et al.*, 1994). Es wurden jedoch noch keine *CNTs* in Pflanzen gefunden (Wormit *et al.*, 2004).

Mitglieder der *ENT*-Familie besitzen typischerweise 11 vorhergesagte Transmembrandomänen und katalysieren den Transport durch einen existierenden Nucleosid-Konzentrationsgradienten. Bisher sind mehr als 40 Mitglieder der *ENT*-Familie in eukaryotischen Zellen identifiziert worden und es wird angenommen, daß sie mit prokaryotischen Nucleosid Transportern verwandt sind (Acimovic und Coe, 2002). Aus der

ENT-Familie von *A. thaliana* konnten bisher fünf von acht Isoformen näher charakterisiert werden (Wormit *et al.*, 2004). Sie zeichnen sich durch eine hohe Affinität und ein breites Substratspektrum aus. In Pflanzen konnte eine sekundäre Energetisierung durch Protonentransport nachgewiesen werden, dies trifft auch für Protozoen, wie z.B. *Leishmania donovani*, zu (Stein *et al.*, 2003; Wormit *et al.*, 2004). AtENT1 aus *A. thaliana* transportiert mit hoher Affinität Adenosin, aber in geringerem Maße auch Guanosin und Cytidin (Möhlmann *et al.*, 2001). AtENT3, AtENT4, AtENT6 und AtENT7 transportieren Adenosin, Guanosin, Cytidin und Uridin mit hoher Affinität (Wormit *et al.*, 2004). Es konnte ferner gezeigt werden, daß *AtENT1*, -3, -4, -6 und -8 möglicherweise eine wichtige Rolle bei den „Salvage Pathways“ der Nukleotidsynthese spielen (Möhlmann *et al.*, 2001), da bei einer Inhibition der *de novo*-Synthese von Thymidinmonophosphat (TMP) ein signifikanter Anstieg der Transkripte der oben genannten Gene nachweisbar war, und der Mangel an Nukleotid dadurch verringert werden konnte (Li *et al.* 2003). Die Transporterfamilie der *ENTs* konnte in Säugetieren, Insekten, Nematoden, Protozoen, Hefen und Pflanzen durch Sequenzanalysen nachgewiesen werden (Li *et al.* 2003).

Nukleobasen und ihre Derivate werden von Mitgliedern der *PUP*-Familie transportiert, die normalerweise 9-10 vorhergesagte Transmembrandomänen besitzen (De Koning und Djalilinas, 2000; Gillissen *et al.* 2000). Es konnten bisher nur Mitglieder in Pflanzen nachgewiesen werden. *AtPUP1* und *AtPUP2* aus Arabidopsis sind bis heute die einzigen Transporter der *PUP*-Familie mit bekannter Funktion. Zusätzlich wurden 13 paraloge Gene in Arabidopsis und mehrere orthologe Gene in anderen Pflanzengattungen entdeckt (Gillissen *et al.*, 2000). *AtPUP1* transportiert Adenin and Cytosin mit hoher Affinität (Gillissen *et al.*, 2000). Kompetitionsversuche mit Cytokininen zeigten eine Inhibition der Adeninaufnahme und lassen auf eine Rolle beim Transport von Cytokininen schließen (Bürkle *et al.* 2003). Während *AtPUP2* eine Rolle beim Phloemtransport spielen könnte, dürfte *AtPUP1* an der Wiedergewinnung von Nukleobasen und Nukleobasederivaten aus dem Xylem beteiligt sein (Bürkle *et al.*, 2003; Gillissen *et al.*, 2000).

Nukleobasen werden außerdem von den Transportern der *PRT*-Familie transportiert. Sie kommen weder in Pflanzen, noch in Tieren, sondern nur in Pilzen, Bakterien und Archaeobakterien vor. Ein Vertreter dieser Familie ist der Adenin-Guanin-Hypoxanthin-Cytosin-Transporter (*FCY2*) aus *Saccharomyces cerevisiae*. Für Aufnahmestudien wird die Mutante (*fcy2*) dieses Transporters zur Komplementation mit potentiellen Purintransportern

transformiert (Weber *et al.*, 1990). Die Homologie zwischen bakteriellen und pilzlichen Transportern beträgt nur 21-25%. Innerhalb einer Spezies liegen die Homologien zwischen 30-87%. Deshalb ist die Anzahl der Transmembrandomänen mit 9-13 nicht so einheitlich wie bei den übrigen Familien (De Koning und Diallinas, 2000).

In *Arabidopsis* gibt es zusätzlich eine Familie von Purinnukleobase-Transportern, die *AtUPS*-Familie (Desimone *et al.*, 2002). Bisher sind fünf paraloge Gene identifiziert, die eine Übereinstimmung ihrer Sequenz von 64-82 % zeigen und sich durch 10 vorhergesagte Transmembrandomänen auszeichnen. Neben den Transmembrandomänen ist ein großer cytosolischer Loop charakteristisch für diese Familie. Von den fünf identifizierten Genen wurden *AtUPS1*, *AtUPS2* und *AtUPS5* bereits beschrieben (Pélissier *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2006). *AtUPS1* transportiert Allantoin, Xanthin und Harnsäure mit hoher Affinität und sehr wahrscheinlich auch andere Purinderivate, wie Phytohormone (Zeatin und Kinetin), und Alkaloide (Coffein) (Gillissen *et al.*, 2000). Die *AtUPS*-Transporterfamilie benötigt für den Transport einen Protonengradienten (Desimone *et al.*, 2002).

Nukleobasen und Ascorbinsäure werden beide, obwohl strukturell nicht verwandt, von den Nukleobasen-Ascorbat-Transportern (*NATs*) transportiert. Die *NAT*-Familie ist sehr groß, stark konserviert und kommt sowohl im Tier- und Pflanzenreich, als auch in filamentösen Pilzen, Hefen, Eu- und Archaeobakterien vor (De Koning und Diallinas, 2000). Mehr als 40 vollständige Gene oder cDNAs und über 80 EST wurden bisher *in silico* identifiziert, die mögliche Mitglieder dieser Familie darstellen.

Der AzgA Transporter aus *Aspergillus nidulans* wurde bereits als spezifisch für Hypoxanthin, Guanin, Adenin beschrieben (Scazzocchio, Dissertation, 1966; Darlington und Scazzocchio, 1967; Diallinas *et al.*, 1995). Er transportiert außer Purinen auch das toxische 8-aza-Guanin. Erst 2004 wurde von Cecchetto *et al.* die dazugehörige, neue Familie beschrieben. Der Transporter ist keiner der oben beschriebenen Purin- und Purinderivattransporterfamilien zuzuordnen. Er zeichnet sich durch einen protonengekoppelten hochspezifischen Transport aus. Es konnten bisher keine Homologen in Pilzen oder Pflanzen identifiziert werden, bei denen die Funktion bereits untersucht wurde (Cecchetto *et al.*, 2004).

3.2. Die Nukleobasen/Ascorbat Transporter-Familie (NATs)

Bis heute wurden nur wenige NATs auf molekularer Basis untersucht. Allen gemeinsam sind mehrere konservierte Bereiche in der genomischen DNA. Eine Sequenz der besondere Bedeutung beigemessen wird, ist das sogenannte „nucleobase-ascorbate transporter signature motif“ [(F/Y/S)X(QE/P)NXGϕϕXϕT(K/R/G)] (wobei X eine beliebige und ϕ eine hydrophobe Aminosäure darstellt), welches in der Regel zwischen der 9. und 10. Transmembrandomäne liegt (Diallinas *et al.*, 1998; Meintanis *et al.*, 2000). Die besondere Bedeutung dieser Sequenz, wurde durch Experimente am filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans* untersucht und bestätigt. Besonders zwei Aminosäurereste des konservierten Proteinbereiches sind kritisch für die Funktion und die Spezifität des untersuchten Transporters (Meintanis *et al.*, 2000).

Aspergillus nidulans besitzt zwei Transporter der NAT-Familie (*UapA*, *UapC*). *UapA* transportiert mit hoher Affinität Xanthin und Harnsäure. *UapC* transportiert Xanthin und Harnsäure mit einer geringeren Affinität als *UapA*. Darüber hinaus transportiert *UapC* mit einer niedrigen Affinität auch andere Purine, wie Hypoxanthin, Adenin und Guanin, d. h. die Substratspezifität von *UapC* ist breiter als bei *UapA* (Diallinas *et al.*, 1995). Ascorbat wird von *UapA* und *UapC* zwar bei Transportversuchen gebunden, aber nicht transportiert (Diallinas *et al.*, 1995). Bisher wurden in Säugetierzellen (sowohl Mensch als auch Ratte) zwei NATs identifiziert (*SVCT1* und *SVCT2*). Diese katalysieren den Na⁺ gekoppelten Transport von Ascorbat (Daruwala *et al.*, 1999; Tsukaguchi *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2001). In Pflanzen wurde erst ein NAT Protein, Leaf Permease1 aus Mais (*ZmLPE1*), durch funktionelle Komplementation eines in der Purinaufnahme mutierten *A. nidulans* Stammes charakterisiert. *Lpe1* transportiert mit hoher Affinität Xanthin und Harnsäure und hat damit dieselbe Substratspezifität wie *UapA* aus *A. nidulans* (Argyrou *et al.*, 2001). Eine „loss-of-function“ Mutante (*lpe1*) zeigte geschädigte Chloroplasten als Phänotyp, wobei hier die Morphologie der Bündelscheidenchloroplasten betroffen war (Schultes *et al.*, 1996). Erstaunlicherweise besitzt das *ZmLPE1* Protein keine plastidäre Präsequenz und wird nur in nicht-photosynthetischem Gewebe wie Wurzeln und ethiolierten Blättern exprimiert. Der blaßgrüne Phänotyp, der bei der *lpe1*-Mutante zu sehen ist, ist ein häufig zu beobachtendes Merkmal bei pflanzlichen Mutanten. Möglicherweise ist deswegen der beobachtete Phänotyp durch andere Effekte und nicht durch die Mutation in *Lpe1* hervorgerufen worden. Keiner der oben genannten untersuchten Transporter transportiert beides, Ascorbat und Nukleobasen (de Koning und Diallinas, 2000).

3.2.1. Die Rolle von Ascorbat in Pflanzen

Ascorbat (Abbildung 2) ist ein multifunktionelles Molekül, das von den meisten Organismen synthetisiert werden kann. Zu den Ausnahmen unter den phylogenetisch höherentwickelten Organismen gehören Menschen, sowie andere Primaten, und Meerschweinchen (Nishikimi *et al.*, 1994). Ascorbat ist ein wichtiges Antioxidans, wirkt als Redoxsignal-Modulator und als Cofaktor von Enzymen. Darüber hinaus spielt es eine Rolle in der Verteidigung von Pflanzen gegen Pathogene, bei der Zellwandsynthese, als Wachstumsregulator und in der Modulation pflanzlicher Morphologie, der Blütezeit und der Auslösung der Seneszenz. (Noctor und Foyer, 1998; Arrigoni, 2000; Smirnoff, 2000a; Arrigoni und De Tullio, 2002; Conklin and Barth, 2004; Barth *et al.*, 2006; Olmos *et al.*, 2006)

Pflanzen synthetisieren L-Ascorbinsäure (Vitamin C) *de novo* und aus regenerativen Stoffwechselwegen (Valpuesta und Botella, 2004). Es werden zwei unterschiedliche *de novo* Wege in Pflanzen postuliert. Beide benötigen GDP- α -D-Mannose als Substrat. Der erste ist der L-Galaktose-Stoffwechselweg (Wheeler *et al.*, 1998) und der zweite wird als L-Gulose-Stoffwechselweg (Wolucka und Van Montagu, 2003) bezeichnet. Kürzlich wurde ein regenerativer Stoffwechselweg diskutiert, in dem in reifen Früchten Pektin in Galacturonsäure und schließlich in Ascorbat umwandelt wird (Agius *et al.*, 2003).

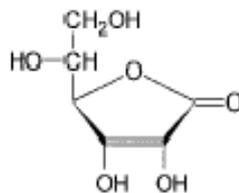


Abbildung 2: Struktur der L-Ascorbinsäure

Obwohl alle diese Synthesewege im Cytosol lokalisiert sind, akkumuliert Ascorbat in allen Zellkompartimenten in millimolaren Konzentrationen, auch im Apoplasten (Foyer und Lelandais, 1996). Dies weist auf einen intrazellulären Transport von Ascorbat hin, um alle Kompartimente erreichen zu können. Darüber hinaus wurde eine frühere Annahme des Langstreckentransportes über das Phloem bestätigt (Franceschi und Tarlyn, 2002). Dies schließt die Be- und Entladung des Phloems mit ein, wodurch weitere Membranen überquert werden müssen. Ascorbat-Transport in Pflanzen wurde schon früher nachgewiesen (Foyer und Lelandais, 1996; Horemans *et al.*, 2000). Bis heute wurden allerdings auf molekularer

Basis noch keine Transporter in Pflanzen entdeckt, die tatsächlich für den Transport von Ascorbat verantwortlich sind.

3.3. Die Azg Transporter-Familie (Azg's)

Der AzgA Transporter von *Aspergillus nidulans* ist der erste untersuchte Transporter dieser neuen Familie. Benannt wurde das AzgA Gen durch Darlington und Scazzocchio (1967), als diese eine *Aspergillus nidulans* Mutante (*azgA*) entdeckten, die fähig war, in Gegenwart des toxischen Purinanalogs 8-aza-Guanin zu wachsen. Das AzgA Gen kodiert für einen Hypoxanthin-Adenin-Guanin Transporter (Cecchetto *et al.*, 2004). Die Autoren veränderten das *A. nidulans* Gen durch eine neuartige Transposon-tagging Methode. Durch eine Anzahl von Mutationen im AzgA Gen, darunter Insertionen, Deletionen oder Veränderungen im Leseraster, konnten miteinander vergleichbare Veränderungen im Phänotyp der entstehenden Null Mutanten beobachtet werden. Alle *azgA* Mutanten sind resistent gegenüber dem toxischen Purinanalogs 8-aza-Guanin und können Hypoxanthin nicht als alleinige Stickstoffquelle benutzen (Cecchetto *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß AzgA aus *A. nidulans* in der Lage ist Guanin und Hypoxanthin zu transportieren. Da die Null-Mutante auch nicht auf dem toxischen Purinanalogs 8-aza-Adenin wuchs, wurde diese Transporteigenschaft den beiden ersteren hinzugefügt (Cecchetto *et al.*, 2004).

AnAzgA scheint keiner bisher beschriebenen Transporterfamilie anzugehören. Homologe zu *AnAzgA* mit bekannter Funktion wurden bisher nicht gefunden, jedoch konnten Homologe unbekannter Funktion in Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Archaeobakterien entdeckt werden. Proteine aus *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe* und ein Protein aus *Arabidopsis thaliana* zeigten im Vergleich mit *AnAzgA* noch die deutlichsten Ähnlichkeiten (Cecchetto *et al.*, 2004).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Genen aus verschiedenen Purin- und Purinderivat-Transporterfamilien zeigte keine vergleichbaren Sequenzabschnitte. Dennoch sind offensichtlich verwandtschaftliche Verhältnisse zu den NAT Transportern zu beobachten. Die Pfam-Datenbank (Bateman *et al.*, 2002) ordnet *AnAzgA* in die NAT-Familie, die auch schon *UapA* und *UapC* aus *A. nidulans* beinhaltet, ein. Die BLOCK-Datenbank (Henikoff und Henikoff, 1994) findet konservierte Domänen zwischen Mitgliedern der NAT-Familie und den *AnAzgA* Homologen. Die Datenbank TransportDB (Ren *et al.*, 2004;

<http://www.membranetransport.org>) beinhaltet Transporter von einer Anzahl verschiedener voll sequenzierter Organismen. Obwohl sich *A. nidulans* und seine Transporter nicht in dieser Datenbank befinden, werden die bakteriellen Homologen des *AnAzcA* Proteins hier in eine gemeinsame „nucleobase/cation symporter 2“- Familie (NCS2) eingeordnet, wobei NCS2 ein anderer Name für die NAT-Familie ist.

Die NAT-Erkennungssequenz, die zusätzlich offensichtlich eine funktionelle Wirkung hat, ist in dem *AnAzcA* Gen jedoch nicht zu finden, weswegen eine Zugehörigkeit zu der NAT-Familie hier ausgeschlossen wird. Die COG-Datenbank (Tatusov *et al.*, 2001; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>), welche 88 komplett sequenzierte Genome beinhaltet, platziert die zu *AnAzcA* homologen Gene in einer von der NAT-Familie getrennten Gruppe (Cecchetto *et al.*, 2004).

Der durch Cecchetto *et al.* (2004) beschriebene Transporter *AzcA* transportiert Hypoxanthin, Adenin und Guanin mit hoher Affinität. Aufgrund der hohen Homologie des *Azc*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* (im Folgenden als *AtAzc1* bezeichnet) zu *AnAzcA* lag die Vermutung nahe, daß *Azc1* ebenfalls Purine transportiert. *AtAzc1* wurde deswegen in einer Hefemutante, die in ihrer Purinaufnahmefähigkeit verändert ist (*fcy2*, siehe auch unter 3.1 Purintransporter), exprimiert (Verónica Maurino und Marcelo Desimone, unveröffentlichte Ergebnisse). Mit Hilfe der heterologen Expression des *AtAzc1* Proteins konnten bereits Aufnahmestudien durchgeführt werden, die eine Aufnahme von radioaktiv markiertem Adenin und die Wachstumshemmung durch die toxischen Purinanaloga 8-aza-Adenin und 8-aza-Guanin zeigten (Benjamin Schumacher, Diplomarbeit 2006). Zusätzlich wurden Inhibitionsstudien durchgeführt, die eine Hemmung der Adeninaufnahme durch die Purine Hypoxanthin, Guanin und 8-aza-Guanin, und durch die Cytokinine Kinetin, trans-Zeatin, Benzyladenin und Isopentenyladenin hervorriefen. Die Hemmung durch Benzyladenin und Isopentenyladenin war geringer als die durch die Purine und übrigen Cytokinine ausgelöste Transportinhibition (Benjamin Schumacher, Diplomarbeit 2006). Der optimale pH-Wert für den Transport von ¹⁴C-Adenin lag bei pH 4,0 bis 4,5. Höhere pH-Werte und auch Protonophoren, wie Carbonyl-Cyanid-m-Chlorphenyl-Hydrazon (CCCP) und Diethylstilbestrol (DES), beeinflussten den Transport negativ. Dies läßt auf einen protonengekoppelten Transport von Adenin durch *AtAzc1* schließen (Benjamin Schumacher, Diplomarbeit 2006).

3.3.1. Die Rolle von Cytokinin in der Pflanze

Alle natürlich vorkommenden Cytokinine (CK) basieren auf dem Purin Adenin, an dessen N₆-Ende eine Seitenkette substituiert vorliegt (Mok und Mok, 2001). Je nachdem, ob es sich um eine isoprenbasierende oder eine aromatische Seitenkette handelt, werden sie als Isoprenoid-Cytokinine oder aromatische Cytokinine bezeichnet (Abbildung 3). Cytokinine können aufgrund ihrer Struktur-Aktivitätsbeziehung in drei weitere Gruppen unterteilt werden (Sakakibara 2005). i. die freie Basenform, ii. die Cytokinin-Riboside und iii. die Cytokinin-Ribosid-5-Phosphate. Die freie Basenform wird als hormonell aktiv angesehen, während die Riboside, also mit Ribose konjugierte Formen, allgemein als inaktive Transportform betrachtet werden. Dies wird dadurch unterstützt, daß die Riboside relativ häufig im Xylem- und Phloemsaft anzutreffen sind. Eine Reihe von Cytokininrezeptoren lassen sich allerdings auch im geringen Maße von einigen Ribosiden aktivieren (Spichal *et al.*, 2004; Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004). Als dritte Gruppe gelten die Ribosid-5-Phosphate, von denen bis jetzt nicht bekannt ist, ob sie eine eigene, spezifische Funktion besitzen (Sakakibara, 2004).

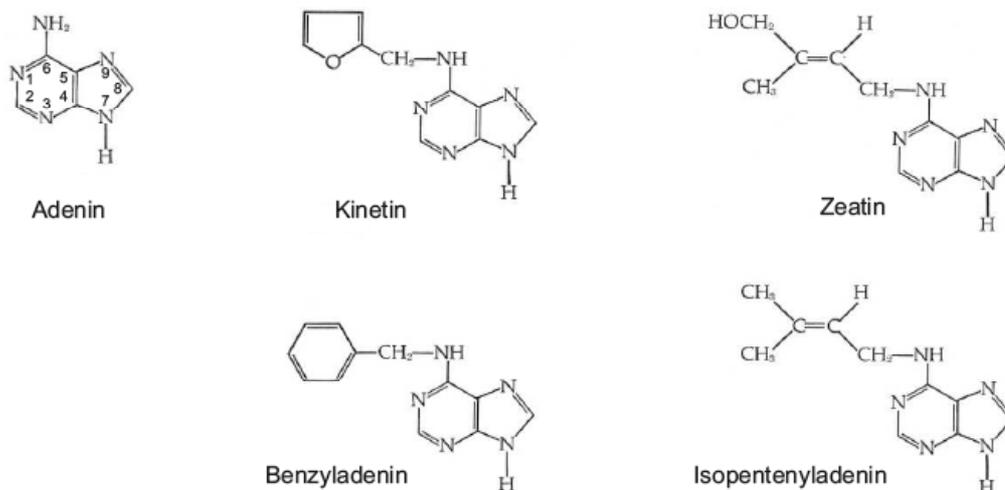


Abbildung 3: Strukturformeln von Adenin, und der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten adeninbasierenden Cytokinine. Die Zahlen entsprechen dem IUPAC Nummerierungssystem.

Die Wirkung der Cytokinine ist vielfältig untersucht und beschrieben worden, sowohl in Zellkulturen als auch in ganzen Pflanzen (Mok, 1994). Die wohl wichtigste und eindrucksvollste Wirkung dieser Hormone besteht in der Induzierung der Zellteilung, was sich im Biotest nachweisen läßt (Miller *et al.*, 1956). In Kombination mit dem Auxin Indol-3-Essigsäure (IAA) bewirken die Cytokinine Wachstum und Differenzierung von Zellen aus Kallusgewebe. Dabei werden Zellteilung und Organbildung im Wesentlichen durch das

Konzentrationsverhältnis der beiden Wuchsstoffe bestimmt (Raven: *Biology of Plants*, 1992; Gaudinová *et al.*, 1995). Die Rolle, die Cytokinine in der zugrundeliegenden Regulation des mitotischen Zellzyklus spielen, ist gegenwärtig jedoch erst ansatzweise erforscht (Roef und Van Onckelen, 2004).

Cytokinine wirken darüber hinaus der Apikaldominanz entgegen, wodurch sie in intakten Pflanzen das Austreiben von Seitenknospen aktivieren (Napoli *et al.*, 1999). Weiterhin verzögern sie maßgeblich die Seneszenz und den damit verbundenen Chlorophyllabbau (Richmond und Lang, 1957; Gan und Amasino, 1995). Beteiligt sind Cytokinine auch bei der Induktion der Wurzelverzweigung (Lexa *et al.* 2003). Die hier beschriebenen Effekte sind in Zellkulturen mittlerweile sehr gut definiert. In ganzen Pflanzen ist die Aktivität der Cytokinine dagegen oft durch die Interaktion mit anderen Hormonen maskiert (Mok und Mok, 2001), bzw. es kann durch die exogene Applikation von Cytokininen zu Effekten kommen, die normalerweise nicht unter ihrem Einfluß stehen (Schmülling, 2002). Diese Nebeneffekte können durch den Einsatz von Mutationslinien minimiert werden, in denen die Funktion bestimmter Gene der Cytokininbiosynthese oder –signaltransduktion verloren gegangen ist („loss of function“) oder überexprimiert wird (Scheres *et al.*, 1995; Hwang und Sheen, 2001). Durch den veränderten Phänotyp lassen sich dann Rückschlüsse auf die Funktion der Cytokinine in der Wildtyppflanze ziehen.

In Tabak wurden z.B. Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase -Gene (CKX) aus *A. thaliana* exprimiert und damit der Cytokiningehalt beeinflusst. CKX-Gene deaktivieren einige Cytokinine und seine Riboside irreversibel. Dadurch konnte das Wachstumsverhalten von Pflanzen mit reduziertem Cytokiningehalt untersucht werden (Werner *et al.*, 2001). Neben typischen Cytokinineffekten wurden hier auch unerwartete Effekte beobachtet. So führte der Cytokininmangel nicht, wie erwartet, zu einer verstärkten Apikaldominanz und auch nicht zu einer vorzeitigen Seneszenz. Die Ergebnisse zeigen, daß die Phytohormone nicht linear wirken, sondern vielmehr in einem komplexen Netzwerk aus Interaktion mit anderen Hormonen und weiteren Einflüssen eingebunden sind. Für die Erkennung und Weiterleitung dieser Signale haben Pflanzen im Laufe ihrer Evolution viele verschiedene regulatorische Systeme entwickelt. Als wichtigste Mechanismen haben sich in den letzten Jahren die Zwei-Komponentensysteme (Sensor – Regulator) herausgestellt, die ebenfalls an der Transduktion von cytokininvermittelten Signalen beteiligt sind.

Die Rezeptoren, die bisher für die Cytokininsignaltransduktion entdeckt wurden, entsprechen alle im weiteren Sinne einem modifizierten bakteriellen Zwei-Komponenten-System (Hwang *et al.* 2002; Heyl und Schmölling, 2003; Ferreira *et al.* 2005). Durch den Nachweis von intrazellulären Cytokininbindeproteinen (Bürkle *et al.* 2003; Kulaeva *et al.* 2000; Kulaeva *et al.* 2002), wird über eine weitere Möglichkeit der Perzeption und Signaltransduktion innerhalb einer Zelle, ausgelöst durch Cytokinine, diskutiert. Hierbei würde ein Transporter für Cytokinine eine essentielle Aufgabe übernehmen, die Substrate aus dem Apoplasten in die Zielzelle zu transportieren. Wird allerdings ein Großteil der Cytokinine im extrazellulären Raum abgebaut und dadurch inaktiviert, so muß es für die Zellen einen Transporter geben, der diese sehr wichtigen Purinderivate wieder in ihren Metabolismus zurückführen kann (Bürkle *et al.* 2003). Die Homeostase von Cytokininen kann durch die *de novo*-Synthese, durch die Bildung und den Abbau von Cytokininkonjugaten, durch Katabolismus und Translokation reguliert werden (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003).

Die Cytokinine Isopentenyladenin und *trans*-Zeatin (Abbildung 3) werden hauptsächlich über den MEP-Stoffwechselweg gebildet, der die Isoprenoidseitenketten zur Synthese mit AMP, ADP, oder ATP zur Verfügung stellt. Der MEP-Stoffwechselweg hat Glycerin-3-P und Pyruvat als Ausgangsstoffe und führt im Chloroplasten über Methylerythritol-4-P (MEP). Dagegen wird der größte Teil der *cis*-Zeatine über den MVA-Stoffwechselweg gebildet, in dem ein Ausgangsprodukt die aus Acetyl-CoA im Cytosol gebildete Mevalonsäure ist.

Eine weitere Quelle für die Synthese von Cytokininen stellt der Abbau von tRNA dar (Haberer *et al.* 2002). Die Synthese über tRNA als Substrat ist jedoch, z.B. in Tabak, sehr gering (Schmitz und Skoog, 1972; Mok und Mok, 2001). Allerdings gibt es auch einige Pflanzenarten, wie Mais oder Reis, bei denen diese Art der Synthese einen sehr großen Anteil an der Cytokininsynthese trägt (Veitch *et al.*, 2003; Sakakibara, 2006).

Die Regulation des Cytokininmetabolismus erfolgt über die Regulation der Genexpression, wie z.B. von Isopentenyltransferasen (IPT) und den Cytochromen CYP735A1 und CYP735A2, sowie durch Phytohormone, wie Cytokinine, Auxin und Abscisinsäure (Sakakibara, 2006). Eine weitere Regulation erfolgt über die interne und externe Verfügbarkeit von Stickstoff (Sakakibara, 2006).

Freie Cytokinine unterliegen einer schnellen Degradation zu ihren Nukleosid- oder Nukleotidformen (Moffatt und Ashihara, 2002). Die Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase (CKX) spaltet irreversibel die Seitenkette von Zeatin, Zeatinribosid und Isopentenyladenin

von dem Purinrest ab und inaktiviert dadurch das Hormon (Werner *et al.* 2003). Dieses Enzym ist wahrscheinlich der einzige metabolische Abbauweg für Cytokinine. Bei Überexpression der CKX Gene aus Arabidopsis in Tabak (CKX1 und CKX2) kommt es durch die geringere Cytokininverfügbarkeit zu einem verringerten, zwergförmigen Wuchs mit verkürzten Internodien, zur Bildung von lanzettförmigen Blättern und einer reduzierten Anzahl von Blüten. Im Gegensatz zu dem verringerten Sproßwachstum ist das Wurzelwachstum gegenüber dem Wildtyp verstärkt (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003).

3.3.2 Der Transport von Cytokininen in der Pflanze

Cytokininkonzentrationen variieren in verschiedenen Geweben. In Keimlingen wurden Konzentrationen von ca. 30 pmol/g Frischgewicht für trans-Zeatin und ca. 10 pmol/g Frischgewicht für Isopentenyladenin gemessen (Werner *et al.*, 2003). Die Cytokininkonzentration beeinflusst kritische Phasen von Pflanzenwuchs und Entwicklung. Man vermutet, daß Cytokinine sich vom Ort ihrer Entstehung zu den Wirkorten über selektive Transportsysteme bewegen (Sakakibara, 2006). Diese Ansichtswiese wird dadurch unterstützt, daß es Berichte über die Akkumulation von Cytokininen in Xylem und Phloem gibt (Corbesier *et al.*, 2003; Lejeune *et al.*, 1994; Takei *et al.* 2001), und daß Pflanzenzellen in der Lage sind Cytokinin-Nukleobasen und -Nukleoside gegen Konzentrationsgefälle aufzunehmen (Bürkle *et al.*, 2003; Füsseder *et al.*, 1989).

Isopentenyltransferasen (IPT) katalysieren den ersten und limitierenden Schritt der Synthese von Cytokininen, die die Übertragung der Isopentenylgruppe von Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) auf ATP, ADP, oder AMP (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001). Dies führt zur Bildung von Isopentenyl-ATP, -ADP bzw. -AMP, den Vorstufen der biologisch aktiven Cytokinine. Die sieben bisher identifizierten IPT-Gene aus Arabidopsis werden sowohl in der Wurzel als auch im Sproß exprimiert. Dies bedeutet, daß die klassische Ansicht, das Cytokinine nur in der Wurzel synthetisiert werden und im Sproß erst nach einem langen Transportweg ihre Wirkung entfalten, modifiziert werden muß (Schmülling, 2003). Allgemein wird angenommen, daß die Synthese von Cytokininen vor allem in meristematischen Regionen und Regionen mit kontinuierlichem Wachstum, so wie Wurzelspitzen, junge Sprosse, junge Blätter, reifender Früchte und Samen, erfolgt (Torrey,

1976; Mauseth, 1991; Raven, 1992; Salisbury und Ross, 1992; Arteca, 1996; Fosket, 1998, Schmülling, 2002).

Im Gegensatz zum Auxintransport (Friml, 2003; Wisniewska *et al.* 2006; Paciorek und Friml, 2006) ist zurzeit wenig über Proteine bekannt, die den Cytokintransport vermitteln (Swarup *et al.* 2000). Es ist bekannt, daß zwei Mitglieder der Purin-Permeasen in Arabidopsis (*AtPUP1* und *AtPUP2*) bei heterologer Expression in Hefezellen die Aufnahme von Cytokinin-Nukleobasen, nicht aber von Cytokinin-Nukleosiden katalysieren (Gillissen *et al.*, 2001; Bürkle *et al.*, 2003). *AtPUP1* wird in den Epithelzellen von Hydathoden exprimiert. Dies könnte darauf hindeuten, daß *AtPUP1* zur Rückgewinnung von Cytokinin aus dem Xylemsaft eingesetzt wird. Dagegen suggeriert die Expression von *AtPUP2* im Phloem eine Funktion im Langstreckentransport von Cytokinin (Bürkle *et al.*, 2003). Ein equilibrativer Nukleosidtransporter aus Reis (*OsENT2*) ist in der Lage, die Cytokinin-Nukleoside trans-Zeatin-Ribosid und Isopentenyladenin-Ribosid mit niedriger Affinität in Hefezellen aufzunehmen (Hirose *et al.*, 2005). *OsENT2* wird im Scutellum während der Keimung exprimiert, weiterhin im Leitgewebe von Keimlingen und den Wurzeln ausgewachsener Pflanzen (Hirose *et al.*, 2005). Abgesehen von den Unterschieden in der Substratspezifität unterscheiden sich beide Arten von Transportern (*PUPs* und *ENTs*) auch im Transportmechanismus, da *AtPUP1* und *AtPUP2* strikte Protonen-Cotransporter sind und *OsENT2* auch noch teilweise bei neutralem, bzw. basischem pH, und in der Gegenwart des Entkopplers CCCP aktiv ist (Hirose *et al.*, 2005). *ENTs* transportieren Cytokinin-Riboside entlang eines Konzentrations-Gradienten (Guangyong *et al.*, 2003). Im Gegensatz hierzu sind *PUPs* auch in der Lage entgegen eines Konzentrationsgradienten Cytokinin-Nukleobasen zu transportieren (Gillissen *et al.*, 2000; Bürkle *et al.*, 2003).

Interessanterweise transportieren *PUPs* und *ENTs* außer Cytokinin auch Purinnukleobasen, bzw. Purinnukleoside (Gillissen *et al.*, 2000; Hirose *et al.*, 2005). Diese relativ niedrige Substratpräferenz steht im Gegensatz zu der hohen Substratspezifität des Auxintransportes. Dem aktuellen Modell folgend, läßt sich feststellen, daß Cytokinine über den gleichen oder zumindest sehr ähnliche Wege wie Purinderivate und Nukleoside transportiert werden (Sakakibara, 2006). Der genaue Weg der Cytokinine an ihren Zielort, bzw. welche Wege sie benutzen, ist jedoch noch nicht exakt geklärt (Sakakibara, 2006).

4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Mitglieder sowohl der Nukleobase/Ascorbat-Transporterfamilie als auch der Mitglieder der Azg-Transporterfamilie in *A. thaliana*. Die phylogenetische Verwandtschaft soll anhand von Sequenzvergleichen näher untersucht werden. Zu diesem Zweck werden Alignments durchgeführt, um Verwandtschaftsverhältnisse aufzudecken.

Um einen ersten Hinweis auf die Funktion eines potentiellen Transporters zu bekommen, hat es sich als sinnvoll herausgestellt, die spezifische Lokalisation in den Organen und die subzelluläre Lokalisation zu analysieren. Zum Zweck der Lokalisation soll aus Gewebeproben von Wildtyppflanzen RNA isoliert und mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR auf die Expression der NAT-Gene, bzw. des *Azg1*-Gens hin untersucht werden. Zur näheren Aufklärung wurden GUS- und GFP-Konstrukte hergestellt und untersucht. Ein Promotor-GUS Konstrukt kann in der Pflanze zur Aufklärung der Promotoraktivität in den verschiedenen Pflanzenorganen oder Geweben beitragen. Das GFP-Reportergen (GFP = green fluorescence protein) emittiert bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488nm eine grüne Fluoreszenz und wird deshalb im Fluoreszenzmikroskop genutzt, um die subzelluläre Lokalisation von chimären Proteinen zu untersuchen. Hierzu werden 35S-cDNA-GFP Fusionskonstrukte hergestellt.

Ein weiterer Schritt zur Aufklärung der Funktion ist die Untersuchung von Mutanten Linien. Mit Hilfe von Datenbanken (SIGnAL:<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>; GABI-Kat; <http://www.gabi-kat.de/>; Arabidopsis Knockout facility, Wisconsin), die eine große Anzahl an T-DNA Insertionsmutanten für *A. thaliana* bereithalten, sollen Knockout-Mutanten für alle NAT- und Azg-Gene identifiziert und charakterisiert werden. Dafür wurde die genaue Lage der T-DNA Insertionen und die fehlende Expression des untersuchten Genes bestimmt. Die Knockout-Mutanten wurden auf auffällige Phänotypen hin untersucht. Für das *AtAzg1*-Gen sollen außerdem überexprimierende Pflanzenlinien hergestellt und charakterisiert werden.

Durch diverse Chip-Analysen weltweit ist inzwischen eine enorme Anzahl an Expressionsdaten für alle Arabidopsisgene vorhanden. Die Flut an Daten ist z.B. unter der Genevestigator-Webseite (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>, Zimmermann et al., 2004) zusammengefaßt worden und der Arabidopsis Gemeinschaft zugänglich. Hier wurden Untersuchungen auf Hinweise zu deregulierter Expression der AtNAT und AtAzg-Gene

durchgeführt. Für *AtNAT7* und *AtNAT8* war im Zusammenhang mit Agrobakterien eine Expressionsänderung angegeben. Für *AtAzg1* tritt eine deregulierte Expression im Zusammenhang mit Cytokininen auf. Diese *in silico* Aussagen sollen mit dieser Arbeit experimentell bestätigt werden und so zur Funktionsbestimmung der untersuchten Gene beitragen.

Erst kürzlich wurde experimentell nachgewiesen, daß *AtAzg1* heterolog exprimiert in einer Hefemutante auf toxische Purinanaloge reagiert, einen nachweisbaren Adenintransport aufweist und außerdem auf Cytokinine als Kompetitoren reagiert (Benjamin Schumacher, Diplomarbeit 2006). Diese Aussagen sollen in ganzen Pflanzen genauer untersucht werden. Zur *in vivo* Untersuchung von *Azg1* in *A. thaliana* sollen mit isolierten Knockout-Pflanzen und Überexpressionslinien Fütterungsexperimente mit toxischen Purinanalogen und verschiedenen Cytokininen durchgeführt werden. Zudem soll in diesen die Konzentration verschiedener Cytokinine und Cytokininderivate in Blattmaterial bestimmt werden und mit denen von WT-Pflanzen verglichen werden. Als direkten Beweis für einen *in vivo* Transport werden Transportversuche mit radioaktiv markierten möglichen Substraten in Arabidopsis Keimlingen durchgeführt.

II Material und Methoden

1. Materialien

1.1. Chemikalien und Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Biomol (Hamburg), Difco (Hamburg), Duchefa (Haarlem, NL), Fluka (Buchs, CH), Merck AG (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) verwendet. Biochemikalien und Enzyme, einschließlich der dazugehörigen Puffer stammten von den Firmen MBI Fermentas GmbH (St.Leon-Rot), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt/Main). Produkte anderer Hersteller sind an entsprechender Stelle aufgelistet.

1.2. Kommerzielle Kits

Folgende Kits wurden eingesetzt und gemäß den Herstellerangaben verwendet:

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D)

MinElute Gel Extraction Kit (50) (Qiagen GmbH, Hilden, D)

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D)

MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D)

Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad, München, D)

GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)

Big Dye Terminator v1.3 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA)

1.3. Bakterien- und Hefestämme

1.3.1. *Escherichia coli*

DH5 α zur Vermehrung von Plasmiden
 supE44 Δ lacU169 (Φ 80, lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1
 relA1 (Hanahan, 1983)

Top10 zur Vermehrung von Plasmiden
 F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1
 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

DB3.1 für die Vermehrung von Plasmiden, die das *ccdB* Gen enthalten (z.B. pGWB5) F- *gyrA462 endA1 (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(τB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl-5 - leu mtl1*

1.3.2. *Agrobacterium tumefaciens*

GV3101 (pMP90) zur Pflanzentransformation (Koncz und Schell, 1986) Rif^rG

GV3101 mit einem Hilfsvektor pSoup (Hellens *et al.*, 2000) für den binären Vektor pGreenII zur Pflanzentransformation

C58 virulenter Agrobakterienstamm zur Induktion von Tumoren

SVO Supervirulenter Agrobakterienstamm (LBA 4404.pBBR 1MCS virGN54D (transiente GFP-Expression in *A. thaliana* Zellsuspension)

1.3.3. *Saccharomyces cerevisiae*

fcy2 Hefemutante, defekt in der Aufnahme von Adenin-Guanin-Hypoxanthin-Cytosin (Mat a; Δura3; Gillissen *et al.* 2000), zur Komplementation mit potentiellen Purintransportern (Weber *et al.*, 1990)

1.4. Pflanzenmaterial

Es wurde mit *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Cv. Columbia (Col0) gearbeitet. Wisconsin-, Salk- und GABI-Kat-Insertionslinien wurden bei Wisconsin Knockout facility (<http://biotech.wisc.edu/Arabidopsis/Index2.asp>), dem Nottingham Arabidopsis Stock Center (<http://arabidopsis.info/>) und der GABI-Kat Einrichtung (<http://www.gabi-kat.de/>) bestellt (siehe Tabelle 4 am Ende der Arbeit für die Auflistung der verschiedenen Insertionslinien).

Die Arabidopsis Zellkultur wurde uns freundlicherweise vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln überlassen und von Dr. Tamara Giglioashvili nach Koroleva *et al.* (2005) in Kultur gehalten.

Für die ballistische Transformation von Zwiebelepidermidzellen wurden Gemüsezwiebeln aus dem Lebensmittelgeschäft gekauft.

2. Molekularbiologische Methoden

2.1. Kultivierung von Bakterien

2.1.1. Nährmedien

LB-Medium (nach Miller, 1972):

Dieses Medium diente standardmäßig zur Anzucht aller untersuchten Bakterienstämme.

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

Um Platten herzustellen wurden 15 g/l Agar zugefügt.

YEB-Medium (für *Agrobakterien*):

5 g/l Bacto-Peptide

5 g/l Fleischextrakt

1 g/l Hefeextrakt

5 g/l Saccharose

0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

15 g/l Agar für Platten)

Um Platten herzustellen wurden 15 g/l Agar zugefügt.

Hefevollmedium YEPD:

10 g/l Hefeextrakt

20 g/l Pepton

20 g/l Glucose

Um Festmedium herzustellen wurden 15 g/l Oxoid-Agar zugefügt.

Hefeselektivmedium: csm-ura:

0,77 g/l csm-ura (complete supplement medium –uracil) Hersteller: Qbiogene, USA

20 g/l Glukose

50 ml/l YNB 20x (Yeast Nitrogen Base)

10 ml/l 1M Ammoniumsulfat

Um Festmedium herzustellen wurden 15 g/l Oxoid-Agar zugefügt.

Alle Medien wurden mit destilliertem Wasser hergestellt und vor dem Gebrauch autoklaviert.

2.1.2. Antibiotika

	<u>Endkonz.</u>	<u>Stammkonz.</u>	<u>Lösungsmittel</u>
Ampicillin (x)	100 µg/ml	50 mg/ml	H ₂ O
Kanamycin (x)(~)	50 µg/ml	50 mg/ml	H ₂ O
Kanamycin (*)	100 µg/ml	50 mg/ml	H ₂ O
Rifampicin (*)	150 µg/ml	30 mg/ml	DMSO
Rifampicin (+)	50 µg/ml	20 mg/ml	DMSO
Gentamycin (*)	25 µg/ml	25 mg/ml	H ₂ O
Hygromycin (x)(*)	50 µg/ml	50 mg/ml	H ₂ O
Hygromycin(~)	25 µg/ml	50 mg/ml	H ₂ O
Tetracyclin (*)	5 µg/ml	5 mg/ml	75% Ethanol
Chloramphenicol (*)	75 µg/ml	75 mg/ml	100% Ethanol

(x) für *E. coli*

(*) für Agrobakterienstämme

(+) für supervirulente Agrobakterien SVO (LBA 4404.pBBR 1MCS virGN54D)

(~) für Arabidopsis auf Platten

Antibiotika wurde erst zugeben, wenn das Medium handwarm war (30-40°C)

2.1.3. Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung sämtlicher Bakterienstämme erfolgte, soweit nicht anders aufgeführt, in LB-Vollmedium, bzw. für *A. tumefaciens* in YEB-Medium. Die Inkubation der Stämme in Flüssigmedium erfolgte, soweit nicht anders aufgeführt, in einem Volumen von 5ml in Reagenzgläsern bei 170 rpm. Die Kultivierung in Flüssigmedium ab einem Volumen von 10 ml erfolgte, soweit nicht anders aufgeführt, in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler bei 130 rpm. *A. tumefaciens* wurde bei 30°C inkubiert, *E. coli*-Stämme bei 37°C.

2.1.4. Lagerung

Die langfristige Stammhaltung erfolgte in Form von Glycerin-Dauerkulturen. Dazu wurde eine Glycerinlösung für Stammkulturen hergestellt (65 % Glycerin, 0,1 M MgSO₄, 25 mM Tris pH 8) und autoklaviert. Die *E. coli* oder Agrobakterienkultur wurde 1:1 mit der

Glycerinlösung für Stammkulturen versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert. Die kurzfristige Aufbewahrung von Stämmen erfolgte zumeist auf LB-Agarplatten (*E. coli*) oder auf YEB-Platten (Agrobakterien) bei 4°C.

2.2. Vektoren

Vektor	Bezugsquelle	Verwendung
pCR-Blunt II-TOPO [®]	Invitrogen	Klonierung von PCR-Produkten in <i>E. coli</i>
pENTR [™] /D- Topo [®]	Invitrogen	Klonierung von PCR-Produkten in <i>E. coli</i> für das Gateway-System
pGWB3	Tsuyoshi Nakagawa (Matsue, Japan)	Klonierung von Promotoren für GUS-Expression, Pflanzenexpressionsvektor, Gateway-System
pGWB5	Tsuyoshi Nakagawa (Matsue, Japan)	Klonierung und Expression von GFP –Fusionsproteinen in Protoplasten, etc., Gateway-System
pGreenII	Mark Smedley (Norwich, UK)	Pflanzenexpressionsvektor, modifiziert durch Verónica Maurino (Köln, Deutschland) mit CaMV35S-MCS-OCS-Kassette und BASTA-Resistenzkassette
pGPTV-bar	Becker et al., 1992	Klonierung von Promotoren für GUS-Expression, Pflanzenexpressionsvektor

Vektorkarten siehe Anhang.

2.3. Transformation von Bakterien

2.3.1. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.1.1. Herstellung von RbCl-kompetenten Zellen

Die Transformation von Plasmid-DNA erfolgte mittels kompetenter Zellen, die nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt wurden. Hierzu wurden 100 ml LB-Medium im 500 ml Schüttelkolben mit Schikane mit 1 ml einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 130 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 angezogen. Die Zellen wurden nach Erreichen der OD auf Eis gestellt und durch Zentrifugation geerntet (4°C, 4000 rpm, 15 min). Das Pellet wurde

in 30ml eiskalter RF₁-Lösung resuspendiert und mindestens 15 min im Eisbad inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 4000 rpm, 15 min) wurde das Pellet in 4 ml RF₂-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 200 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –70°C gelagert.

RF ₁ : (pro 1 L)	12 g RbCl	RF ₂ : (pro 1 L)	2,1 g MOPS
	9,9 g MnCl ₂		1,2 g RbCl
	1,5 g CaCl ₂ x 2H ₂ O		11 g CaCl ₂ x 2H ₂ O
	2,9 g Kaliumacetat		121ml Glycerin (87%)
	121 ml Glycerin (87%)		pH 5.8 mit 0,2 M
	pH 6.8 mit 1 M Natronlauge		Essigsäure eingestellt
	eingestellt		

2.3.1.2. Transformation von RbCl-kompetenten Zellen

Zur Transformation wurden die Zellen bei RT aufgetaut und danach für 5 min auf Eis gestellt. Es wurden 0,1 µg Plasmid-DNA dazugegeben (das Volumen der DNA darf höchstens ¼ des Volumens der kompetenten Zellen betragen) und für 20min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Hitzeschockbehandlung für 1,5 min bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen 2 min auf Eis inkubiert. Zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurde der Ansatz nach Zugabe von 800 µl LB-Medium bei 37°C und leichtem Schütteln 1 h inkubiert. Die Zellen wurden dann auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.3.2. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

2.3.2.1. Herstellung elektrokompenter Zellen

Als Vorkultur wurden Agrobakterien in 5 ml MGL angeimpft. Nachdem diese bis zur frühen Sättigung gewachsen waren, wurde die Vorkultur in 100 ml MGL verdünnt, so daß die OD₆₀₀ ca. 0,04-0,08 betrug. Die Agrobakterien wuchsen ca. vier Stunden bis zu einer OD von ca. 0,5. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (fünf Minuten, 4°C, 2500 g) und in 40 ml eisgekühltem 1 mM HEPES / 10% Glycerin resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (fünf Minuten, 4°C, 2500 g) wurden die Zellen in 2 ml 1 mM HEPES / 10% Glycerin aufgenommen, auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, für 30 Sekunden sedimentiert und in 200-

400 µl HEPES/Glycerin resuspendiert. 50 µl Aliquods der kompetenten Agrobakterien wurden bei -80°C gelagert oder direkt verwendet.

MGL-Medium (pro 1 L):

5 g	Bacto-Peptide
2,5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
5 g	Mannit
1,16 g	Na-Glutamat
0,25 g	KH ₂ PO ₄
0,1 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1 mg	Biotin

2.3.2.2. Transformation von elektrokompetenten Zellen

1 µl DNA wurde zu 50 µl kompetenten Zellen zugegeben. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA/Bakterienmischung in eine eiskalte 0,2 cm Küvette gefüllt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 400 Ω und 2,5 kV. Anschließend wurde sofort 1ml YEB-Medium hinzugegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei 28°C unter leichtem Schütteln wurden 10 µl und 50 µl auf zwei YEB-Platten ausplattiert und bei 28°C für 2 Tage inkubiert.

2.3.3. Transformation von Hefezellen

Es wurde nach der LiAc/SS-DNA/PEG-Methode (nach Gietz *et al.* 1995) verfahren. Aus einer *Saccharomyces cerevisiae* - Vorkultur wurden 50 ml YPD-Medium auf eine OD₅₉₅ von 0,05 angeimpft und bei 30°C und 180 rpm geschüttelt. Nach Erreichen einer OD₅₉₅ von 0,6 bis 0,8 wurden die Zellen durch fünfminütiges Abzentrifugieren in der Jouan-Zentrifuge GR422 bei 4°C und 4500 rpm geerntet. Die Zellen wurden erst mit eiskaltem Wasser, dann mit 2 ml LiAc/TE-Lösung (¹/₁₀ LiAc 1M, ¹/₁₀ TE 10x, ⁸/₁₀ H₂O) gewaschen und dann in 300 µl LiAc/TE-Lösung resuspendiert und auf Eis gehalten. Für die Transformation der *Saccharomyces cerevisiae* - Zellen wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 5 µl denaturierter Heringssperma-DNA versetzt. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension pipettiert. Nach Zugabe

von 300 µl PEG-Lösung ($\frac{1}{10}$ LiAc 1M, $\frac{1}{10}$ TE 10x, $\frac{8}{10}$ PEG 4000 50%) wurde 30 min unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert. Dann wurde 15 min bei 42°C stark geschüttelt (1300 rpm im Eppendorf Thermomixer). Zum Schluß wurden die Zellen eine Minute bei 6000 rpm in der Eppendorf Zentrifuge pelletiert, mit sterilem Wasser gewaschen und auf Selektivmedium ausplattiert. Die Platten wurden 48 h bei 30°C inkubiert.

2.4. Methoden zur Aufreinigung und Bearbeitung von DNA

2.4.1. Isolierung von Plasmid DNA

2.4.1.1. Plasmidisolierung aus E. coli-Zellen nach Birnboim & Doly (1979)

Am Vorabend wurden von einer Platte Klone gepickt oder 10 µl Bakterien aus einer Stammkultur angeimpft. Die Anzucht der Zellen erfolgte über Nacht in 5 ml LB, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, bei 37°C im Schüttler (Fa. New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen). 500 µl der Kultur wurden am nächsten Tag abgenommen und als Stammkultur bei -20°C gelagert, nachdem 500 µl Glycerin für Stammkulturen hinzugegeben wurden. Die restlichen Zellen wurden bei 3000 rpm (Heraeus Medifuge) für 15 min abzentrifugiert und mit 50mM TRIS/HCl pH 8,0 einmal gewaschen. Die Sedimente wurden in 100 µl Lösung I aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II – zur alkalischen Lyse der Zellen – zugegeben. Nach kräftigen mischen wurde für weitere 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl eisgekühlter Lösung III wurde das Gemisch neutralisiert. Dabei fielen SDS, Proteine und die chromosomale DNA aus, die Plasmid-DNA blieb in Lösung. Die Proben wurden 10 min auf Eis inkubiert und dann 10 min bei 14000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5417) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Phenol extrahiert. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 1 ml Ethanol gefällt und direkt für 30 min abzentrifugiert (14000 rpm, Eppendorf-Zentrifuge 5417). Nach zweimaligen Waschen mit 75% Ethanol wurde das im Exsikkator getrocknete Sediment in 40µl Aqua_{bidest} aufgenommen. 1-2 µl wurden für einen Testverdau der Plasmid-DNA eingesetzt.

Lösung 1:

25 mM	TRIS /HCl pH 8,0
50 mM	Glucose
10 mM	EDTA

Lösung II:

0,2 M NaOH
1% (w/v) SDS

Lösung III:

3 M Kaliumacetate pH 5,5
(mit 96-100% Essigsäure)

Die Plasmidisolierung erfolgte außerdem mit einem Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad, München, D) wobei die Isolierung nach Herstellerangaben erfolgte.

2.4.1.2. Plasmidisolierung aus Agrobakterien

Für die Plasmidisolierung aus Agrobakterien wurde das Protokoll zur Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen nach Birnboim & Doly (1979) leicht abgeändert: Nach Aufnahme des Zellsediments in Lösung I, dem eine Spatelspitze Lysozym zugefügt wurde, erfolgte eine halbstündige Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe von Lösung II und Lösung III (s. o.) wurde der Überstand sofort mit 100% Ethanol gefällt (30 min 14000 rpm, Eppendorf-Zentrifuge 5417), das Sediment zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl Aqua_{bidest} mit 19 µg RNase (10 mg/ml, 10 min bei 95°C erhitzt) aufgenommen. Nach dem RNase-Verdau (30 min 37°C) wurde der Ansatz phenolisiert, gefällt und das Sediment in 25 µl Aqua_{bidest} aufgenommen. Davon wurden 5-10 µl für einen Testverdau eingesetzt.

2.4.2. Quantifizierung und Lagerung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte nach zwei alternativen Methoden:

- a) Die Mengenabschätzung in einem Agarosegel erfolgte im optischen Vergleich mit einem Mengenstandard (1 kb-Größenmarker der Firma Invitrogen) an der Färbung mit Ethidiumbromid. Für eine genauere Abschätzung wurde die Software NIH-Image verwendet. Dafür wurde das Abbild des Agarosegels auf einer Diskette gespeichert und mit dem Programm analysiert.
- b) Der Nukleinsäuregehalt konnte alternativ über die Absorption bei 260 nm (Photometer Ultrospec III, Pharmacia) quantifiziert werden. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Abnahme der Lichtintensität der Schichtdicke des absorbierenden Mediums proportional zu der Konzentration der absorbierenden Verbindungen. Es wurde ein Aliquot der isolierten Nukleinsäure 1 : 50 mit dem Wasser verdünnt und die Absorption (E) bei 260 nm gemessen (E = 0,05 entspricht 1 µg Oligonukleotide/ ml, E = 0,025 entspricht 1 µg RNA/ ml, bzw. 1 µg einzelsträngige DNA/ ml und E = 0,02 entspricht 1 µg doppelsträngige DNA/ ml). Die Messung erfolgte in einer Küvette gegen Wasser als Nullabgleich. Verunreinigungen der

Lösung, beispielsweise durch Proteine, ließen sich aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm abschätzen, wobei der Quotient E_{260} / E_{280} zwischen 1.6 und 1.9 liegen sollte. Zusätzlich konnte eine Messung der Absorption bei 230 nm Auskunft über Verunreinigungen durch Phenol oder Kohlenhydrate geben. Dabei sollte das Verhältnis der Werte bei 260 nm und 230 nm ungefähr zwei sein.

Gelagert wurde isolierte DNA grundsätzlich bei -20°C .

2.4.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA erfolgte in den vom Enzymhersteller (Firmen MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot und Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) mitgelieferten Puffern und nach Vorschrift des Herstellers.

2.4.4. Entsalzen von DNA

Zur Entsalzung von DNA, z.B. nach Restriktionsverdau oder PCR, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit nach der Vorschrift „*QIAquick PCR Purification Kit Protocol*“ verwendet (Qiagen, Hilden).

2.4.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Agarosegelen erfolgte bei DNA-Fragmenten mit einer Größe von 400 bp bis über 5 kb über das ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ nach Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden). Fragmente mit einer geringeren Größe wurden mit dem ‚MiniElute Gel Extraction Kit‘ nach Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden) aus Agarosegelen isoliert.

2.4.6. Fällung und Aufkonzentrierung von Plasmid-DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Fällung von DNA mit 2fachem Volumen absolutem Ethanol und 1/10 Volumen 4M Natriumacetat pH 4.8 bei -20°C über Nacht.

2.4.9. Umwandlung von überhängenden 5'-Enden in glatte Enden

Zum Auffüllen von überhängenden 5'-Enden wurde die ‚Klenow‘ - DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) benutzt. Bis zu 300 ng DNA wurden mit $\frac{1}{10}$ Volumen Nick Translationspuffer, $\frac{1}{10}$ Volumen dNTP-Mix (2 mM) und 1 μ l ‚Klenow‘ - Enzym (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Hitze inaktiviert (10 min bei 70°C) und die DNA mit Hilfe des ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ nach Vorschrift ‚QIAquick PCR Purification Kit Protocol‘ gereinigt.

Nick Translationspuffer: 500 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM DTT
0,1 M MgSO₄
500 μ l/ml BSA

2.4.10. Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden mit dem ‚Rapid DNA Ligation Kit‘ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Ligationsansatz wurde ein molares Verhältnis von Fragment zu Vektor von 3:1 eingestellt, wobei ca. 30 ng Vektor-DNA eingesetzt wurde. Die geschnittene Vektor-DNA wurde vor Einsatz in die Ligation immer über ein Agarosegel von unvollständig verdauter Vektor-DNA getrennt und anschließend dephosphoryliert.

2.4.11. Gateway® Klonierung

Die Gateway® Technologie ist eine universelle Methode, die sich der Eigenschaften der seitenspezifischen Rekombination des Bakteriophage lambda bedient. Das gewünschte Gen wird zuerst in den ‚Entry vector‘ (z.B. pENTR™/D- Topo®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) kloniert. Dieser ‚Entry vector‘ verfügt über zwei Rekombinationsstellen (*attL1* und *attL2*), welche die zu klonierende Sequenz flankieren und einer Kanamycin Resistenz. Aus diesem ‚Entry vector‘ wird das zu untersuchende Gen in einen anderen Vektor ‚Destination vector‘ durch Rekombination umklont. Der ‚Destination vector‘ enthält auch zwei Rekombinationsstellen (*attR1* und *attR2*), die an das Gen für eine negative Selektion (*ccdB*) angrenzen und Eigenschaften im Interesse der weiteren Verwendung des zu bearbeitenden Gens (z.B.: Proteinexpression, GFP-Fusion, etc.) enthält. Die Rekombination an den

Rekombinationsstellen dieser beiden Vektoren wird durch die LR Clonase™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) bewerkstelligt. Sie ist gezielt und spezifisch. Durch die verschiedenen Resistenzen der Vektoren und der negativen Selektion wird nur das gewünschte Plasmid erhalten. Die Klonierung des Gens von Interesse in dem „Entry vector“ (z.B. pENTR™/DTopo ®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) und die LR Reaktion mit der LR Clonase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

2.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.5.1. Allgemeines zu PCR-Reaktionen

Die *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988). Hierzu wurden zwei komplementäre, konvergierende Oligonukleotide (Primer) verwendet, die das zu amplifizierende Fragment flankieren. Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe der DNA-Polymerase nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt, wobei als ‚template‘-DNA zwischen 1 und 20 ng Plasmid-DNA eingesetzt wurde. Die Reaktion wurde im PTC-200 Peltier Thermal Cycler von MJ Research Inc. (USA) durchgeführt. Das PCR Produkt wurde über ein Agarosegel von Nebenprodukten getrennt und aufgereinigt (siehe II. 4.2.3. und II. 4.2.4).

Die Temperatur für das ‚Primer Annealing‘ errechnet sich nach folgender Formel:

$$T_M = 69,3^\circ\text{C} + [0,41 \times (\text{GC}\text{-}\%) - (650/\text{Primerlänge in bp})]$$

2.5.2. Amplifikation von DNA für Klonierung

Beim Start einer neuen Klonierung wurde das gewünschte DNA-Fragment erst einmal von einem Template kopiert und vervielfältigt. Als Template wurde entweder genomische DNA, cDNA oder ein schon vorhandenes Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment benutzt. Für diesen kritischen Schritt in der Klonierung wurde eine Proof-Reading-Polymerase (Pfx, Invitrogene) ausgewählt. Der Ansatz muß nicht auf Eis stehen, da diese Polymerase durch

einen Hitzeschock gestartet wird. Dafür ist der erste Schritt der PCR-Reaktion etwas länger (5 min 95°C). Außerdem ist die optimale Annealing-Temperatur dieser Taq-Polymerase etwas niedriger (68°C). Verwendete Primerkonzentration: immer 10 pmol.

<u>Ansatz (50 µl):</u>	<u>PCR-Programm PFX:</u>		
5 µl Puffer	<u>96°C</u>	<u>5 min</u>	
1,5 µl 10 mM dNTP's	96°C	30 sek	
1 µl 50 mM MgSO ₄	50°C	30 sek	35 Zyklen
2,5 µl Primer forward	<u>68°C</u>	<u>30 min</u>	
2,5 µl Primer reverse	68°C	5 min	
0,5 µl Platinum Pfx-Polymerase	4°C	unendlich	
1 µl cDNA			
36 µl H ₂ O			

2.5.3. Colony-PCR

Um die Anzahl der durchzuführenden Plasmid-Minipräparationen, zur Isolierung eines funktionellen Klons mit dem gewünschten Insert zu reduzieren, wurde teilweise eine sogenannte Colony-PCR angesetzt. Dazu wurden Bakterienkolonien von der Selektionsplatte gepickt und in ein PCR-Reaktionsgefäß mit vorgelegtem Reaktionsgemisch (einschließlich Taq-Polymerase und spezifischen Oligonukleotiden) überführt. Die Kolonien auf der Agarplatte wurden zuvor numeriert, und die Platte wurde nach Abnahme der halben Kolonien weiter bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der PCR wurden die Ansätze auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Kolonien von den Ansätzen, die auf dem Agarosegel ein Fragment der erwarteten Länge aufwiesen, wurden anschließen ü. N. in Schüttelkulturen für Plasmidisolierung (siehe 5.1.2) angezogen.

<u>Ansatz (25 µl):</u>	<u>PCR-Programm STANDARD:</u>		
1 µl DNA	<u>96°C</u>	<u>3 min</u>	
0,4 µl Haus- Taq	96°C	30 sek	
2,5 µl NH ₄ -Puffer	<u>72°C</u>	<u>30 min</u>	
1,2 µl 50mM MgCl	50°C	30 sek	30-35 Zyklen
0,5 µl 10mM dNTP	72°C	5 min	
0,5 µl Primer forward	4°C	unendlich	
0,5 µl Primer reverse			
18,4 µl H ₂ O			

2.6. Sequenzierungsreaktion

Die Sequenz-Reaktion wurde auf Eis angesetzt. Sie setzte sich zusammen aus:

2 µl	Big Dye
1 µl	Primer
1 µl	DNA
6 µl	Aqua _{dest}

PCR-Programm SEQ35

<u>96°C</u>	<u>20 sek</u>	
96°C	10 sek	
50°C	5 sek	35 Zyklen
<u>60°C</u>	<u>4 min</u>	
4°C	unendlich	

Nach der Reaktion wurde das Gemisch mit H₂O_{dest.} auf 20 µl aufgefüllt. Innerhalb von 24 h wurde die PCR-Reaktion mit dem hierfür erforderlichen Sequenzierungsgerät analysiert.

3. Methoden zur Untersuchung von *Arabidopsis thaliana*

3.1. Sterilisation des Saatgutes

3.1.1. Sterilisation mit Chlorgas

Ungefähr 50 Samen wurden in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und in einem dichten Glasgefäß plziert, z.B. in einem Exsikkator. In einem Becherglas mit 100 ml Na-Hypochloridlösung wurde vorsichtig mit einer Glaspipette 3 ml 37 %ige Salzsäure zugegeben und dieses in den Exsikkator, welcher zügig geschlossen wurde, gestellt. Die Samen wurden so für 5 h bis zu einer ü. N. Inkubation den Chlorgasen ausgesetzt. Anschließend wurden die Gefäße mit den Samen noch für etwa 2 h unter die Sterilbank zum Abdampfen gestellt.

3.1.2. Flüssigsterilisation

Die benötigte Menge Samen wurden in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben, mit 1 ml Ethanol (70 %, steril) versetzt und kurz geschüttelt. Nachdem sich die Samen abgesetzt hatten wurde der Überstand abgenommen und 1 ml der Sterilisierungslösung hinzugegeben. Nach 20 min auf einem Schüttler wurden die Samen fünf mal mit sterilem Leitungswasser gewaschen.

Die Samen konnten nun mit einer Pipette mit blauer Spitze aufgenommen werden und entweder direkt auf MS-Platten aufgetragen werden oder in eine Petrischale mit vorher sterilisiertem Filterpapier zum trocknen verteilt werden. In der Petrischale, verschlossen mit Parafilm, halten sich die sterilen Samen jahrelang.

Sterilisierungslösung:

1 ml	Na-Hypochlorid
6 ml	H ₂ O
2 Tropfen	Tween 20

3.2. Anzucht auf Erde

Arabidopsis thaliana L., Ecotyp Columbia 0 (Col 0) und mutante Linien wurden im Gewächshaus unter 16 h-Licht/ 8 h-Dunkel Bedingungen angezogen. Die Photonenflußdichte photosynthetisch aktiver Strahlung (PDF) betrug $60 \pm 20 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Die Temperaturen Tag/Nacht lagen bei 21°C/18°C. Alternativ wurden *A. thaliana* Samen erst auf MS-Medium mit 1 % Zucker, 0,8 % Agar ausgesät (steril), nach zwei Wochen in Töpfe pikiert und ins Gewächshaus überführt.

Die Pflanzen wurden auf einem Gemisch aus drei Teilen Erde und einem Teil Vermiculit (Basalt, Feuerfest, Linz) angezogen. Etwa 10 Samen pro Quadratzentimeter wurden auf das mit Leitungswasser durchfeuchtete Erdgemisch gestreut. Einzelne Töpfe und Schalen wurden mit Pikierhauben abgedeckt, um Kontamination mit Fremdsamen zu verhindern und um die Erde feucht zu halten und so für ein besseres Keimklima zu sorgen. Zur Stratifizierung kamen die Saattöpfe zunächst für 2 Tage in den Kühlraum (4°C). Nachdem die Keimblätter sichtbar waren, wurde die Pikierhaube abgenommen. Zwei- bis dreimal pro Woche wurden die Pflanzen mit Leitungswasser angestaut. Gedüngt wurde nach Bedarf mit Hoagland-Medium (1:1 mit Leitungswasser verdünnt) für *Arabidopsis* (Konz *et al.*, 1992) 10-14 Tage nach der Aussaat wurden die Pflanzen vorsichtig pikiert. Die Pflanzen wurden entweder in Einzeltöpfe mit einem Durchmesser von 6 cm (z.B. wenn die Pflanzen für Kreuzungen verwendet werden sollten) oder in 77er Pikierschalen pikiert. Für Vakuuminfiltration (siehe II 3.8 Vakuuminfiltration) wurden je fünf Pflanzen in Töpfe mit 9 cm Durchmesser pikiert. Diese Pflanzen wurden zu Beginn der Blüte einmal zurück geschnitten. Ca. 2 Wochen später

wurden die Pflanzen mitsamt den neu gewachsenen Infloreszenzen für die Vakuuminfiltration benutzt.

Zur Samengewinnung wurden die Pflanzen nach Abschluß der Blüte, wenn sich die untersten Schoten gelb färbten, mit Papiertüten überstülpt und die Bewässerung eingestellt. Nach beendeter Samenreife wurden die getrockneten Blütenstiele abgeschnitten und zerrieben, um die Samen aus den Schoten zu lösen. Die Samen konnten nahezu rein gewonnen werden, indem Pflanzenreste wiederholt mit einem Metallsieb (Maschenweite 450 µm) abgetrennt wurden. Die in 1,5 ml Plastikschaubgefäßen gesammelten Samen wurden zur vollständigen Trocknung für 2 Tage unter einem Abzug gestellt. Reste transformierter und transgener Pflanzen wurden autoklaviert, Reste nicht transgener Pflanzen kompostiert.

Einheitserde Typ Minitray	Einheitserde Werksverband e.V.
Europa-Pflanzschale Typ PS (60x40x6 cm)	Gebr. Patzer KG (Sinntal-Jossea)
Kunststoffhaube Für Pikierkisten	Manna
Kunststofftöpfe 6x7cm; 9x8cm	Romberg
Pikierkiste mit gelochtem Boden (77iger)	Meyer, Rellingen
	Manna

3.2.1. Anzucht unter Trockenstreß und Paraquatbehandlung

Trockenstreß:

Um Trockenstreß zu erzeugen wurden 3 Wochen alte Pflanzen nicht mehr bewässert. Die Insertionsmutanten wurden mit gleichbehandelten WT Pflanzen verglichen.

Paraquatbehandlung:

3 Wochen alte Pflanzen wurden mit 100 µM Paraquat in 0,25 % Tween 20 besprüht und danach für 6 Std. bei 500 µmol Photonen*m²*s⁻¹ belichtet. Danach wurden die Pflanzen ins Gewächshaus überführt. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz nur mit 0,25 % Tween 20 besprüht und unter Gewächshausbedingungen beobachtet. Nach Donahue *et al.* (1997) zeigten Erbsen nach 24 Stunden eine deutliche Schädigung der Blätter.

3.2.2. Anzucht von Arabidopsis unter Lichtstreß

Arabidopsispflanzen wurden nach der Aussaat, bis zu einem Alter von 3 Wochen im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurden die in 77er Pikierkisten eingesetzten Pflanzen

Hochlichtbedingungen ($800\mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$) für weitere vier Wochen ausgesetzt und Veränderungen im Erscheinungsbild fotografisch dokumentiert. Der Licht/Dunkelrhythmus war auf 16:8 Stunden eingestellt. Alternativ wurden Töpfe mit 12 Tage alten Keimlingen für 1 Woche Starklicht und UV-B Strahlung ausgesetzt. Der Licht/Dunkelrhythmus war auf 13:11 Stunden eingestellt. Während der Lichtphase wurde für 6 Stunden UV-Licht zugeschaltet. Die Lichtstärke betrug während der Lichtperiode $700 \mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$ und die Strahlungsstärke der UV-Strahlung war für UV-A ($\lambda=320\text{-}400\text{nm}$) $8,54 \text{ W/m}^2$ und für UV-B ($\lambda=280\text{-}320 \text{ nm}$) $= 1,35 \text{ W/m}^2$. Strahlung im UV-C Bereich ($\lambda < 280\text{nm}$) wurde mittels einer UV-C Schutzfolie herausgefiltert. Die biologisch effektive Strahlungs-dosis des UV-Lichts war $\text{UV-B}_{\text{BE}} = 11,9 \text{ kJ/m}^2$. Veränderungen im Erscheinungsbild wurden fotografisch festgehalten.

3.3. Schädlingsbekämpfung

Bei mäßigem Befall mit Trauermücken wurden zur Eindämmung der Populationsgröße Gelbtafeln (Fa. Neudorff, Emmerthal, BRD) verwendet, die etwa 10 cm über den Pflanzen in einem Abstand von einem Meter aufgehängt wurden. Routinemäßig, bzw. bei stärkerem Befall, wurden die Pflanztöpfe mit einer Nematodensuspension (Fa. Sautter und Stepper, Ammerbuch, BRD) besprüht oder gegossen. Geringer Blattlausbefall wurde durch den Einsatz von Nützlingen (*Chrysoperla*; Fa. Sautter und Stepper, Ammerbuch, BRD) bekämpft. Bei sehr starkem Blattlausbefall wurde Confidor als 25%ige Emulsionsspritzlösung eingesetzt. Der Cholinesterasehemmstoff ist ein Insektizid mit Berührungs- und Magengift-Wirkung (Perkow, 1983).

3.4. Anzucht auf sterilen Platten

Sterilisierte Samen wurden auf MS-Platten mit 1% Saccharose (w/v) und 0,8% Agar (w/v) ausgelegt, 2 Tage bei 4°C im Kühlschrank stratifiziert und anschließend in einem Klimaschrank (Berthold LB 122) bei 20°C , $36 \mu\text{mol} \times \text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$ Photonenfluß und einem Licht-Dunkel Wechsel von 10:14 Stunden angezogen. Die Platten (12 x 12 cm, Greiner) wurden im Klimaschrank horizontal gelagert. Um das Wachstum der Wurzeln besser untersuchen und vergleichen zu können wurden die Platten vertikal aufgestellt. Diese Platten enthielten 1,2% Agar.

Standard MS-Medium (1 L):

4,6 g/l	MS-Medium mit modifizierten Vitaminen (Produkt-Nr.: 245)
10 g/l	Saccharose (1 %, w/v)
8 g/l (12 g/l)	Pflanzen-Agar (0,8 % w/v; 1,2 % w/v), (Difco)
pH 5,6 mit KOH, autoklavieren	

3.4.1. Anzucht unter Streß- und Mangelbedingungen

Zur Anzucht von Pflanzen unter Streß-, bzw. Mangelbedingungen wurden das entsprechende Medium aus unterschiedlichen Stocklösungen zusammengesetzt, bestimmte Stoffe wurden durch andere ersetzt, bzw. nicht zugefügt. Die Konzentrationen der folgenden Medien sind angegeben als Endkonzentrationen. MS Macro I und II wurden als 10x Stocklösung, FeNaEDTA als 100x Stocklösung, MS Micros und Vitamine als 1000x Stocklösung hergestellt.

MS Macro:

NH ₄ NO ₃	20,6 mM
KNO ₃	18,8 mM
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,5 mM
KH ₂ PO ₄	1,25 mM

MS MacroII:

CaCl ₂ *2H ₂ O	2,98 mM
--------------------------------------	---------

FeNaEDTA:

	100 mM
--	--------

MS Micros:

H ₃ BO ₃	100,2 µM
MnSO ₄ *H ₂ O	70,4 µM
ZnSO ₄ *7H ₂ O	29,9 µM
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	1,03 µM
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,1 µM
CoCl ₂	0,154 mg/l
KI	5,00 µM

Vitamine (Modified MS; Duchefa):

1 g der Vitamine wurde in 9,62 ml H ₂ O dest. gelöst.	
Die Konzentration im Einzelnen war wie folgt:	
Myo-Inositol	100 mg/l
Nicotinsäure	0,5 mg/l
Pyridoxin-HCl	0,5 mg/l
Thiamin.HCl	1,0 mg/l
Glycin	2,0 mg/l

Für die durchgeführten Experimente wurde standardmäßig MS-Medium der halben Konzentration aus den Stocklösungen hergestellt. Der pH wurde mit KOH (1M) auf 5,7 eingestellt. Anschließend wurden 0,8 % Gelrite (Duchefa) zugefügt und auf 1 L mit H₂O dest. aufgefüllt. Danach wurden die Medien autoklaviert und nach dem Abkühlen handwarm in Platten (12 x 12, Greiner) gegossen. Bei der Durchführung von Experimenten unter Mangelbedingungen wurden folgende Änderungen in der Zusammensetzung der Medien gemacht:

<u>Sulfatmangel:</u>	MgSO ₄ *7H ₂ O (0,75mM)	ersetzt durch	MgCl ₂
	MnSO ₄ *H ₂ O (35,2 µM)	ersetzt durch	MnCl ₂ *4H ₂ O
	ZnSO ₄ *7H ₂ O (14,95 µM)	ersetzt durch	ZnCl ₂
	CuSO ₄ *5H ₂ O (0,05 µM)	ersetzt durch	CuCl ₂ *2H ₂ O

Die Pflanzen wurden 10 Tage auf Standard MS-Medium gezogen, dann auf das Mangelmedium und Kontrollmedium (¹/₂ MS-Medium) umgesetzt. Nach 15 Tagen wurden die Wurzellängen gemessen.

Phosphatmangel: KH₂PO₄ (0,625 mM) ersetzt durch KCl

Die Pflanzen wurden 10 Tage auf Standard MS-Medium gezogen, dann auf das Mangelmedium und Kontrollmedium (1/2 MS-Medium) umgesetzt. Nach 15 Tagen wurden die Wurzellängen und der Rosettendurchmesser gemessen.

Eisenmangel: FeNaEDTA wurde nicht zugesetzt.

Die Pflanzen wurden 10 Tage auf Standard MS-Medium gezogen, dann auf das Mangelmedium und Kontrollmedium (¹/₂ MS-Medium) umgesetzt. Nach 15 Tagen wurden die Wurzellängen und der Rosettendurchmesser gemessen.

¹/₂ MS-Medium:

50 ml Macro I
 50 ml Macro II
 10 ml FeNaEDTA
 1 ml Vitamine
 0,5 ml MS Micros
 10 g Saccharose (29,2 mM)
 0,5 g MES

Mußten Stoffe zu dem autoklaviertem Medium hinzugegeben werden (siehe unten), so wurden sie zunächst sterilfiltriert, um spätere Kontaminationen auf den MS-Platten zu vermeiden. Die Zusätze wurden dann in das handwarme, noch flüssige Medium gegossen. Anschließend wurden die Medien für 2 min gerührt. Beim Zusatz von Ascorbat wurde das Medium zunächst auf pH 6 eingestellt. Vor dem Gießen der Platten wurde nochmals überprüft, ob der pH etwa 5,7 betrug.

Verhalten der Pflanzen auf L-Ascorbinsäure, bzw. L-Galactono-1,4-Lacton:

- a) Es wurde L-Ascorbinsäure bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben.
- b) Es wurde L-Galactono-1,4-Lacton bis zu einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben.
(L-Galactono-1,4-Lacton ist eine Vorstufe von Ascorbat und kann von Pflanzen zu Ascorbat verstoffwechselt werden)

Die Pflanzen wurden 10 Tage auf Standard MS-Medium gezogen, dann auf das neue Medium und Kontrollmedium ($\frac{1}{2}$ MS-Medium) umgesetzt. Da Ascorbat in Kontakt mit Licht sehr schnell zu Dehydroascorbat oxidiert wird, wurden die Platten mit Alufolie abgedunkelt. Nach 7 Tagen wurden die Wurzellängen gemessen.

Verhalten der Pflanzen bei Schwermetallstreß:

- c) Es wurde Nickelsulfat bis zu einer Endkonzentration von 100 μ M zugegeben.
- d) Es wurde Zinkchlorid bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben.

Die Pflanzen wurden 7 Tage auf Standard MS-Medium gezogen, dann auf das neue Medium und Kontrollmedium ($\frac{1}{2}$ MS-Medium) umgesetzt. Die Pflanzen wurden 14 Tage lang beobachtet.

3.5. Anzucht in sterilen Schüttelkulturen

In autoklavierte Erlenmeyerkolben mit Wattestopfen wurde 100 ml autoklaviertes MS-Flüssigmedium gegeben. Zu jedem Kolben wurden ca. 10 Samen gegeben und die Kolben für 2 d bei 4°C in den Kühlraum gestellt. Anschließend wurden die Kolben auf einem Schüttler bei RT, 90 rpm ca. 10-14 d kultiviert. Lichtbedingungen: Dauerlicht, ca. 16 μ mol Photonen \times $m^2 \times s^{-1}$. Zur Ernte der Pflanzenteile wurden diese kurz mit Leitungswasser abgespült und auf Küchenkrepp kurz abgetrocknet, gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert, bzw. nach der Spülung mit Leitungswasser zur GUS-Färbung verwendet.

MS-Flüssigmedium (1 L):

4,6 g/l MS-Medium mit modifizierten Vitaminen (Produkt-Nr.: 245)
30 g/l Saccharose (3 %)
pH 5,6 mit KOH, autoklavieren

3.6. Probennahme

Für die DNA-Isolierung wurden vorwiegend Blüten geerntet, indem man mit einer Pinzette vorsichtig die Blüten von dem Stengel abtrennte. Für die RNA-Isolierung wurden die pflanzlichen Gewebe einzeln entnommen. Das Material wurde in 1,5 ml Eppendorfgläser oder 50 ml Falcontubes gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.7. Pflanzenselektion

3.7.1. Selektion auf sterilen Agar-Platten

Für Selektion auf Agarplatten wurden Antibiotika-Stammlösungen zu handwarmen Medium hinzugefügt (siehe II 2.1.2 Antibiotika). Außer den zu selektierenden Pflanzen wurde als Vergleich immer auch der Wildtyp ausgesät. Zwei Wochen nach der Keimung konnte ein reduziertes Wachstum und gelblich-weiße Keimblätter bei den nicht-resistenten Pflanzen auf Kanamycin beobachtet werden. Weitere Blätter wurden nicht entwickelt. Auf Hygromycin verhielten sich die nicht-resistenten Keimlinge ähnlich, nur daß die Blätter grün blieben. Daher waren die resistenten Pflanzen etwas schwerer zu unterscheiden.

3.7.2. BASTA-Selektion

Transgene Pflanzen, die das *bar*-Gen enthielten, wurden auf Erde angezogen. Das *bar*-Gen vermittelt eine Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin (BASTA). Die Selektion erfolgte sobald nach den Keimblättern die ersten Folgeblätter erschienen (Vierblattstadium), ca. zwei Wochen nach der Keimung. Die Pflanzen wurden mit der Herbizid-Lösung aus ca. 20 cm Abstand gründlich besprüht. Wenn die Pflanzen sehr dicht standen wurde dieser Vorgang nach einer Woche wiederholt. Außer den zu selektierenden Pflanzen wurde als Vergleich immer auch der Wildtyp ausgesät. Nach 3 – 5 d färbten sich die Blätter der nicht-resistenten Pflanzen gelb und die Keimlinge starben ab.

BASTA-Gebrauchslösung:

250 mg/l	BASTA [®]
0,1 %	Tween 20
maximal 4 Wochen haltbar, lichtempfindlich	

3.8. Vakuuminfiltration (nach Bechthold *et al.*, 1993)

Agrobakterien wurden bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 angezogen, dann für 15 min bei 2500 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in Infiltrationsmedium aufgenommen (in einem Viertel des ursprünglichen Volumens). Auf Erde gewachsene *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, je fünf in einem Topf mit 9 cm Durchmesser mit Infloreszenzen in 10-15 cm Höhe, wurden in einem Vakuumexsikkator kopfüber in die Agrobakterienlösung getaucht. Die Blüten und Knospen sollten dabei gut bedeckt sein. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde nun dreimal für je 5 min ein Vakuum angelegt. Anschließend wurden die Pflanzen gewässert und für die nächsten 2 Tage mit einer Pikierhaube bedeckt, um ein feuchtes Klima zu erzeugen.

Infiltrationsmedium:

2,3 g/l	MS-Medium mit modifizierten Vitaminen (Produkt-Nr.: 245)	
0,01 mg/ml	BA (6-Benzylaminopurin, Stammkonz. 10 mg/ml in 1 M NaOH)	
50 g/l	Saccharose	
1 Tropfen	Tween 20	pH 5,8 mit 0,5 M KoH

3.9. Präparation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

3.9.1. DNA-Isolation für PCR-Reaktionen

Eine einfache und schnelle Präparation genomischer Pflanzen-DNA erfolgte nach der Methode von Edwards (Edwards, 1991). Die auf diese Weise isolierte genomische DNA eignet sich in erster Linie als Matrize für PCR-Analysen, weniger für Southern Blot-Untersuchungen, weil die DNA hierbei stark geschert und nicht gereinigt wird.

Ein bis drei Rosettenblätter von *Arabidopsis thaliana* wurden geerntet und entweder sofort verarbeitet oder bis zur DNA-Präparation in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit einem Bohrer ca. 15 s bei RT zerrieben. Das homogenisierte Gewebe wurde mit 400 µl Extraktionspuffer in ein Eppendorfgefäß überführt und für 3-4 sek gevortext. Die Proben waren stabil für mindestens 1 h. Nach der Aufarbeitung aller Proben wurden sie für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. 300 µl des Überstandes wurden in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 300 µl Isopropanol vorsichtig gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die gefällte DNA bei 13000 rpm in der Eppendorf 5417 Zentrifuge für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgegossen und das

Eppendorfgefäß auf Papier abgetupft. Das Pellet wurde unter dem Abzug ca. 20-30 min getrocknet und in je 50 µl 1x TE-Puffer resuspendiert. Je PCR-Ansatz wurden 1 µl der Präparation eingesetzt (eventuell 1:10 verdünnt).

Extraktionspuffer:

200 mM Tris/HCl , pH 7,5
 250 mM NaCl
 25 mM EDTA
 0, 5% (w/v) SDS
 autoklaviert

1x TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl , pH 8,0
 1 mM EDTA
 autoklaviert

3.9.2. Screening von Pflanzenpopulationen für homozygote T-DNA-Insertionslinien

Die von *A. tumefaciens* vermittelte T-DNA Insertion kann je nach der Stelle ihrer Insertion verschiedene Effekte auf ein Gen haben, die nicht alle zu einer Nullmutante führen (Krysan et al., 1999). Deswegen ist es wichtig die Insertionsstelle zu bestätigen und sicherzustellen, daß kein Transkript hergestellt wird. Nach der Anzucht der Pflanzen und Isolation der DNA wurde die Insertionsstelle der T-DNA mit einem PCR Ansatz untersucht. Dafür wurden Primerkombinationen verwendet, die von der Left-Border Seite der T-DNA vor (z.B. Primer A, Abbildung 4), bzw. hinter der Insertionsstelle liegenden Primern (z.B. Primer B, Abbildung 4) des NAT Gens bestanden. Als Beispiel für alle Insertionslinien siehe Abb. 4, die verwendeten Primerkombinationen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die resultierenden Banden wurden ausgeschnitten und gereinigt. Durch eine nachfolgende Sequenzreaktion mit den LB-, bzw. RB-Primern, konnte die Insertionsstelle genau bestimmt werden.

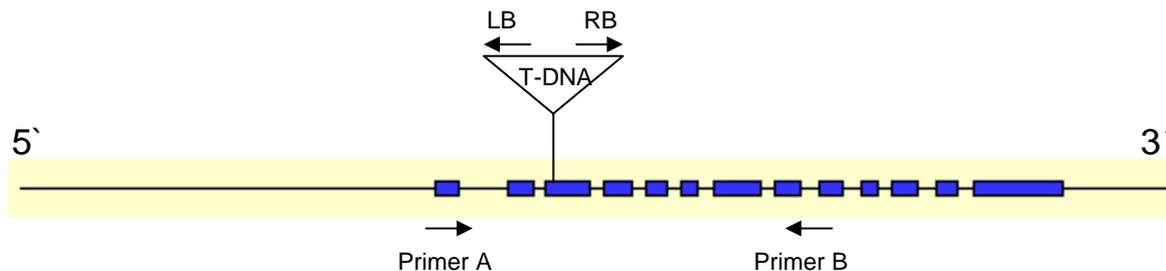


Abbildung 4: T-DNA Insertionsanalyse, Beispiel zur Primerauswahl.

Gleichzeitig wurde die isolierte DNA der Pflanzen mit einem anderen PCR Ansatz auf Zygotie untersucht. Dafür wurde für das Wildtyp Allel ein Primer vor (z.B. Primer A) und ein Primer hinter (Primer B) der T-DNA Insertion benutzt. Ergab die PCR ein Produkt, so war die Pflanze entweder Wildtyp oder Heterozygot. Der 2. PCR Ansatz bestand z.B. aus dem Primerpaar Primer A und Primer LB. Dadurch konnte bestimmt werden, ob die genomische DNA der Pflanze die Insertion trug. Pflanzen, die nur bei dieser PCR eine Bande zeigten waren Homozygot. Pflanzen die in beiden PCR's eine Bande zeigten waren Heterozygot. Als Letztes wurde das Transkript untersucht, um die Knockout-Funktion der T-DNA Insertionslinie zu bestätigen. Diese Untersuchung wurde ausschließlich an homozygoten Pflanzen durchgeführt.

Für das PCR-Screening der Pflanzenpopulationen wurde eine ähnliche Methode wie bei der Colony-PCR (siehe Material und Methoden 2.5.3 Colony-PCR) gewählt. 1 µl isolierter genomischer DNA wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß mit vorgelegtem Reaktionsgemisch (einschließlich Taq-Polymerase und spezifischen Oligonukleotiden) überführt. Nach Beendigung der PCR wurden die Ansätze auf einem Agarosegel aufgetrennt. Pflanzen, die ein Produkt für die Insertion aufwiesen, jedoch kein Produkt für Wildtyp, wurden als Homozygot angenommen. Dies wurde in der Folgegeneration in der Regel bestätigt durch eine erneute PCR-Analyse.

3.10. Präparation von RNA aus *Arabidopsis thaliana*

3.10.1. RNA-Isolierung mit Trizol

Für die RNA Extraktion mit Trizol (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden 50–100 mg Pflanzenmaterial je Eppendorfgefäß abgewogen und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Das Material wurde entweder mit einem Bohrer oder im Mörser unter Zugabe von 1 ml Trizol-Reagenz homogenisiert. Nach einer Inkubation (5 min bei RT) der Proben wurden 200 µl Chloroform zugegeben und 15 sek geschüttelt. Es erfolgten eine kurze Inkubation von 2 min bei RT und eine Zentrifugation bei 4°C, 12.000g für 10 min. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Die Proben wurden 10 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (4°C, 7500 g, 5 min). Nach der Zentrifugation wurde das RNA Pellet mit Ethanol gewaschen und an der Luft 15 bis 20 min getrocknet. Das trockene RNA Pellet wurde in H₂O/DEPC resuspendiert.

3.10.2. Quantifizierung und Lagerung von RNA

Der RNA-Gehalt konnte photometrisch über die Absorption bei 260 nm quantifiziert werden (TECAN GmbH, Salzburg, Österreich). Dazu wurde ein Aliquot der RNA-Präparation 1:50 mit DEPC-Wasser in einem Volumen von 100 µl verdünnt und die Absorption bei 260 nm, sowie das Absorptionsverhältnis bei 260 und 280 nm bestimmt. Hierfür wurde folgende Formel benutzt, um die RNA-Konzentration zu bestimmen: $((E_{260}-0,0011)/0,0068) \times 50 \times 0,8 = \text{ng}/\mu\text{l}$ Das Verhältnis A_{260}/A_{280} gibt die Verunreinigung der Proben mit Proteinen an. Liegt der Wert zwischen 1,6 und 1,7, so ist die RNA-Präparation sehr rein. Zusätzlich konnte eine Messung der Absorption bei 230 nm Auskunft über die Verunreinigung mit Phenol oder Kohlenhydraten geben.

3.10.3. Agarose-Gelelektrophorese von RNA

3.10.3.1. Kontrolle der RNA-Qualität

Um die Qualität der RNA für RT-PCR zu überprüfen, wurden Agarosegele (siehe II 2.4.7 Agarose-Gelelektrophorese) ohne Formaldehyd zur Auftrennung von RNA verwendet. Für den RNA Probeauftrag wurden 4 µl der RNA-Probe mit 1,5 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) und mit 10 µl Glyoxal Loading Dye (Ambion, Austin, USA) versetzt und 30 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde alles auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.10.3.2. Für Northern Blot

Zur Vermeidung von RNA-RNA-Heteroduplexen und Sekundärstrukturen wurde die RNA in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennt. 2 g Agarose wurde mit 166 ml Aqua_{bidest} gekocht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurden 14 ml einer 37 %igen (w/v) Formaldehydlösung (Endkonzentration: 2% (v/v)) und 20 ml 10x RB hinzu gegeben. Die Gellösung wurde in einen Gelträger mit Probenkamm gegossen und nach dem Erstarren in eine mit 1x RB-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt.

Die RNA-Proben wurden auf gleiche RNA-Mengen (im Durchschnitt auf einen RNA-Gehalt von 20 – 40 µg) eingestellt und auf 30 µl mit H₂O-DEPC aufgefüllt. Zu diesem Ansatz wurden 9 µl Formaldehyd, 30 µl Formamid und 7,8 µl 10 x RB-Puffer zugefügt. Die RNA-Proben wurden für 15 min in einem Heizblock (Eppendorf Thermomixer 5436) bei 65°C denaturiert, anschließend abgekühlt und mit 1 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) versetzt. Nach einer kurzen Zentrifugation (ca. 30 sek) wurden die Proben auf das denaturierende Agarosegel aufgetragen und bei konstant 180 mA in 2 – 3 h mit 1 x RB als Laufpuffer aufgetrennt.

10 x RB:

42 g/l Mops , pH 7 mit 10 N NaOH
4 g/l Na-Acetat
2 g/l EDTA

3.11. Kapillartransfer von RNA auf Nylonmembran (Northern Blot)

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA und der Dokumentation des Gels, folgte der Transfer der RNA aus dem Gel auf eine Membran (Biodyne B Transfer Membrane, Pall Europe Limited, Porthsmouth, England). Das RNA-Gel wurde ohne weitere Behandlung nach der Gelelektrophorese direkt für den Blotaufbau verwendet und als Transferpuffer 10 x SSC eingesetzt. Auf die Schale mit dem Transferpuffer wurde eine rechteckige Glasplatte dementsprechend platziert, daß sie auf zwei Seiten überstand. Auf diese Glasplatte wurde ein Wattman-Papier so gelegt, daß es auf beiden Seiten bis in die Lösung hing und sich so vollsog. Auf das Wattman-Papier wurde das Gel gelegt, darauf folgte die zurecht geschnittene Membran und drei weitere Lagen zurechtgeschnittenes Wattman-Papier. Als letztes folgte ein ca. 5 cm Papierstapel mit Apura-Papier und ein geeignetes Gewicht, wie z.B. Kühlpads. Der Transferpuffer gelangte so aus der Schale durch Gel und Wattman-Papier bis in den Papierstapel und transferierte dabei aufgrund der Sogwirkung die RNA aus dem Gel auf die Membran. Hie wurde der weitere Transport aufgrund der Ladung der Membran gestoppt. Der Transfer erfolgte über Nacht. Am nächsten Morgen wurde der Blot abgebaut. Dabei wurden auf der Membran die Slots des Gels und die Ausrichtung markiert. Zur permanenten Bindung der RNA an die Membran wurde diese im Ofen bei 80°C für 2 h gebacken.

3.12. Northern Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Church (1984). Hierzu wurde die Membran in einer Hybridisierungsröhre für 30 min bis 3 h bei 58°C im Rotationshybridisierungssofen (Fa. Hybaid, Heidelberg) vorhybridisiert. Es wurde der sogenannte Church-Puffer als Hybridisierungslösung verwendet. Die denaturierte Sonde wurde zur Hybridisierung zugegeben. Für die Hybridisierung sollte ein möglichst kleines Volumen (25 – 50 ml) gewählt werden (gerade so groß, daß die Membranen ausreichend benetzt werden) und erfolgte über Nacht bei 58°C in dem Rotationshybridisierungssofen. Nach der Hybridisierung wurde die Membran mit steigender Stringenz gewaschen. Die Reihenfolge des Waschens war: 5min bei 58°C mit Waschlösung I (6x SSC, 0,5 % SDS), 5 min bei 58°C

mit Waschlösung II (4x SSC, 0,5 % SDS), 5-10 min bei 58°C mit Waschlösung III (2x SSC, 0,5 % SDS). Der letzte Schritt wurde bei Bedarf (wenn noch sehr starke Radioaktivität gemessen wurde, oder eine starke Hintergrund-Radioaktivität vorhanden war) wiederholt werden, eventuell bei 65°C.

Hybridisierungslösung (Church-Puffer):

1 mM EDTA
0,5 M NaPi, pH 7,2
7 % (w/v) SDS

3.13. Radioaktive Markierung von DNA

30 µl DNA-Insert (20-100 ng DNA) wurden mit 10 µl Labelling-Mix für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Zu dem Ansatz wurden 20-30 µCi α -[³²P]-dATP, 2 µl BSA (1 mg/ml) und 3 U 'Klenow-Fragment' zugegeben. Der Ansatz wurde ü. N. bei 30°C oder mindestens 2 Std. bei 37°C inkubiert. Der Einbau der Radioaktivität wurde durch TCA-Fällung bestimmt: 1 µl Labellingansatz wurden mit 10 % (w/v) TCA(Trichlor-Essigsäure) und 0,1 mg Heringssperma-DNA in einem Gesamtvolumen von ca. 400 µl 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 2 min bei 13.000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5417) zentrifugiert. Das Pellet enthielt die intakte DNA. Im Überstand befanden sich Fragmente und nicht eingebaute Nukleotide, inklusive der radioaktiven dATPs. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und anschließend - getrennt vom Pellet - die radioaktiven Zerfälle mit einem Meßgerät (Berthold LB 122) gemessen. Das Verhältnis der radioaktiven Zerfälle vom Sediment zum Überstand wurde bestimmt. Der Einbau des jeweiligen radioaktiv markierten dNTP's sollte über 80 % betragen.

Nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine Säule (MicroSpin S-200 HR, Amersham Pharmacia Biotech) nach dem Prinzip der Größenausschlußchromatographie von der Sonde getrennt. Die Gelmatrix in den Säulen wurde vor Gebrauch kräftigt geschüttelt. Dann wurde der Deckel der Säule gelöst, der untere Verschlussstopfen abgebrochen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt. Durch Zentrifugation (1 min, 3000 rpm) wurde die Säule equilibriert. Der radioaktive Reaktionsansatz wurde in die Mitte der Matrix gegeben und die Säule für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert, so daß die markierten DNA-Moleküle, die von den nicht eingebauten Desoxynukleotiden und Salzen getrennt wurden, in einem frischen Eppendorfgefäß gesammelt wurden. Der Ansatz konnte nach einer 10-minütigen

Denaturierung bei 95°C, 2 min Inkubation auf Eis, kurz anzentrifugieren, für die Hybridisierung eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

Lösung A :

1,25 M Tris/ HCl, pH 8,2
0,125 M MgCl₂
2 % (w/v) 2-Mercaptoethanol
je 0,5 M dCTP, dGTP, dTTP

Lösung B:

2 M HEPES/ NaOH, pH 6,6

Lösung C:

3,6 µg/µl Hexadesoxynukleotide (dN6)

5 x Labelling-Mix:

Lsg. A : Lsg. B : Lsg. C
100 : 250 : 100

3.13.1 Herstellung der Sonde

Die DNA-Fragmente für die Sonden wurden durch eine PCR Amplifikation mit Pfx-Polymerase hergestellt (Material und Methoden 2.5.2.) und nach einer Gelelution über eine Säule von dNTP's und Salzen gereinigt (Material und Methoden 2.4.5.). Die verwendeten Primer sind im Anhang, Tabelle 7, aufgelistet. Für die *Actin*-Sonde wurden die Primer Actin1-Sonde-F und Acin2-Sonde-R verwendet (550 bp). Für die *AtAzg1*-Sonde wurden die Primer Azg1-Sonde-F und Azg2-Sonde-R verwendet (450 bp). Als Template wurde Wurzel cDNA von WT (Col0) verwendet.

3.14. Transkriptnachweis durch Semiquantitative RT-PCR

Die RT-PCR besteht aus drei Schritten: (1) DNase-Verdau der isolierten RNA, (2) Reverse Transkription zur Herstellung der cDNA und (3) eine PCR mit der entstandenen cDNA als Template zur semiquantitativen Mengenbestimmung der von der Pflanze synthetisierten RNA zu einem bestimmten Zeitpunkt (Probennahme des Pflanzenmaterials zur RNA-Isolation).

3.14.1. DNase Verdau der isolierten RNA

Zum DNase-Verdau wurden 5-10 µg RNA eingesetzt, die mit 1 µl RNase-freier DNase I (10 U/µl, Roche, Mannheim GmbH) und 5 µl Superscript 5x Puffer (Invitrogen), aufgefüllt mit Aqua_{bidest} auf 22,5 µl, für 15-30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde durch die Zugabe von 2,5 µl 25 mM EDTA (Endkonzentration: 2,5 mM) und nachfolgender Hitze-Denaturierung (10 min bei 65°C) inaktiviert. Die Proben wurden auf Eis 2 min abgekühlt und anzentrifugiert.

3.14.2. Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde mit Superscript II (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben.

Die Transkriptionsreaktion (je 50 µl Ansatz) enthielt:

- 2 µl oligo dt (Metabion 500 ng/µl)
- 2,5 µl dNTP (10 mM)
- 1-5 µg RNA
- 10 µl Superscript Puffer 5x (Invitrogen)
- 5 µl DTT (0,1 M, Invitrogen)
- 1 µl Superscript II (Invitrogen)
- ad Aqua_{bidest} auf 50 µl (oder H₂O/DEPC)

Die Ansätze wurden für 50-60 min bei 42°C inkubiert, dann für 15 min bei 70°C die Superscript II deaktiviert und die Proben nach 2 min auf Eis kurz anzentrifugiert.

3.14.3. Semiquantitative RT-PCR

Die in 3.14.2 hergestellte cDNA wurde nun mit Hilfe einer PCR-Reaktion quantifiziert.

Ansatz (20 µl):

PCR-Programm semiquantitative RT-PCR:

1-4 µl DNA	94°C	3 min	
0,2 µl Qiagen- Taq94°C	30 sek		
2,0 µl 10x Puffer	50°C – 55°C	30 sek	30 - 35 Zyklen
0,2 µl 10mM dNTP	72°C	60 sek	
0,5 µl Primer forward	72°C	5 min	
0,5 µl Primer reverse4°C	unendlich		
14,6 µl H ₂ O _{dest}			

Die PCR Produkte wurden auf einem 1 % Agarosegel, welches mit Ethidiumbromid gefärbt war, aufgetrennt und dokumentiert. Als Kontrolle, daß gleichviel cDNA für die PCR eingesetzt wurde, wurde das Actin2 Gen mit spezifischen Primern (siehe Tabelle 1) für 30 Zyklen amplifiziert.

3.15. GUS-Färbung von *A. thaliana* Gewebe

Ganze Pflänzchen oder Gewebe von transgenen Pflanzen wurden in Färbelösung (nach Jefferson *et al.*, 1987) getaucht:

Färbelösung:

- 100 mM NaPO₄ (pH 7,2)
- 10 mM EDTA
- 0,5 mM Ferricyanid (Kaliumhexacyanoferrat III)
- 0,5 mM Ferrocyanid (Kaliumhexacyanoferrat II Trihydrat)
- 0,1 % Triton X-100 (v/v)
- 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-glucuronidase cyclohexamin (X-Glu)

Die Proben wurden 10 min vakuumfiltriert und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Färbelösung wurde dann durch Fixierlösung (50% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Essigsäure, 10% (v/v) Formaldehydlösung, 37%ig) ersetzt und die Proben bei 65°C 15 min fixiert. Das Gewebe wurde durch Inkubation mit 70-80% Ethanol entfärbt, die Lösung wurde mehrmals gewechselt.

Die Promotoraktivität in verschiedenen Stadien der Entwicklung wurde in T2 Pflanzen analysiert. Dafür wurden Schoten aus mehreren Entwicklungsstadien geerntet und der Länge nach aufgeschnitten, dann fand die GUS-Färbung statt. Präparierte Embryonen wurden in Chloralhydrat:Wasser:Glycerin (8:2:1) entfärbt und unter einem Nikon Eclipse E800 Mikroskop, ausgestattet mit einer Digitalkamera (ky-F1030, JVC, Japan) untersucht.

Proben, die mit dem Mikrotom geschnitten werden sollten, wurden für GUS wie oben beschrieben gefärbt und über Nacht bei 4°C in Glutaraldehyd fixiert. Das fixierte Gewebe wurde am nächsten Tag durch eine Ethanol-Serie dehydriert und in Paraplast (Roth) eingebettet. Das eingebettete Material wurde in 5 µm dicke Scheiben geschnitten, auf Objektträger aufgebracht, mit Rotihistol (Merck) entwachst und mit Entellan (Merck) eingedeckelt. Unter dem Mikroskop konnten die Schnitte untersucht werden.

3.16. Kalluskultur und Tumorinduktion

Kalluskulturen wurden aus Kotyledonen von *A. thaliana* Wildtyp, Einzel- und Doppelmutanten aus AtNAT7 und AtNAT8 generiert, außerdem aus Pflanzen, die AtNAT-GUS und AtNAT8-GUS exprimierten. Das MS-Medium enthielt zusätzlich:

3% (w/v)	Zucker
0,5 mg/l	6-Benzylaminopurin
1 mg/l	Naphtaleneacetic acid
1 mg/l	Indole-3-acetic acid
1 mg/l	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
9 g/l	Agar

Die Kalli konnten durch Umsetzen in neues Medium derselben Zusammensetzung erhalten werden.

Dieselben Pflanzenlinien, die für die Kalluskultur benutzt wurden, wurden für die Induktion von Tumoren benutzt. An der Stengelbasis der ersten Infloreszenz wurde ein kleiner flacher Schnitt durchgeführt und mit dem supervirulenten Agrobakterienstamm C58 angeimpft (überlassen durch Prof. R. Hedrich, Universität Würzburg; Deeken *et al.*, 2003). Nach verschiedenen Zeitpunkten nach Kallus- oder Tumorinduktion wurden Proben von den Geweben genommen und entweder für RT-PCR (siehe Material und Methoden 3.15 Semiquantitative RT-PCR) oder GUS-Färbung (siehe Material und Methoden 3.16 GUS-Färbung) benutzt.

3.17. Transiente Transformation von *A. thaliana*- und Zwiebelepidermis-Zellen

Die transiente Transformation von *A. thaliana*-Zellen wurde wie in Koroleva *et al.*, (2005) beschrieben durchgeführt. Dazu wurde der supervirulente SVO Agrobakterienstamm (LBA 4404.pBBR 1MCS virGN54D) benutzt. Für die Epidermiszellen der Zwiebel wurde die „Particle bombardment“-Methode verwendet. Hierfür wurde die adaxiale Epidermishaut von frischen Zwiebelknollen präpariert. Die Plasmid-DNA, welche die GFP-Fusion trug, wurde auf Goldpartikel mit 1,0 µm Durchmesser präzipitiert und in die Zwiebelepidermis mit einer Helium-Schußvorrichtung (Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System, Bio-Rad) geschossen. Zu diesem System wurden spezielle Bruchscheiben benutzt, die bei einem Druck

von 900 psi brechen. Das beschossene Gewebe wurde bei 25°C für 20 Stunden im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenzuntersuchungen wurden mit einem Nikon Eclipse E800 Mikroskop durchgeführt. Dieses war mit einer Digitalkamera verbunden (ky-F1030 JVC, Japan). Die Beobachtung der GFP-Fluoreszenz konnte durch einen GFP-Filter erreicht werden (Excitation 460-500 nm, Emission 510-560 nm).

3.18. Cytokinin Bestimmung

Die Pflanzen, bei denen der Gehalt an verschiedenen Cytokininen und deren Derivate gemessen werden sollte, wurden in einer sterilen Kultur auf MS-Platten im Klimaschrank bei ca. 60 $\mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$ angezogen. Die Pflanzen wurden vertikal auf MS-Platten ohne Zusatz, bzw. mit 0,2 $\mu\text{M trans-Zeatin}$ angezogen. 20 d nach der Keimung wurden die Rosettenblätter (jeweils 3x 1g) geerntet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der verschiedenen Cytokinine und deren Derivate mittels HPLC wurde im Institut von Miroslav Strnad in Olomouc (Tschechien) durchgeführt.

3.19. Ascorbat/Glutathion Messungen in Arabidopsis

Für die Ascorbat/Glutathion Messungen wurden Arabidopsispflanzen der verschiedenen Knockout-Linien (siehe Ergebnisse) 4 Wochen in der Klimakammer unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Beleuchtung, 16 Stunden Nacht, ca. 60 $\mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$) herangezogen. Nach exakt 28 d wurden die Proben um 16:00 Uhr genommen, jeweils drei Proben a 15 mg von Rosettenblättern wurden in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und dann bei -80°C für maximal 3 Wochen gelagert. Die HPLC-Bestimmung des Ascorbat- und Glutathiongehaltes wurde im Institut von Nele Horemans in Antwerpen (Belgien) durchgeführt. Es wurde jeweils die reduzierte Form und der Gesamtgehalt von Ascorbat und Glutathion bestimmt.

3.20. Transportmessungen in Pflanzen („Pflanzen-Uptakes“)

Das Protokoll zur Transportmessung in Pflanze wurde nach Sherson *et al.* 2000 verändert. Samen der entsprechenden Mutanten und Wildtypen wurden nach dem oben genannten Protokoll sterilisiert und nach 2 Tagen Vernalisation auf Standard-MS-Platten ausgelegt. Für die Versuche wurden die Keimlinge zwei Wochen unter Langtagbedingungen steril angezogen.

Damit die Messungen vergleichbar wurden und einen statistischen Durchschnittswert lieferten, wurden pro Ansatz mind. vier Keimlinge mit einem Gesamtfrischgewicht von mindestens 5 mg genutzt. Alle Ansätze wurden gewogen und das Frischgewicht (FW) bestimmt. Die gewogenen Keimlinge wurden in 450 µl flüssigem MS-Medium mit 1 % Saccharose, pH 4.5, in 1,5 ml Eppendorfgläser überführt. Nach Vakuumfiltration (3 min, 300 mbar) wurden die Keimlinge 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden 50 µl (25 µM Endkonzentration) des radioaktiv markierten Substrats zugegeben. Die Inkubation mit diesem Substrat variierte je nach Versuch zwischen 10, 20 und 30 min. Die Proben wurden dann in der Absaugapparatur auf Glasfaserfiltern 5 mal je 1 min mit 4 ml eiskaltem MS-Medium mit 1 % Saccharose, pH 4.5, gewaschen. Anschließend wurden die Keimlinge in 80 % Ethanol extrahiert und 5 min im Flüssigkeitsszintillations-Zähler vermessen. Die Transportexperimente wurden sechs mal unabhängig voneinander wiederholt und ein Mittelwert wurde berechnet (siehe Ergebnisse 5.3.2.).

Verwendete radioaktive Substrate:

[8-¹⁴C] Adenin (10,8 GBq/mmol Amersham Biosciences UK Limited)

trans-[2-³H] Zeatin (592 GBq/mmol; Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Science, Isotope Laboratory Praha)

4. Klonierungen

4.1. Herstellung der *pAtNAT::GUS* und *pAtAzg::GUS* Pflanzen

Die Promotorsequenz der *AtNAT*-Gene und *AtAzg*-Gene wurde individuell ausgewählt. Um Fragmente zu amplifizieren, die die Promotorregion, das 1. Exon, das 1. Intron und einen Teil des 2. Exons enthielten, wurden Oligonukleotid-Primer entworfen (siehe Tabelle 2). Nach der PCR-Amplifikation mit der genomischen DNA aus *A. thaliana* WT als Template wurde das PCR-Produkt in den pENTR/D-TOPO Vektor kloniert und anschließend mit der LR-Reaktion in den pGWB3-Vektor, der eine GUS-Sequenz am C-terminalen Ende zur Verfügung stellt (Abbildung 5), Vektorkarten siehe Anhang. pGWB3 ist ein GATEWAY-kompatibler binärer Vektor, der ebenfalls für die Promotor-getriebene Expression des GUS-Gens erschaffen wurde. Der Vektor trägt das Hygromycin- und Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion in Pflanzen. Klonierungen mit GATEWAY-Vektoren wurden nach Protokoll des Herstellers durchgeführt, auch wurden die dort angegebenen Chemikalien benutzt (Invitrogen, Carlsbad,

Californien, USA). Alternativ wurden einige der Promotor-AtNAT PCR-Produkte in pGEM-T Easy kloniert, mit SmaI/XbaI heraus geschnitten und in den pGPTV-Vektor kloniert, der ebenfalls eine GUS-Sequenz am C-terminalen Ende trägt (Abbildung 6). Er übermittelt in Pflanzen eine BASTA-Resistenz zur Selektion (Vektorkarte siehe Anhang).

Das Plasmid, welches das Konstrukt enthielt, wurde mit Hilfe der Vakuumfiltrationsmethode (Bechtold *et al.*, 1993) durch *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) in Wildtyp *A. thaliana* Pflanzen transformiert, wo das chimäre Konstrukt in das Genom inseriert wurde. Transgene Arabidopsislinien wurden durch Kanamycin oder BASTA selektiert und auf GUS Aktivität analysiert (Jefferson *et al.*, 1987). Nur homozygote transgene Linien der T3 Generation, bzw. nachfolgende Generation T4, wurden analysiert, um Promotoraktivität in verschiedenen Entwicklungsstadien zu untersuchen. Keimlinge, bzw. verschiedene Gewebe der Pflanzen wurden in GUS-Färbelösung getaucht und nach einer Übernacht-Inkubation bei 37°C am folgenden Tag fixiert und entfärbt.



Abbildung 5: Der binäre Vektor pGWB3 zur Pflanzentransformation führt nach der LR-Reaktion zu einer Kanamycin- (violett: NPTII) und Hygromycin-Resistenz (violett: HPT) in *E. coli* und *A. thaliana*. pGWB3 besitzt zusätzlich zur Basisausstattung aller pGWB-Vektoren eine Glucuronidase-Sequenz (blau: GUS) hinter der Gateway-Kassette (rot: G). Dies führt zu einer durch den zu untersuchenden Promotor getriebenen Translation des GUS-Segmentes. Kasten in weiß: AtNAT-Promotor (pNAT), bzw. AtAzc-Promotor(pAzc), lila: Terminatorsequenz (NOS-T), beige: *CaMV*-35S-Promotor (35S), orange: Left-Border (LB) und Right-Border (RB), flankierende Bereiche der T-DNA, flüchtig: Terminatorsequenz (NOS-T), hellblau: *NOS*-Promotor (NOS-P), in Klammern: Restriktionsenzym-Schnittstellen.

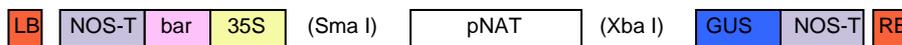


Abbildung 6: Der binäre Vektor pGPTV zur Pflanzentransformation führt zu einer Kanamycin-Resistenz in *E. coli* und zu einer BASTA-Resistenz (bar) in *A. thaliana*. pGPTV besitzt eine Glucuronidase-Sequenz (blau: GUS) hinter der Multiple-Cloning-Site. Dies führt zu einer durch den zu untersuchenden Promotor getriebenen Translation des GUS-Segmentes. Kasten in weiß: AtNAT-Promotor (pNAT), beige: *CaMV*-Promotor (35S), orange: Left-Border (LB) und Right-Border (RB), flankierende Bereiche der T-DNA, flüchtig: Terminatorsequenz (NOS-T), in Klammern: Restriktionsenzym-Schnittstellen.

4.2. Konstruktion der *AtNAT-GFP* und *AtAzc-GFP* Fusionen

Für die Lokalisation der Nucleobase-Ascorbat Transporter und des Azc1 Transporters wurden GFP-Fusionskonstrukte hergestellt, und zwar wurde hierfür entweder das ganze Protein mit

einem C-terminalen GFP fusioniert, oder das potentielle Transitpeptid plus 1-2 Transmembranbereiche (nur AtNAT12 und AtAzg1) mit dem GFP-Protein C-terminal fusioniert.

Für die Klonierung der GFP-Fusionskonstrukte wurde jeweils der volle kodierende Bereich mit Ausnahme des Stop-Codons benutzt (NAT7 537 aa, NAT8 538 aa, NAT12 708 aa, Azg1 579 aa), bzw. für *AtNAT12*_{Transitpeptid}-GFP von ATG bis Basenpaar 480 (entspricht den ersten 180aa) und für *AtAzg1*_{Transitpeptid}-GFP von ATG bis Basenpaar 348 (entspricht den ersten 116 aa), in den pENTR/D Vektor kloniert und anschließend mit der LR-Reaktion in den pGWB5-Vektor kloniert, der eine GFP-Sequenz am C-terminalen Ende zur Verfügung stellt (siehe Abbildung 7), Vektorkarten siehe Anhang.

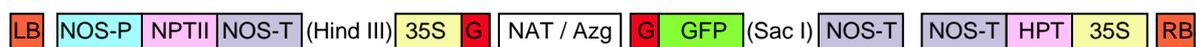


Abbildung 7: Der binäre Vektor pGWB5 zur Pflanzentransformation führt nach der LR-Reaktion zu einer Kanamycin- (violett: NPTII) und Hygromycin-Resistenz (violett: HPT) in *E. coli* und *A. thaliana*. pGWB5 besitzt zusätzlich zur Basisausstattung aller pGWB-Vektoren einen *CaMV-35S*-Promotor vor der Gateway-Kassette und eine GFP-Sequenz (grün: GFP) hinter der Gateway-Kassette. Dies führt zu einer *CaMV-35S* getriebenen Translation des eingefügten Segmentes (hier in weiß: NAT steht für *AtNAT7*, *AtNAT8*, *AtNAT12*_{Transitpeptid}, *AtNAT12*, Azg steht für *AtAzg1*_{Transitpeptid}, *AtAzg1*). beige: *CaMV-35S*-Promotor (35S), orange: Left-Borber (LB) und Right-Border (RB), flankierende Bereiche der T-DNA, flieder: Terminatorsequenz (NOS-T), hellblau: *NOS*-Promotor (NOS-P), in Klammern: Restriktionsenzym-Schnittstellen.

Die gesamte Länge für *AtNAT7* wurde mit den Primern NAT7-GFP F1 und NAT7-GFP R1 amplifiziert, *AtNAT8* mit dem Primerpaar NAT8-GFP F1 und NAT8-GFP R1. Für die Amplifikation des *AtNAT12* Konstruktes, welches die gesamte Länge der cDNA beinhaltete, wurden die Primer NAT12-GFP F1 und NAT12-GFP R2 benutzt. Für das kürzere potentielle Transitpeptid wurden Primer NAT12-GFP F1 und NAT12-GFP R1 genommen (siehe Tabelle 3).

Primer für *AtAzg1*: Für die Amplifikation des *AtAzg1* Konstruktes, welches die gesamte Länge der cDNA beinhaltete, wurden die Primer Azg1-GFP F1 und Azg1-GFP R2 benutzt. Für das kürzere potentielle Transitpeptid wurden Primer Azg1-GFP F1 und Azg1-GFP R1 genommen (Tabelle 3).

Der pGWB5-Vektor verleiht transformierten *E. coli* nach der LR-Reaktion eine Kanamycin- und Hygromycin -Resistenz. Das *ccdB*-Gen (Lethalitätsgen) in der Gateway-Kassette wird nach einer erfolgreichen LR-Reaktion durch das gewünschte Konstrukt ersetzt, so daß nur einwandfreie Konstrukte auf der LB-Platte wachsen. Klonierungen mit GATEWAY-Vektoren wurden nach Protokoll des Herstellers durchgeführt, auch wurden die dort angegebenen Chemikalien benutzt (Invitrogen, Carlsbad, Californien, USA). Die Sequenz des Fusionskonstruktes wurde durch eine Sequenzierung überprüft.

4.3. Herstellung der *AtAzg1*-überexprimierenden Pflanzenlinien

AtAzg1 in der gesamten Länge des kodierenden Bereiches (Primer forward (*AtAzg1*SmaI-F): 5'-ATCCCGGGATATGGAGCAACAGCAACAACAACA ACTA-3', Primer reverse (*AtAzg1*XbaI-R): 5'-AGTCTAGACTAAACGGTAGTATCAATCTCACTA-3') wurde mit der Pfx-Polymerase amplifiziert und in pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, Vektorkarte siehe Anhang) kloniert. Nach Isolierung der Plasmid-DNA wurde diese mit SmaI und XbaI geschnitten und in pGreenII kloniert. Der modifizierte pGreenII-Vektor (Vektorkarte siehe Anhang) hat einen *CaMV-35S*-Promotor und, zusätzlich zur Kanamycin-Resistenz in Bakterien, eine BASTA-Resistenz in Pflanzen (Abbildung 8). *A. thaliana* Col0 WT-Pflanzen wurden mit dem fertigen Konstrukt transformiert und mit BASTA selektiert. Homozygote Linien der T3-Generation wurden in verschiedenen Versuchen eingesetzt.



Abbildung 8: Klonierung 35S::Azg1 in pGreen II

Der modifizierte Vektor pGreenII zur Pflanzentransformation führt zu einer Kanamycin-Resistenz in *E. coli* und zu einer BASTA-Resistenz in *A. thaliana*. pGreen II besitzt einen *CaMV-35S*-Promotor vor der Multiple Cloning Site und dem Octopin-Synthase-Terminator (gesamte Kassette aus dem pBinAR Vector (Bevan *et al.*, 1984) in pGreenII zwischen EcoRI und HindIII-Schnittstellen eingefügt). Dies führt zu einer *CaMV-35S* getriebenen Translation der eingefügten Sequenz (hier in grün: kodierender Bereich des *AtAzg1*-Gens, 1740 bp). Gezeigt ist die von Agrobakterien bei einer erfolgreichen Transformation in das Pflanzengenom eingeführte T-DNA mit den flankierenden Right-Border (RB) und Left-Border (LB) Segmenten.

5. Mikroskopie und Dokumentation

Folgende Geräte wurden verwendet:

- Binokulare: Nikon SMZ-U
- Mikroskope: Nikon Eclipse E800
- Filter: **GFP (R)** – **BP** EX 460-500 DM 505 BA 510-560

Dokumentation der mikroskopischen Aufnahmen:

- 1-CCD Farbvideokamera (KY-F1030; JVC, Singapore) bedient durch das Software-Paket DISKUS (Technisches Büro Hilgers, Königswinter, D)
- Kamera für normale Aufnahmen: Digitale Kamera Nikon Coolpix 995

6. Internetadressen

NCBI Homepage	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NCBI Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast
GABI-Kat Einrichtung	http://www.gabi-kat.de/
TAIR	http://www.arabidopsis.org
Genevestigator	https://www.genevestigator.ethz.ch/
Aramemnon	http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/
The Arabidopsis Book	http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/
MIPS	http://mips.gsf.de/proj/thal/db/
SIGnAL (T-DNA Insertionslinien)	http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress
pGreen	http://www.pgreen.ac.uk
Arabidopsis Knockout facility, Wisconsin (Ws)	The Arabidopsis Knockout Facility ceased operations August 15, 2004 due to loss of NSF funding.
TransportDB	http://www.membranetransport.org
COG-Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG

7. Software

- Primer3 (Software für Primerdesign) frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer
- ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997)
- TreeView 1.1.6 (Page, 1996)
- MegAlign (Power Macintosh 3.1.7. DNA Star Inc. 1993-1998)
- phylogenetische Analyse (PAUP 2.0)
- DNA-Styler 1.2

III. ERGEBNISSE

1. Nähere Charakterisierung der Nukleobase- Ascorbat Transporter (NAT) und Azg- Familie aus *Arabidopsis thaliana*

1.1 Phylogenetische Analyse von *A. thaliana* NAT- und Azg-Genen

Das komplettierte *A. thaliana* Genomsequenzierungsprojekt öffnete den Weg für die Analyse von Genfamilien und deren funktionelle Charakterisierung (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Nukleobase-Ascorbat Transporter Gene aus *A. thaliana* (Columbia 0) wurden durch eine Blast Suche der nicht-redundanten NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>) aufgrund von Sequenzähnlichkeiten mit der Aminosäuresequenz des Vitamin C Transporters 1 der Ratte (*Rattus norvegicus*) (*RnSVCT1*; AF080453) und des Purin Transporters Leaf permease 1 (*ZmLpe1*; U43034) aus *Zea mays* (Schultes *et al.*, 1996) identifiziert.

Die Proteinsequenz des kürzlich näher charakterisierten Purin Transporters *AzgA* von *Aspergillus nidulans* (Cecchetto *et al.*, 2004) wurde benutzt, um homologe Proteine in Pflanzen zu identifizieren. Eine BLAST Suche (blast 2.2.15) in der NCBI-Datenbank brachte zwei Sequenzen im *A. thaliana* Genom hervor, die 35 % und 36 % Ähnlichkeit zu *AzgA* von *Aspergillus* aufweisen. Sie wurden als *AtAzg1* (At3g10960) und *AtAzg2* (At5g50300) benannt.

AtNAT und *AtAzg1* wurden zunächst gemeinsam in einem phylogenetischem Stammbaum dargestellt (Abbildung 9) um eine Einordnung zu ermöglichen. Die phylogenetische Analysen der zugehörigen Aminosäuresequenzen wurde mit dem Programm ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) durchgeführt, der phylogenetische Baum wurde mit dem Programm TreeView 1.1.6 (Page, 1996) oder PAUP 2.0 dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, daß die *Azg*-Transporter-Familie einen eigenständigen Ast in diesem phylogenetischen Stammbaum darstellt, der jedoch die Verwandtschaft zur NAT-Familie erkennen läßt.

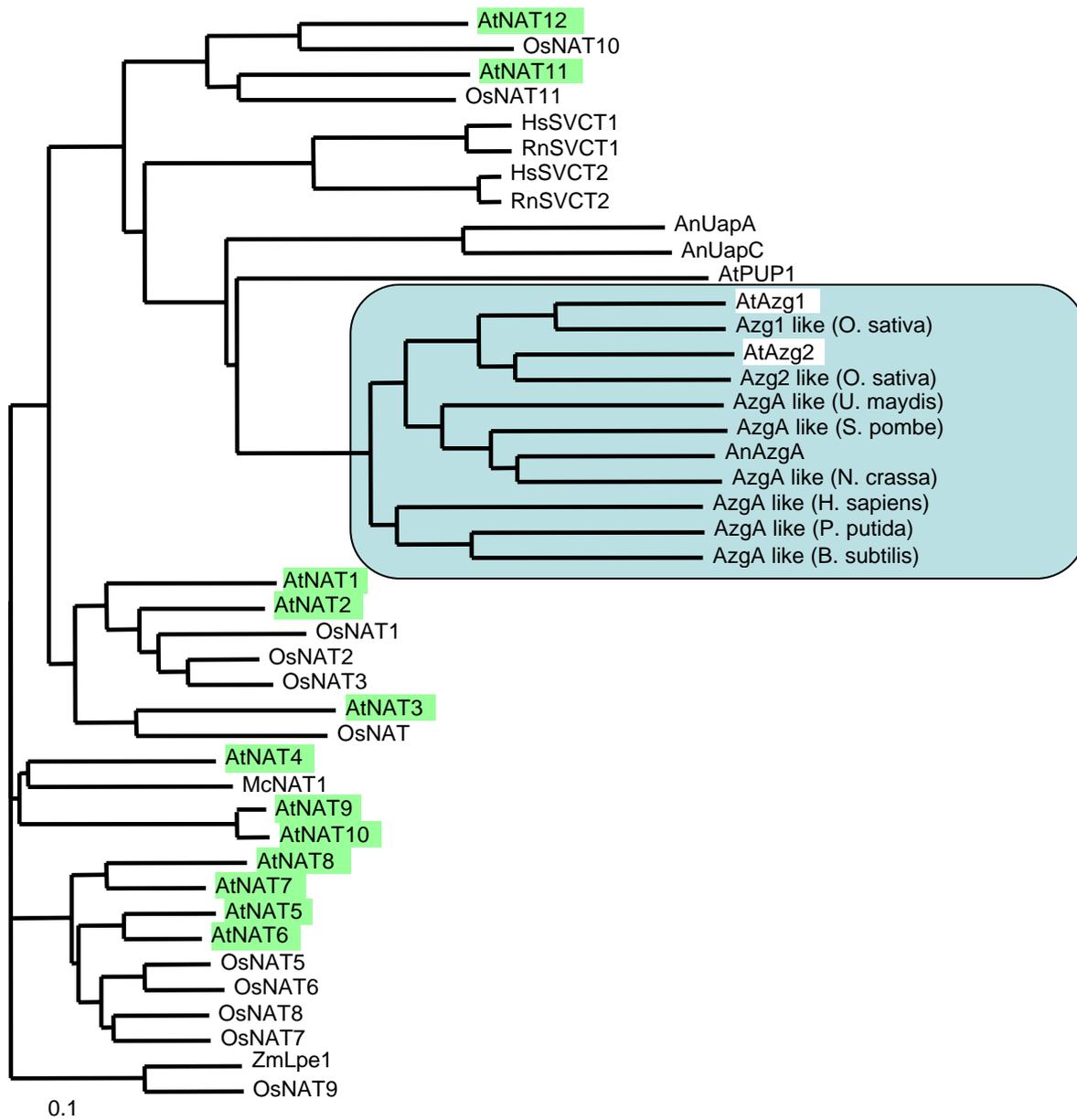


Abbildung 9: Phylogenetischer Stammbaum von Nucleobase-Ascorbat Transportern (NAT) und der Verwandtschaft zu Mitgliedern der Azg-Transporter-Familie. Der Balken gibt die strukturelle Ähnlichkeit zwischen zwei Proteinen, ausgehend von der Aminosäuresequenz, in % an.

1.2 Die Struktur der *AtNAT*-Familie

Insgesamt wurden 12 Gene gefunden, die möglicherweise für NAT-Proteine in *A. thaliana* kodieren (*AtNAT1-12*, Tabelle 4 und Abbildung 9, Abbildung 10). Zusätzlich enthält die NCBI-Datenbank cDNAs aus *Oryza sativa* (OsNAT1 bis -11; Yu *et al.*, 2002; <http://tigrblast.tigr.org/>), aus *Zea mays* (AAB17501), aus *Mesembryanthemum crystallinum* (AF069322), aus Baumwolle (AAT64019) und aus Tomate (AAX73299), die alle für NAT-Proteine kodieren

(siehe Abbildung 9 und 10). Alle hier aufgelisteten Gene sind stark hydrophob, womit sie eine typische Eigenschaft von Membranproteinen aufweisen. Vorhersageprogramme nehmen jeweils zwischen 10-14 Transmembranspannen für die korrekt inserierten fertigen Proteine an. Der in der Graphik angegebene Balken zeigt als Längenmaß die prozentuale Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der Proteine an (Abbildung 9). Proteine mit einer starken prozentualen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz sind möglicherweise duplizierte Gene, die sich im Laufe der Evolution auseinanderentwickelt haben und, je stärker sie voneinander abweichen, mit der Zeit verschiedene Aufgaben übernommen haben. So zeigen z.B. NAT9 und NAT11 mit 29 % die geringste Aminosäuresequenzübereinstimmung (ARAMEMNON, <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>), und NAT5 und NAT6 mit 84 % die höchste Aminosäuresequenzübereinstimmung unter den *AtNATs*. Zwischen NAT11 und NAT12 beträgt die Aminosäuresequenzübereinstimmung 49 %, zwischen NAT7 und NAT8 77 % und zwischen NAT9 und NAT10 78 %.

Abbildung 10 zeigt alle bekannten Proteine der pflanzliche *NAT*-Familie und zusätzlich einige Vertreter anderer Gruppen (Pilze, Säugetiere). *ZmLpe1* aus Mais (*Zea mays*), in grün hervorgehoben, ist bisher der einzige pflanzliche Vertreter der *NAT*-Familie, bei dem die Transporteigenschaften erfolgreich untersucht wurden (siehe Einleitung 3.2). Anhand der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz lassen sich die pflanzlichen *NAT*-Proteine in fünf Subfamilien innerhalb des phylogenetischen Stammbaums einteilen. Innerhalb einzelner Subfamilien bietet sich durch die Art der Verzweigung des Baumes teilweise eine Aufteilung in Untergruppen an. Die 11 *NAT*-Gene des Reis-Genoms (*OsNAT1* bis *OsNAT11*; Yu *et al.*, 2002) lassen sich, wie auch die 12 *NAT*-Gene aus *A. thaliana*, den verschiedenen Subfamilien zuordnen. Interessanterweise gibt es für einige *NAT*-Proteine stark homologe Proteine in Reis, so daß diese eng zusammen gruppieren (z. B. *AtNAT2/OsNAT1*; *AtNAT3/OsNAT4*; *AtNAT6/OsNAT6*; *AtNAT11/OsNAT11*; *AtNAT12/OsNAT10*).

AtNAT1, *AtNAT2* und *AtNAT3* befinden sich zusammen mit *OsNAT1*, -2, -3 und -4 in Subfamilie I. *AtNAT4*, *AtNAT9* und *AtNAT10* bilden mit *McNAT* (*Mesembryanthemum crystallinum*, die Eispflanze) die Subfamilie II. In der dritten Subfamilie befinden sich *AtNAT5*, -6, -7 und -8, sowie *OsNAT5*, -6, -7, und -8. In Subfamilie IV ist kein Vertreter der *NATs* aus *A. thaliana*. Subfamilie IV besteht aus *ZmLpe1* und *OsNAT9* aus Reis. *AtNAT11* und *AtNAT12*, sowie *OsNAT10* und *OsNAT11* bilden Subfamilie V und sind, was die prozentuale Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der Proteine betrifft, etwas

abgesetzt von den übrigen Subfamilien. Dafür ist hier offensichtlich die Verwandtschaft zu den NATs der Säugetiere (Mensch und Ratte) als auch der NATs aus *Aspergillus* (*AnUapA* und *AnUapC*) größer, vorausgesetzt, man setzt diese Verwandtschaft gleich mit der prozentualen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz. Die Ähnlichkeit der pflanzlichen NAT-Proteine zu den tierischen Vitamin C Transportern, bzw. den Nukleobase Transportern aus *Aspergillus nidulans* beträgt nur 30-35%, bzw. weniger als 20% (Diallinas *et al.*, 1995; Tsukaguchi *et al.*, 1999).

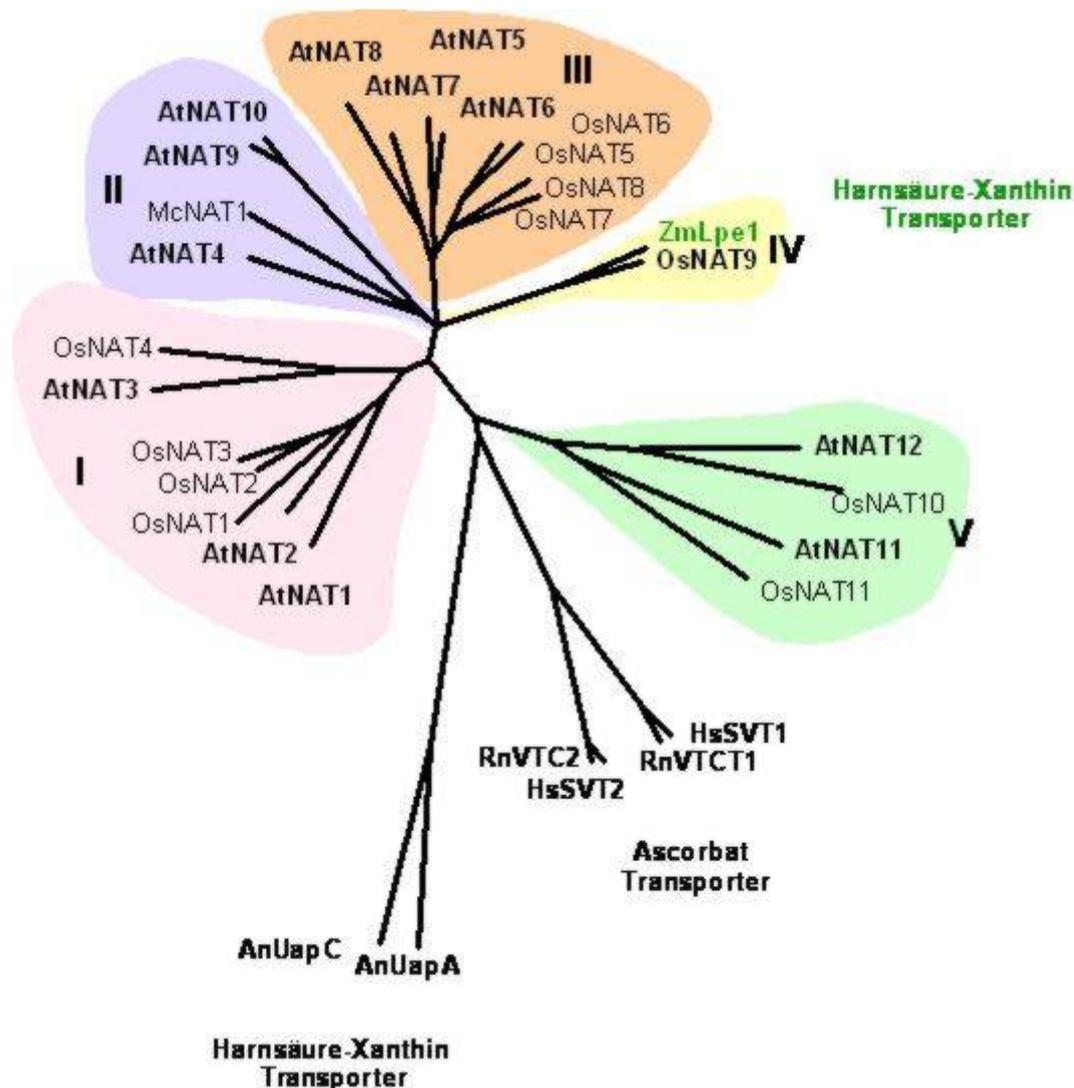


Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum der Nukleobase-Ascorbat Transporter.

Der phylogenetische Stammbaum basiert auf den Proteinsequenzen von NATs aus Pflanzen (*At*, *Arabidopsis thaliana*; *Os*, *Oryza sativa*; *Zm*, *Zea mays*; *Mc*, *Mesembryanthemum crystallinum*), Menschen (*Hs*, *Homo sapiens*), Tieren (*Rn*, *Rattus norvegicus*) und Pilzen (*An*, *Aspergillus nidulans*). Das Alignment der Aminosäuren wurde mit ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) durchgeführt, die Darstellung des phylogenetischen Baumes mit TreeView 1.1.6 (Page, 1996).

```

At2g05760.1 -----MAEISH-----
At5g62890.1 -----MAGGG-----APA
At1g49960.1 -----MA-----
At1g60030.1 -----MAGGGGGGGVAPP-----
At2g26510.1 -----MVETGHHHQHPAP-----
At2g27810.1 MSSSDPKPGKPGWPPTPEAAMPSSWAKKTGFRPKFSGETTATDSSSQSLPVRRAKQQTQPDLEAGQTRLRPPPP
eq

At2g05760.1 -----PPMEQ-----
At5g62890.1 PKADEP-----QHPPPKQD-----
At1g49960.1 TKTDDF-----APFPVKDQ-----
At1g60030.1 LKHGDL-----EPHPVKDQ-----
At2g26510.1 AAAGHPP-----VPSMAMARNMGTWPPAEQ-----
At2g27810.1 VSAAVTNGETDKKKEKPPPPPPGSAVAVPVKQDPVKRRRSDSGVGRSNGPDGANGSGDPVRRPGRIEETVEVLPQSMDD
eq
* *

At2g05760.1 -----LQDLEYCIDSNPPWPETVLLAFQNYILMLGTSAFIPALLVPAMGGSDGDRAFVIQTLFLVAGIKTLLQALFGTRI
At5g62890.1 -----LPNISYCIITSPPPWPEAILLGFQHYLVMGLGTTVLIPTALVPQMGGGYEKAKVIQTLFLVAGINTLLQTLFGTRI
At1g49960.1 -----LPGVEFCVSSSNWPEGIVLGFQHYIVMLGTTVIIP SILVPLMGGGDVEKAVINTVLFVSGINTLLQSLFGSRI
At1g60030.1 -----LSSIYCIITSPPPWPEAILLGFQHYLVMGLGTTVLIPTYLVPQMGGGNEEKAKMVQTLFLVSGINTLLQSLFFGTRI
At2g26510.1 -----LHHLYCIIHNSPNSWHEVTVLAFQHYIVMLGTTVLIANTLVSPMGDPGDKARVIQTLFMGINTLLQTLIGTRI
At2g27810.1 DLVARNLHMKYGLRDTPLVPIGFYGLQHYLSMLGSLILVPLVIVPAMGGSHHEEVAVVSTVLFVSGINTLLHTSFSRL
eq
* * * * *

At2g05760.1 PAVVGGSLAYVVP IAYI INDSLQKISNDHERFIHTMRAIQGALIVASSIQIILGYSQVWGLFSRFFSPLGMAPVVGVLV
At5g62890.1 PAVVGASYTFVPTTISIILSRGFSDTSNPIDRFERIMRATQGALIVASTLQMLGFSGLWRNVVRFSPISAVPLVGLV
At1g49960.1 PVMGASAYALIPALYITFSYRFTTYLHPLHRFEETMRAIQGALIIASISHMIMGFFGLWRLLVRFLSPLSAAPLVIITG
At1g60030.1 PAVIGGSYTYVPTTSLIILAGRYSDILDPOEKFRKIMRGIQGALIVASILQIVVGFSGLWRNVVRLSPLSAAPLVALAG
At2g26510.1 PTVMGVSFAYVLPVLSIIRDYNNQDFDSEKQFRHRTMRTVOGSLIISFVNIICYGQAWGNLIRIFSPIIVPVVSVS
At2g27810.1 PTLIQGSPFVFLAPALAIINSEPFQGLNGNANNKHIMRELOGAIIGSAFQAVLGYSGLSMLILRLVNVVVVAPTVAAG
eq
* * * * *

At2g05760.1 LGMFQRGFQGLGNCIEIGLPELLLVIIGLTQYLKHVRPFKDVPIFERFPILICVTIIVWIYAVILTASGAYRGG--PSLTQH
At5g62890.1 FGLYEFQFPVAKCIEIGLPELLLIVFVSQYLPHVIKSGKN-VDFRFAVIFAVVIIVWYAHLLTVGGAYNGA--APTTQT
At1g49960.1 VGLLAFAPQLARCIEIGLPAIILIIILSQYLPHLFCCKRS-ICEQFAVLFTIAIVWAYAEILLTAAGAYDKR--PDNTQL
At1g60030.1 FGLYEHGFPLLAKCIEIGLPEIILLLLFQOYIPLHIRGERQ-VFHRFAVIFSVVIVWYAHLLTVGGAYKNT--GVNTQT
At2g26510.1 LGLFLRGFPLLANCVEIGLPLMLILLITQYLKHAFSRISM-ILERYALLVCLAIWAFAAILLTVSGAYNNV--STATKQ
At2g27810.1 LSFYSGFPLVKGCLEIGVVQILLVIFALYLRKISVLSHR-IFLIYAVPLSLAITWAAAFLLTETGAYTYKGCDDPNVPV
eq
* * * * *

At2g05760.1 S-----CRTDKANLISTAPWFKFPYPLQWGPPTFVGHSFAMMSAVLVSMVESTGAYIAASRLAIATPP
At5g62890.1 S-----CRTDRAGTIGAPWIRVWPFPQWAPSFDAGEAFAMMASFVALVESTGAFVAVSRYASATML
At1g49960.1 S-----CRTDRSGLISAPWVRIIPYPLQWGRPSFHGSDAFAMMAATYVAIVETGSGFIAASRFGSATHI
At1g60030.1 S-----CRTDRSGLISGSPWIRVVPYFQWGPPTFHAGEAFAMMAVSVLSLESTGYIIVSRLASATPP
At2g26510.1 S-----CRTDRAFLMSSAPWIRIPYFQWGTPIFKASHVFGMFGAAIVASAESTGVFFAASRAGATAP
At2g27810.1 SNVVSTHCRKYMTRMKYCRVDTSHALSSAPWFRFPYPLQWGVPLFNWKMFAVMCVSVSIVASVDSVGSYHASSLLVASRPP
eq
* * * * *

At2g05760.1 PAYVLSRIGIGWQIGVLLDGLFGTGTGSTLVLENVGLLGLTRVGSRRVVQVSAGFMIFVSTLIGKFGAVFASIPVPIYAAAL
At5g62890.1 PPSILSRIGIGWQVAILISGLFGTGTAGSSVSVENAGLLALTRVGSRRVVQIAAGFMIFFSIIGKFGAVFASIPAPIIAAL
At1g49960.1 PPSVLSRIGIGWQIGVLLNGLFGTATGTSTLVENTGLLGLTKVGSRRVVQISAGFMIFFSIHGKFGAVLASIPLPIFAAL
At1g60030.1 PAVVLSRIGVWQGVGVLCCGLFGAGNCAVSVENAGLLALTRVGSRRVVQISAGFMIFFSIIGKFGAIFASIPAPVVAAL
At2g26510.1 PAHVVSRSIGLQIGVLLLEGI FGSIITGNATLVENVGLLGLTRVGSRRVVQVSTFFMIFFSIHGKFGAVFASIPLPIFAGV
At2g27810.1 TRGVVSRRAIGLEGFTSVLAGLWGTGTGSTLTENVHTIAVTKMGSRRVVELGACVVLVIFSLVIGKVGGLFASIPQVMVASL
eq
* * * * *

At2g05760.1 HCLIFGLVAAGLSFLQFTNMNSMRNIMITGLSLFLGISIPQFFAQY-----WDRHYGLVHTNAGWFN
At5g62890.1 YCLFFAYVAGGLSFLQFCNLNSFRTKFILGFSVFLGLSIPQYFNEY-----TAIKGYGPVHTGARWFN
At1g49960.1 YCVLPAYVASAGLGLLQFCNLNSFRNKFILGFSIFIGLSVAQYFTEY-----LFTSGRGPVHTRTSAFN
At1g60030.1 HCLFFAYVAGGLSLLQFCNLNSFRTKFILGFSVFMGLSIPQYFNQY-----TAVNKYGPVHTHARWFN
At2g26510.1 YCILLGIVVAVGISFIQFTDNTSMRNMVYIGVSLFLSLSIAQYFLAN-----TSRAGYGPVRTAGWFN
At2g27810.1 LCFMWAMFTALGLSNLRYSEAGSSRNIIIVGLSLFFLSLVPAYPQQYGISPNSNLSVPSYQPIYVSSHGPFKSQYKGMN
eq
* * * * *

At2g05760.1 AFLNLTFLMSPATVGLI IAVFMDNTMEVERS-KKD-RGMPWVKFRTRFRGDNRNEEFYTLFNLNRFPPPT-----
At5g62890.1 DMVNVFSSSEPFVAGSVAFFLDNTLHKKDSIRKDRGKHWWDKFRSFKGDRSEEFYSLPFLNKNYFPSV-----
At1g49960.1 VIMQVIFSSAATVGIIMAAFLDCTHSYGHASVRSDSGRHWEKFRVYHTDTRTEEFYALPYLNLRFFPSF-----
At1g60030.1 DMINVPFSSKAFVAGILAFPLDVTMSKSDSATRDRGMFVWDRFMSFKSDTRSEEFYSLPFLNKNYFPSV-----
At2g26510.1 DILNTIFASAPLVATILATILDNTLEARHA-SDDARGIPWVKPFQHRNGDGRNDEFYSMLPILINELMPTRF-----
At2g27810.1 YVMNLTLLSMVMVIAFIMAVILDNTV-----GSKQERGYYVWSDSETATREPALAKDYELPFRVGRFRRVWKVGI
eq
* * * * *

```

Abbildung 11: Alignment von Aminosäuresequenzen einiger *AtNAT*-Mitglieder. Alignment zwischen verschiedenen Mitgliedern der *NAT*-Familie aus *A. thaliana*. Rote Buchstaben kennzeichnen Bereiche potentieller Transmembranspannen, violett eingerahmter Bereich: *NAT*-Erkennungssequenz, grün gestrichelt: die übrigen 4 stark konservierten Bereiche der *NAT*-Familie. At2g05760 (*AtNAT1*); At5g62890 (*AtNAT6*); At1g49960 (*AtNAT4*); At1g60030 (*AtNAT7*); At2g26510 (*AtNAT3*); At2g27810 (*AtNAT12*). Alignment von ARAMEMNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>).

Sequenzvergleiche haben gezeigt, daß NAT-Proteine deutlich fünf Regionen mit einer hohen Ähnlichkeit aufweisen (Abbildung 11, grün gestrichelt umrahmte Bereiche und violett umrahmter Bereich). Zusätzlich gibt es, wie bereits in der Einleitung erläutert, eine stark konservierte Aminosäuresequenz zwischen den Transmembranspannen 9 und 10, das sogenannte „NAT signature motif“ [(F/Y/S)X(QE/P)NXGφφXφT(K/R/G)] (siehe Abbildung 11, violett umrahmter Bereich).

In den Purin Transportern von *A. nidulans* UapA und UapC liegt dieses Motiv in einer Proteinregion, die kritisch für die Substraterkennung ist (Diallinas et al., 1998; Koukaki et al., 2005). Die Proteine AtNAT11 und AtNAT12, OsNAT10 und OsNAT11, unterscheiden sich hier von den anderen NAT-Proteinen, weil sie innerhalb dieses Motivs an Position 4 im Gegensatz zu dem konservierten Glycin einen Histidinrest besitzen. Zwischen den die Membran durchlaufenden Helices VII und VIII, sowie XII und XIII, haben die vorher genannten NAT-Proteine in der hydrophilen Schleife zwei zusätzliche Aminosäurereste eingefügt, und zwar an Stelle 18 und 15. Zusätzlich ist in Abbildung 11, in der beispielhaft 6 der 12 Nucleobase/Ascorbat-Transporter von *A. thaliana* für ein Alignment ausgewählt wurden, zu sehen daß es viele Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz untereinander gibt, wenn auch nicht für alle sechs Proteine gemeinsam. Auch die potentiellen Transmembrandomänen sind sehr ähnlich angeordnet (rote Buchstaben geben den Bereich potentieller Transmembranspannen an).

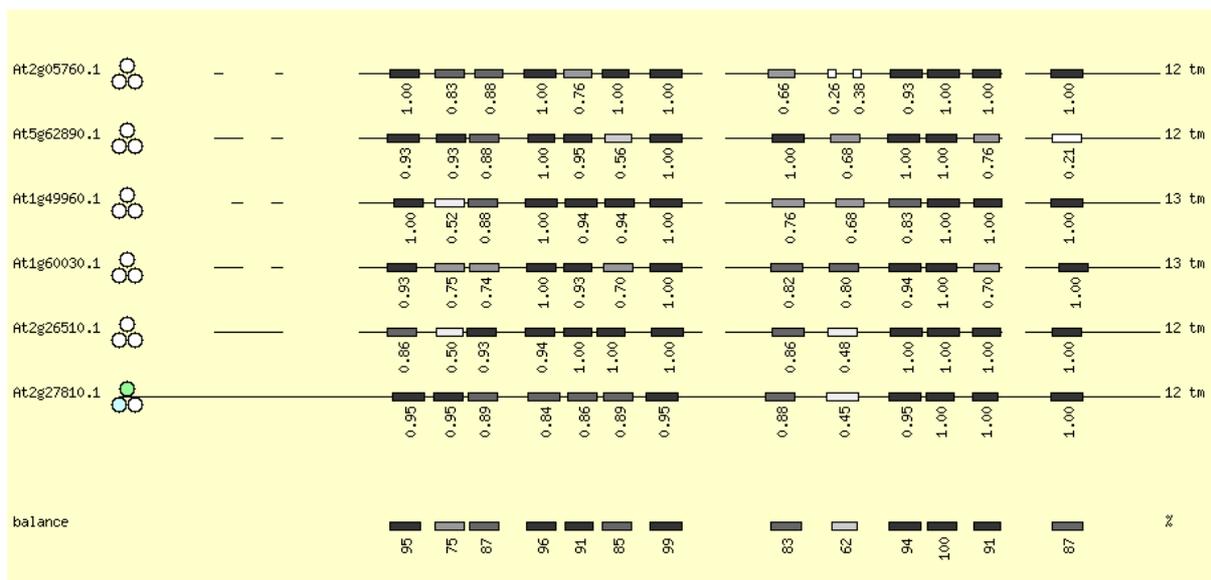


Abbildung 12: Vergleich der putativen Transmembrandomänen von einigen *AtNAT*-Mitgliedern.

Vergleich zwischen verschiedenen Mitgliedern der *NAT*-Familie aus *A. thaliana*. Die grauen Kästchen geben die potentiellen Transmembrandomänen an, je dunkler das Grau, desto höher die Wahrscheinlichkeit. Die Zahlen unter den Kästchen geben die Wahrscheinlichkeit in Zahlen an. At2g05760 (*AtNAT1*); At5g62890 (*AtNAT6*); At1g49960 (*AtNAT4*); At1g60030 (*AtNAT7*); At2g26510 (*AtNAT3*); At2g27810 (*AtNAT12*). Vergleich der Transmembrandomänen nach ARAMEMNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>).

Die NAT-Proteine sind alle sehr stark hydrophob. Die Anzahl der wahrscheinlichen Transmembrandomänen wurde mit neun verschiedenen Programmen vorhergesagt. Da sich die Anzahl der vorhergesagten Transmembrandomänen zwischen den individuellen Programmen voneinander unterschied, wurde aus den einzelnen Vorhersagen ein Konsenswert berechnet (Schwacke et al., 2003; <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/> und Rainer Schwacke, persönliche Mitteilung). Die AtNAT Proteine besitzen einen Konsenswert von 10 (AtNAT9) bis 13 (AtNAT4, -7, -8, und -10) Transmembrandomänen. AtNAT1, -2, -3, -5, -6, -11 und -12 besitzen demnach einen Konsenswert für 12 Transmembrandomänen. In Abbildung 12 sind die potentiellen Transmembrandomänen mit der zugehörigen Wahrscheinlichkeit beispielhaft für 6 von 12 AtNAT-Proteinen dargestellt.

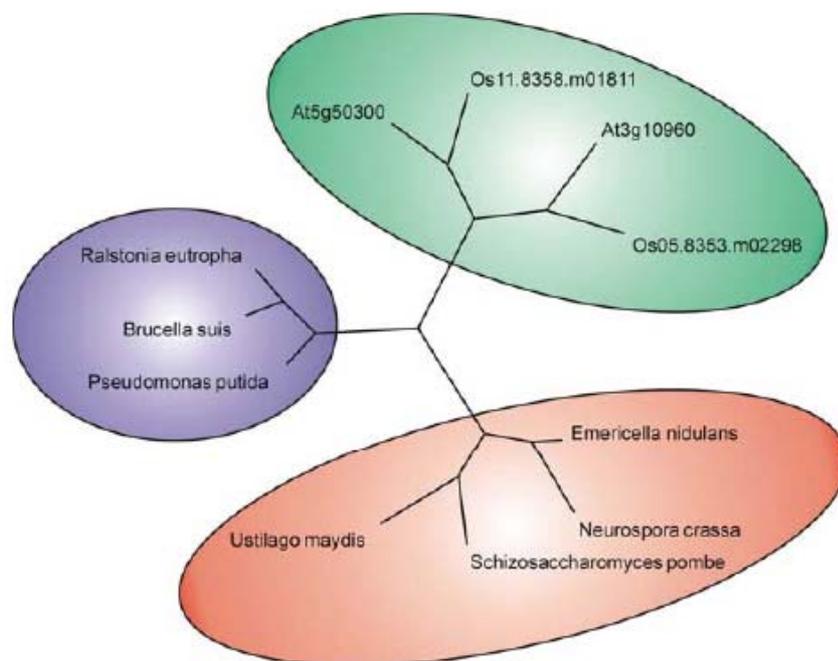


Abbildung 13: Phylogenetischer Stammbaum von *AtAzg1* und *AtAzg2*

Dargestellt ist der phylogenetische Stammbaum der Azg-Familie, basierend auf den Proteinsequenzen von Azgs aus Pflanzen (grün hinterlegt: *At*, *Arabidopsis thaliana*, *Os* *Oryza sativa*), Bakterien (blau hinterlegt) und Pilzen (rot hinterlegt). Die phylogenetische Analyse (durchgeführt mit PAUP 2.0) der Proteinsequenzen nach einem Alignment mit dem Programm MegAlign (Power Macintosh 3.1.7. DNA Star Inc. 1993-1998).

1.3 Die Struktur der *AtAzg*-Familie

Eine phylogenetische Analyse (Abbildung 13), basierend auf dem Alignment von verfügbaren Azg Proteinsequenzen in Gesamtlänge weist auf Mitglieder der Azg-Familie in Pflanzen (grün hinterlegt), Pilzen (rot hinterlegt) und Bakterien (blau hinterlegt) aus drei verschiedenen Gruppen hin. Diese Daten deuten auf eine gemeinsame Herkunft aller Pflanzenmitglieder hin.

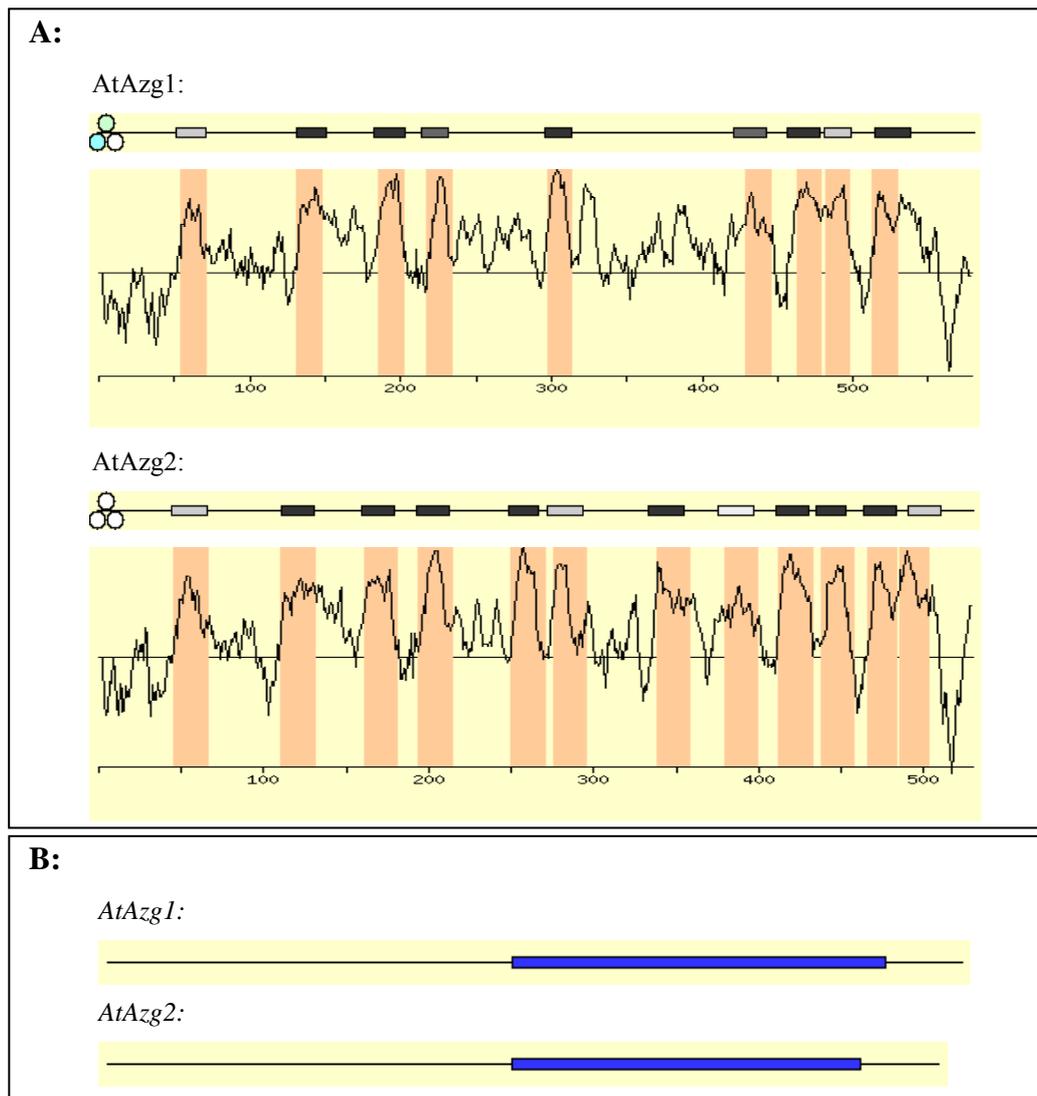


Abbildung 15: Vergleich der putativen Transmembrandomänen von *AtAzg*-Mitgliedern und Exon-Struktur. (A) Vergleich zwischen den beiden Mitgliedern der *Azg*-Familie aus *A. thaliana*. Die grauen Kästchen geben die potentiellen Transmembrandomänen an, je dunkler das Grau, desto höher die Wahrscheinlichkeit. Der Hydrophobizitätsgraph darunter gibt jeweils die Schwankungen in der Hydrophobizität in der gesamten Länge des Proteins an (Linie: Null; nach unten: hydrophil; nach oben: hydrophob). Die lachsfarbene eingefärbten Bereiche geben die potentiellen Transmembrandomänen an. At3g10960 (*AtAzg1*); At5g50300 (*AtAzg2*). (B) Exon-Struktur der *AtAzg*-Gene aus *A. thaliana*. Vergleich der Transmembrandomänen, Hydrophobizitätsgraphen und Darstellung der Exon-Struktur nach ARAMEMNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>).

Beim Vergleich der Hydrophobizitätsgraphen (Abbildung 15A) fällt eine starke Übereinstimmung zwischen *AtAzg1* und *AtAzg2* auf. Besonders der Bereich, bei dem in *AtAzg2* die 7. Transmembrandomäne vorhergesagt ist, unterscheidet sich jedoch stark von der vergleichbaren Sequenz in *AtAzg1* (ca. bei 350 Aminosäuren). Die beiden *Azg* Proteine aus *A. thaliana* sind sich in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich (Abbildung 14). Sie zeigen eine prozentuale Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz von 52 %.

2. Expressionsanalysen zur Bestimmung der Promotoraktivität

2.1 Gewebespezifische Expression der *AtNAT*-Gene (RT-PCR)

Durch RT-PCR konnte die gewebespezifische Expression der *AtNAT* Gene untersucht werden. Dafür wurde cDNA aus Blättern, Stängel, Blüten und Wurzeln von 6 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen gewonnen, die auf Erde angezogen wurden, und eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt (Abbildung 16; Primerkombinationen in Tabelle 1). Es wurden vier verschiedene Expressionsmuster zusammengefaßt: *AtNAT1*, -3, -6, -11 und -12 zeigten in allen untersuchten Gewebe eine etwa gleichstarke, hohe Expression. Eine generell geringere Expression in allen Geweben zeigten *AtNAT2*, -4 und -5, wobei die Expression in Blättern am niedrigsten war. *AtNAT 7 und -8* werden hauptsächlich in Blüten exprimiert. Für *AtNAT9* und -10 konnte in keinem der getesteten Gewebe Transkript festgestellt werden.

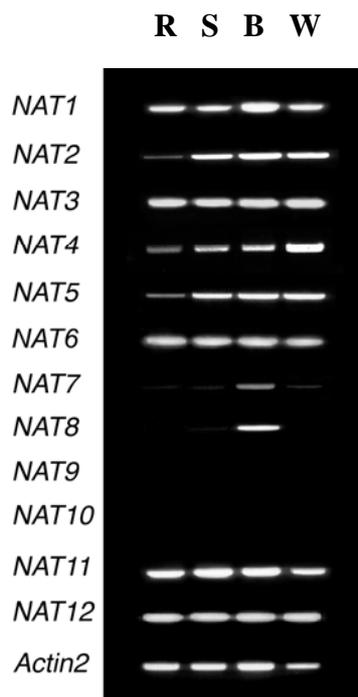


Abbildung 16: Expression der *AtNAT*-Familie in verschiedenen Geweben von sechs Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen. Semiquantitative RT-PCR mit cDNA von Rosettenblättern (R), Stängel (S), Blüten (B) und Wurzeln (W). Die Amplifikation der verschiedenen *AtNAT*-Fragmente wurde mit spezifischen Primern durchgeführt (siehe Tabelle 1)

2.2 Gewebespezifische Expression der *AtAzg*-Gene (RT-PCR)

Die Expressionsmuster von *AtAzg1* und *AtAzg2* wurden in verschiedenen Organen von *A. thaliana* durch semiquantitative RT-PCR analysiert (Primerkombinationen in Tabelle 1). Wie in Abbildung 17 gezeigt, konnte die Expression von *AtAzg1* in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden, allerdings stärker in Rosettenblättern, Blüten und Wurzeln. Für *AtAzg2*

konnte eine Expression in Blüten und Wurzeln nachgewiesen werden. Als Kontrolle für den Einsatz gleicher Mengen an cDNA wurde *Actin2* amplifiziert.

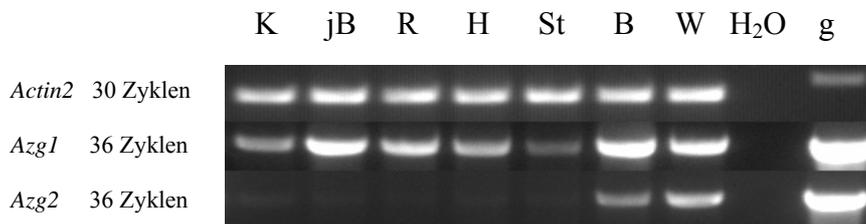


Abbildung 17: Expression der *AtAzg*-Familie in verschiedenen Geweben von sechs Wochen alten *A. thaliana* WT Pflanzen. Semiquantitative RT-PCR mit cDNA als Template von Kotyledonen (K), jungen Blättern (jB), Rosettenblättern (R), Hochblättern (H), Stängel (St), Blüten (B) und Wurzeln (W). Die Amplifikation der verschiedenen *AtAzg* Fragmente wurde mit spezifischen Primern durchgeführt (siehe Tab. 1) Die ca. 1,7 kb (*Azg1*), bzw. 1,6 kb (*Azg2*) großen Fragmente wurden in 36 PCR Zyklen von cDNA als Template amplifiziert. Als Kontrolle für gleiche eingesetzte Mengen an cDNA wurde ein 607 bp großes *Actin2*-Fragment in 30 Zyklen von der gleichen cDNA als Template amplifiziert.

2.3. Expressionsmuster der *pAtNAT-GUS* Pflanzen

Mit Hilfe des GUS-Reportergens wurde die gewebespezifische Aktivität der *AtNAT*-Promotoren in verschiedenen Entwicklungsstadien und Organen der Pflanzen untersucht. Die Klonierung der *Promotor::GUS*-Konstrukte, sowie die Herstellung der transgenen Pflanzen, ist in Material und Methoden 4.1 beschrieben. Die histochemische Analyse der GUS Aktivität wurde während der ersten zwei Wochen an Pflanzen durchgeführt, die steril auf Platten angezogen worden waren. Gewebe älterer Pflanzen wurde von auf Erde transferierten Pflanzen analysiert. GUS-Aktivität konnte in allen *AtNAT::GUS*-Linien, außer in den *AtNAT10::GUS*-Linien detektiert werden. Die Expression konnte gut mit der Einteilung der einzelnen *AtNATs* in die verschiedenen Subfamilien in Einklang gebracht werden, wie im Folgenden erläutert wird. Es konnte z.B. gezeigt werden, daß NAT Proteine die in der gleichen phylogenetischen Subfamilie und Untergruppe waren (Einteilung nach Abbildung 10) auch ähnliche Expressionsmuster bei der *GUS*-Expression hervorriefen.

2.3.1 *AtNATs* der Subfamilie I

Die GUS-Expression von Genen der Subfamilie I konnte für alle in Wurzelspitzen und in den Blattadern detektiert werden. Sowohl anhand der Expressionsmuster als auch anhand des phylogenetischen Baumes kann Subfamilie I in zwei weitere Untergruppen unterteilt werden. Die eine beinhaltet *AtNAT1* und *AtNAT2* und die andere *AtNAT3* (Abbildung 18). *AtNAT1* und *AtNAT2* zeigten sehr ähnliche Expressionsmuster, wobei *AtNAT2* während der Keimung noch

stärker exprimiert wurde als *AtNAT1*. Für beide Promotoren konnte die GUS-Aktivität in den Haupt- und Nebenleitbahnen von Kotyledonen und jungen Blättern und besonders stark im Apikalmeristem des Stängels nachgewiesen werden (Abbildung 18A). Dieses Expressionsmuster konnte auch in älteren Blättern und im Blattstiel gefunden werden (Abbildung 18D, K-L). Allerdings konnte die GUS-Expression in *AtNAT2* schon vier Tage nach der Imbibition (DAI, Abbildung 18F) in den Kotyledonen festgestellt werden, in *AtNAT1* erst nach 10 Tagen (Abbildung 18A). In den Wurzeln wurde die GUS Aktivität der beiden *NAT*-Promotoren in meristematischen Regionen, Wurzelspitze und lateralen Wurzelprimordia beobachtet (Abbildung 18B, C, I und J). *AtNAT1* ist nur schwach in reproduktiven Organen exprimiert. *AtNAT2* dagegen ist in sich entwickelnden Fruchtknoten exprimiert, die Expression geht mit der Reife des Fruchtknotens zurück (Abbildung 18E und M).

Die Expression von *AtNAT3* trat zuerst in 4 Tage alten Keimlingen am Apikalmeristem auf (Abbildung 18N) und dieses Expressionsmuster blieb in den folgenden zwei Wochen erhalten (Abbildung 18O). Später wechselt das Expressionsmuster und die GUS-Aktivität kann jetzt in Hauptleitbahnen der Rosettenblätter und Blattstielen gefunden werden (Abbildung 18R-T). In den Wurzeln war der *AtNAT3* Promotor im Zentralzylinder, in meristematischen Regionen, Wurzelspitzen und Wurzelprimordia aktiv (Abbildung 18P und Q). Die GUS-Expression konnte in Blütenknospen und in sich entwickelnden Fruchtknoten entdeckt werden. Diese Expression verschwand nach der Befruchtung (Abbildung 18U). Während der Embryogenese konnte eine schwache GUS-Aktivität in reifen Embryostadien beobachtet werden (Abbildung 18V).

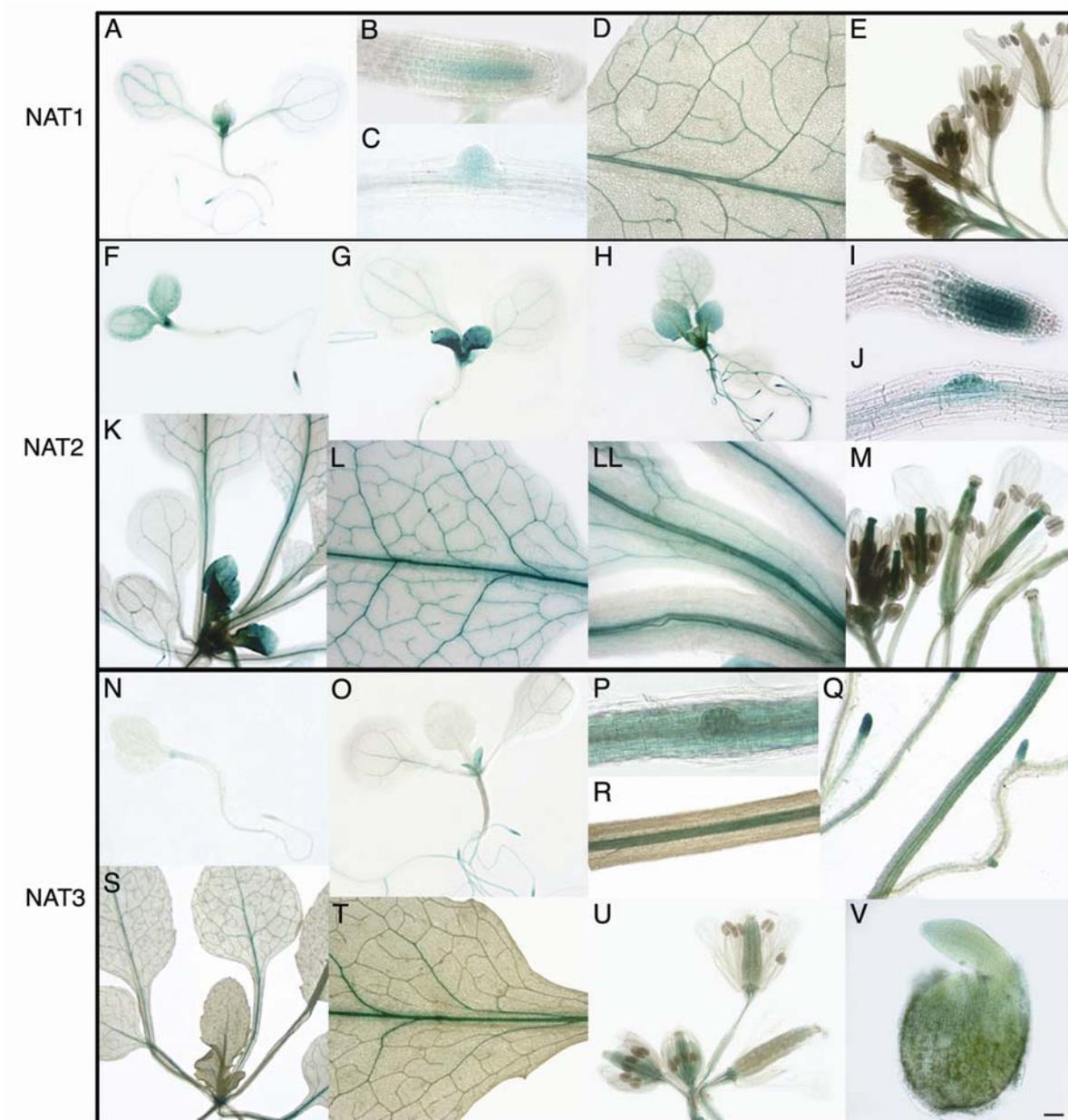


Abbildung 18: Expression der *AtNAT* Genfamilienmitglieder der Subfamilie I.

NAT1 (A) Keimlinge, 10 Tage nach Imbibition (DAI, days after imbibition), (B) Wurzelspitze, (C) Seitenwurzelprimordium, (D) Nahaufnahme der Blattoberfläche, (E) Blütenstand mit Blüten in verschiedenen Entwicklungsstadien.

NAT2 (F) Keimling, 4 DAI, (G) Keimling, 10 DAI, (H) zwei Wochen alter Keimling, (I) Wurzelspitze (J) Seitenwurzelprimordium, (K) drei Wochen alte Rosette, (L) Nahaufnahme der Blattoberfläche, (LL) Nahaufnahme des Blattstiels mit den Blattvenen, (M) Blütenstand mit Blüten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien.

NAT3 (N) Keimling, 4 DAI, (O) Keimling, 12 DAI, (P) Nahaufnahme einer Wurzel mit Seitenwurzelprimordium, (Q) Wurzelsystem, (R) ältere Wurzel, (S) drei Wochen alte Rosette, (T) Nahaufnahme der Blattoberfläche, (U) Blütenstand mit Blüten in verschiedenen Entwicklungsstadien, (V) reifer Embryo. Der Balken entspricht 50 µm.

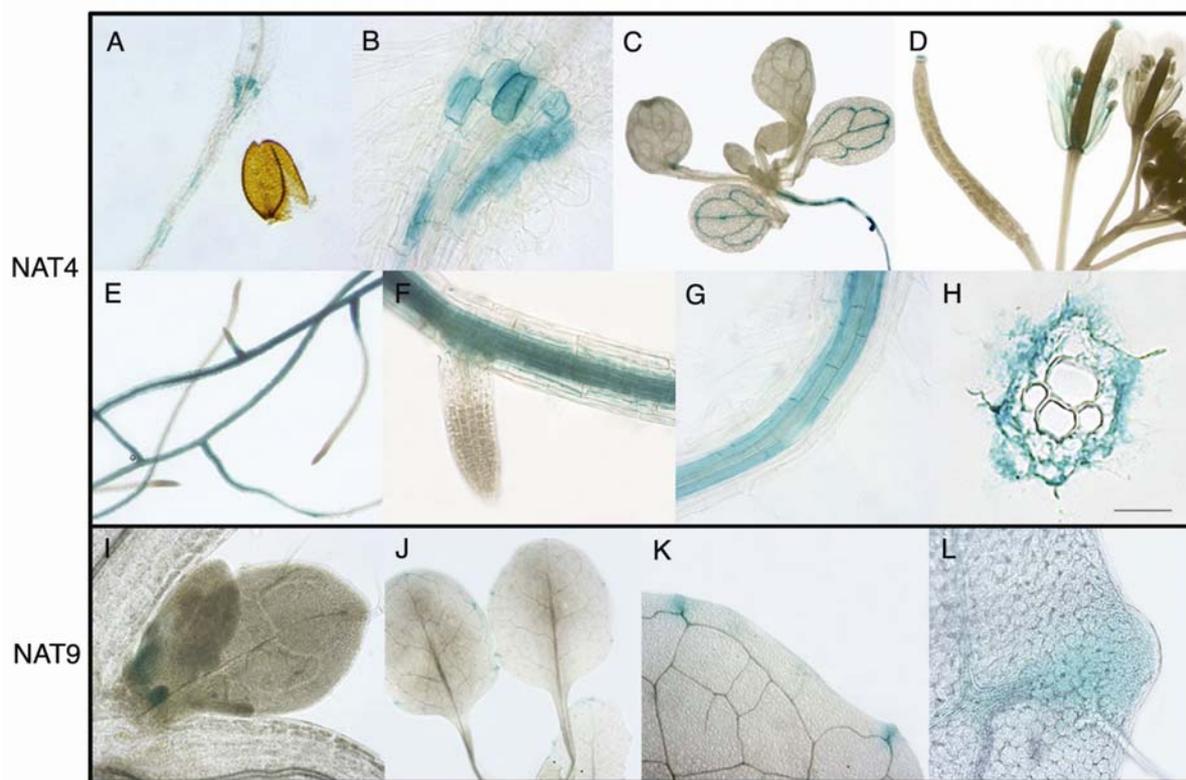


Abbildung 19: Expression der *AtNAT* Genfamilienmitglieder der Subfamilie II.

NAT4 (A) Wurzel eines Keimlings, 4 DAI, (B) Nahaufnahme der embryonalen Wurzelzone, (C) zwei Wochen alter Keimling, (D) Blütenstand mit Blüten in verschiedenen Entwicklungsstadien, (E) Wurzelsystem, (F) Nahaufnahme einer Wurzel mit sich entwickelnden Seitenwurzel, (G) Nahaufnahme der Wurzelhaarzone, Expression im Zentralzylinder, (H) Querschnitt durch G. Der Balken entspricht 50 μ m.

NAT9 (I) Apikalmeristem mit GUS-Expression in den sehr jungen Stipeln, (J) ausgewachsenes Blatt mit Expression in den Hydathoden, (K) Nahaufnahme der Blattoberfläche, (L) Expression in den Hydathoden.

2.3.2 *AtNATs* der Subfamilie II

Die Gene der SubfamilieII zeigen kein gemeinsames Expressionsmuster. Die Subfamilie II wird nach dem phylogenetischen Stammbaum (Abbildung 10) in zwei Untergruppen unterteilt. In der ersten ist *AtNAT4*, in der anderen die beiden sehr nah verwandten Proteine *AtNAT9* und *AtNAT10* (92% Ähnlichkeit). Wegen dieser hohen Ähnlichkeit der beiden Proteine konnten diese nicht separat in Microarrays analysiert werden (<http://www.genevestigator.ethz.ch/>; Zimmermann et al., 2004).

Die durch *AtNAT4*-Promotor gesteuerte GUS-Expression konnte vier Tage nach der Quellung in einigen Zellen des Wurzelapikalmeristems und in einigen isolierten Zellen der Elongationszone entdeckt werden (Abbildung 19A und B). In zwei Wochen alten Keimlingen ist die GUS-Expression in der Wurzel besonders stark im gesamten Zentralzylinder der

Wurzel zu beobachten (Abbildung 19C und E). In den meristematischen Regionen und sich entwickelnden sekundären Wurzeln war keine Expression mehr zu sehen. Dieses Expressionsmuster blieb während der folgenden Entwicklung erhalten (Abbildung 19F und H). *AtNAT4*-Promotoraktivität konnte zu einem späteren Zeitpunkt in Blütenorganen beobachtet werden, und zwar in den Filamenten der Staubbeutel und an der Narbe des Fruchtknotens nach der Bestäubung, außerdem in in der Entwicklung befindlichen Schoten (Abbildung 19D).

Die Expression des *AtNAT9*-Promotors wurde nur in sehr speziellen Regionen wie den Stipeln im Apikalmeristem (Abbildung 19I) und in den Hydathoden von sich entwickelnden Blättern (Abbildung 19J-L) gefunden. Die Aktivität des *AtNAT10*-Promotors ist unterhalb der Detektionsgrenze, es konnte jedenfalls keine GUS-Aktivität festgestellt werden.

2.3.3 *AtNATs* der Subfamilie III

Subfamilie III kann in zwei Untergruppen unterteilt werden. In der ersten befinden sich *AtNAT5* und *AtNAT6*, in der zweiten *AtNAT7* und *AtNAT8*. In der Subfamilie III ist die Aufspaltung in zwei Untergruppen sinnvoll, da die GUS-Expression für *AtNAT5* und -6 in Blattadern stattfindet, dagegen ist eine Expression der Gene *AtNAT7* und -8 nur in sich entwickelnden Samenanlagen zu finden, und, worauf in den Ergebnissen 2.4. näher eingegangen wird, in undifferenziertem Gewebe.

Die GUS-Expression von *AtNAT5* ist schwach und kann erst in zwei Wochen alten Keimlingen im Leitgewebe von sich entwickelnden jungen Blättern festgestellt werden (Abbildung 20A). Die Expression ist nur in den kleineren Blattadern zu sehen, ein Expressionsmuster, daß auch in ausgewachsenen Blättern erhalten blieb (Abbildung 20B). Mit Ausnahme der äußeren Hülle reifer Samen (Abbildung 20C) konnte in anderen Organen oder Geweben keine weitere Expression entdeckt werden.

Dagegen ist *AtNAT6* sehr stark exprimiert; Die GUS-Färbung konnte schon vier Tagen nach der Imbibition in der apikalen Region der Kotyledonen detektiert werden (Abbildung 20D) und nach 12 Tagen im gesamten Leitgewebe der Pflänzchen (Abbildung 20E).

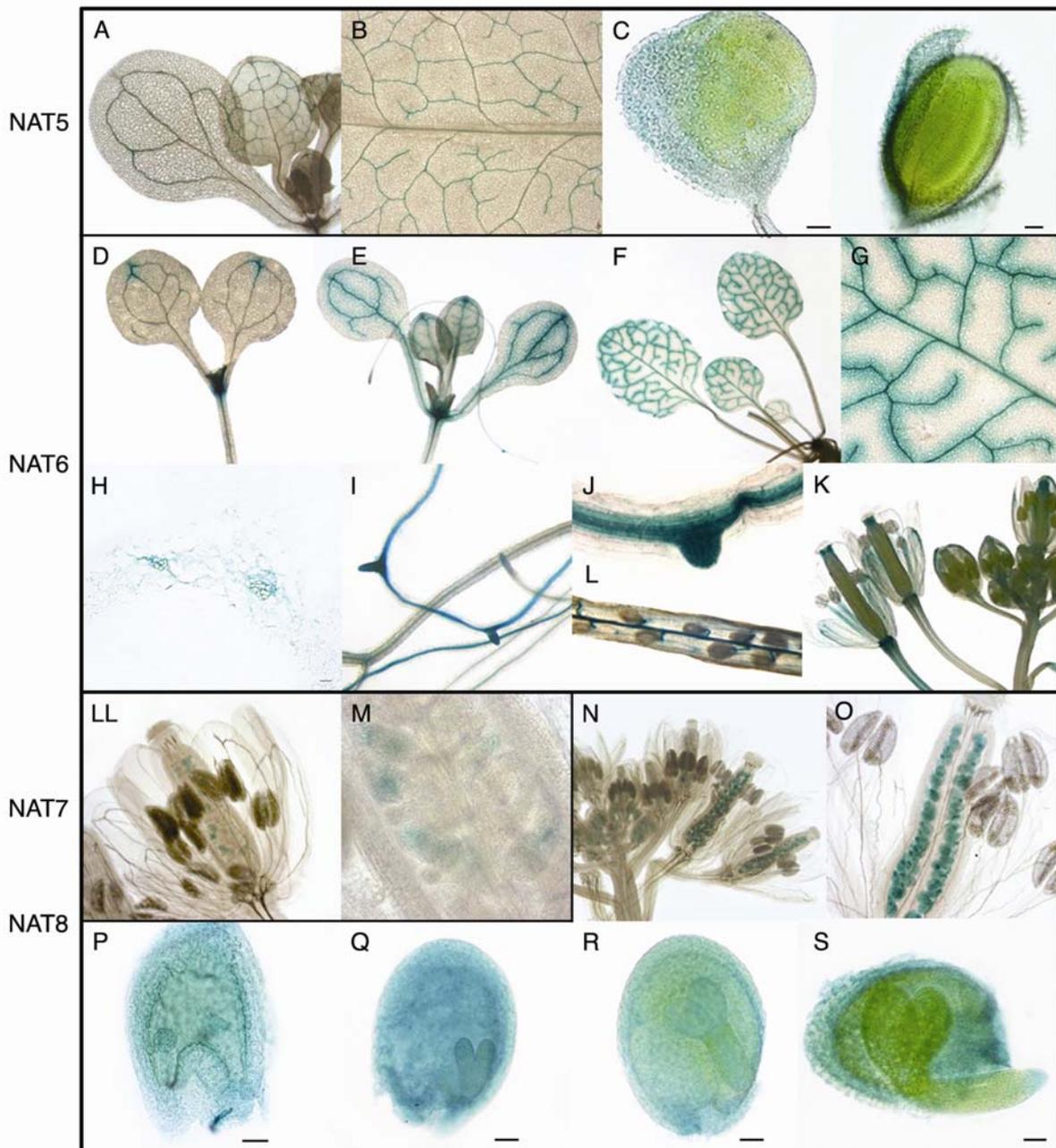


Abbildung 20: Expression der *AtNAT*-Gene innerhalb der Subfamilie III.

NAT5 (A) Keimling, zwei Wochen alt, (B) Nahaufnahme Blattoberfläche, (C) reife Samen zeigen Expression in der Samenhülle.

NAT6 (D) Keimling, 6 DAI, (E) Keimling, 12 DAI, (F) drei Wochen alte Rosette, (G) Nahaufnahme der Blattoberfläche, (H) Querschnitt durch G, (I) Wurzelsystem, (J) Nahaufnahme einer Wurzel mit sich entwickelnder Seitenwurzel, (K) Blütenstand mit Blüten in verschiedenen Entwicklungsstadien, (L) Schoten.

NAT7 (LL) Blüte mit GUS-Expression in den Samenanlagen, (M) Nahaufnahme eines Fruchtknotens mit Samenanlagen.

NAT8 (N) Blütenstand mit Blüten in verschiedenen Entwicklungsstadien, (O) Nahaufnahme eines Fruchtknotens und der umliegenden Antheren mit starker GUS-Expression in den Samenanlagen (P) Samenanlage mit Embryo im globulären Stadium, (Q) Samenanlage mit Embryo im Herzstadium, (R) Samenanlage mit Embryo im Torpedostadium, (S) Same mit reifem Embryo.

Die Balken entsprechen 50 µm.

Eine starke Expression zeigten die kleineren Blattadern sowie das umliegende Gewebe von sich entwickelnden und ausgewachsenen Blättern (Abbildung 20 F-H). *AtNAT6* wurde auch im Zentralzylinder der Wurzel (Abbildung 20I und J), sich bildenden Seitenwurzeln (Abbildung 20I und J), im Leitgewebe der Schoten (Abbildung 20L) und in Blüten (Abbildung 20K) exprimiert. In Blüten konnte die GUS-Färbung in den Kelchblättern (Sepalen), den Filamenten der Staubblätter und im Fruchtknoten gefunden werden (Abbildung 20K).

Die Expression von *AtNAT7* und *AtNAT8*, den beiden Mitgliedern der zweiten Untergruppe von Subfamilie III, wurde ausschließlich in den weiblichen Samenanlagen gefunden (Abbildung 20LL und M), diese Expression wurde während der Embryogenese beibehalten. *AtNAT8* zeigt eine starke Expression im Endosperm und im Embryo (Abbildung 20N-S), in *AtNAT7* dagegen ist die Expression deutlich schwächer. Die stärkste Expression im Embryo wurde für *AtNAT8* im Herzstadium (Abbildung 20Q) des Embryos beobachtet, danach wurde die GUS-Färbung schwächer und war nur noch deutlich an der Samenhülle zu sehen (Abbildung 20R und S).

2.3.4 *AtNATs* der Subfamilie V

Subfamilie V enthält *AtNAT11* und *AtNAT12*, welche überlappende, aber doch verschiedene GUS-Expressionsmuster zeigen. Die GUS-Expression für *AtNAT11* ist, wie für viele der *AtNATs*, in Leitgeweben zu finden, *AtNAT12* ist das einzige Gen, daß eine konstitutive GUS-Expression aufweist. *AtNAT12* Expression ist zu allen Zeiten in nahezu allen Geweben zu finden.

Die Expression von *AtNAT11* konnte in zwei Wochen alten Keimlingen an den Blattprimordien beobachtet werden, zu einem späteren Zeitpunkt im Leitgewebe der Blattstiele und der Rosettenblätter (Abbildung 21A und B). Dieses Expressionsmuster konnte auch in älteren Rosettenblättern und im Stängel beobachtet werden, wobei eine schwache Färbung in den Mesophyllzellen auftrat (Abbildung 21C-E). Der Zentralzylinder von älteren Wurzeln war ebenfalls gefärbt (Abbildung 21F), sowie das Leitgewebe in Kelchblättern, Fruchtknoten und Schoten (Abbildung 21G und H).

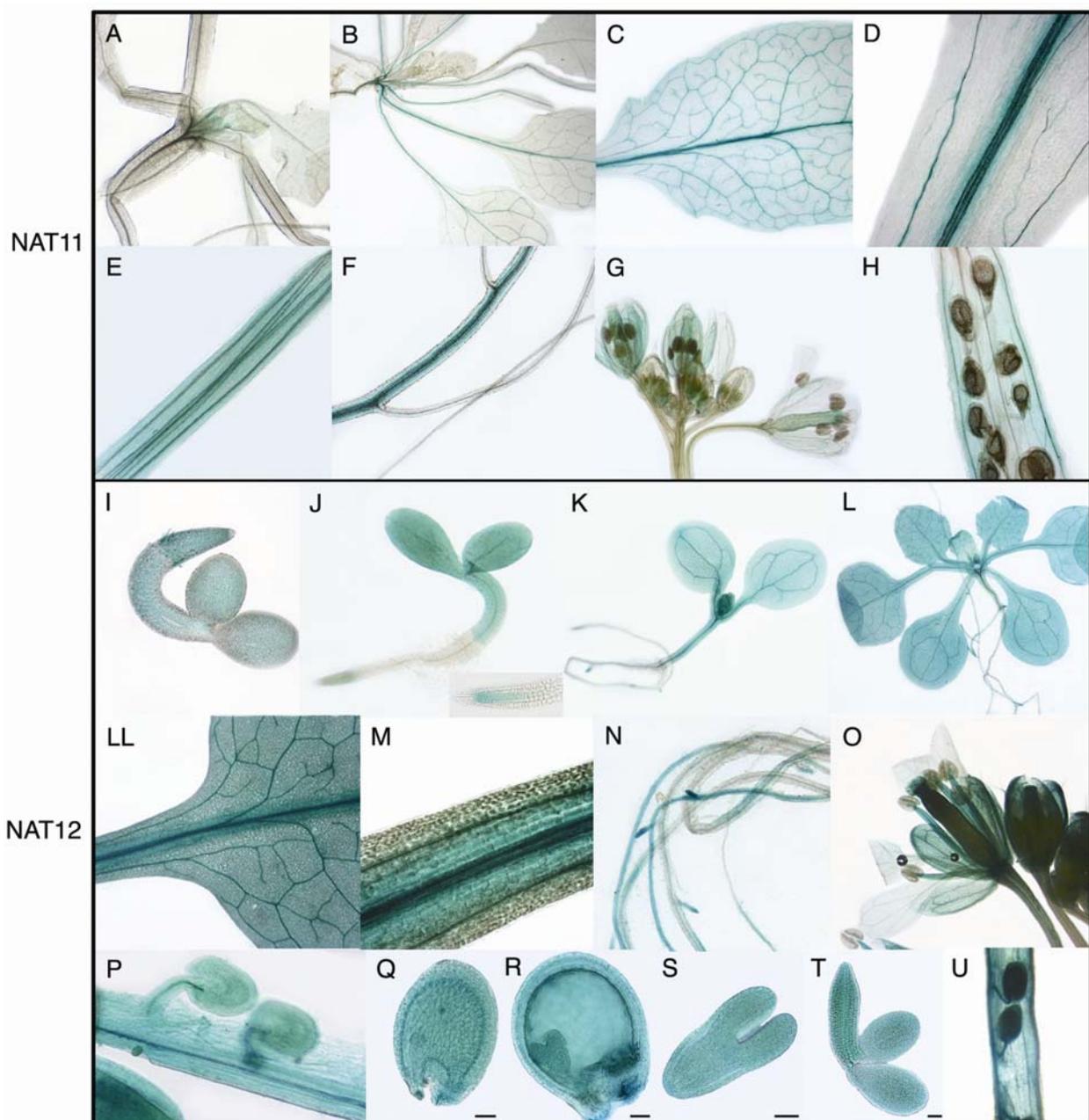


Abbildung 21: Expression der *AtNAT*-Gen Familienmitglieder der Subfamilie V.

NAT11 (A) Nahaufnahme von Blattprimordien eines zwei Wochen alten Keimlings, (B) drei Wochen alte Rosette, (C) ausgewachsenes Blatt, (D) Blattstiel eines ausgewachsenen Blattes, (E) Längsschnitt durch einen Sproß, (F) Wurzelsystem, (G) Blütenstand mit Blüten in verschiedenen Entwicklungsstadien, (H) Schote.

NAT12 (I) Keimling, 2 DAI, (J) Keimling, 4 DAI, (K) Keimling, 10 DAI, (L) drei Wochen alte Rosette, (LL) Nahaufnahme eines ausgewachsenen Blattes, (M) Längsschnitt durch einen Sproß, (N) Wurzelsystem, (O) Blütenstand mit Blüten in verschiedenen Entwicklungsstadien, (P) Nahaufnahme der Samenanlagen und umliegendes Leitgewebe, (Q) Same mit Embryo im globulären Stadium, (R) Same mit Embryo im Herzstadium, (S) Embryo im Torpedostadium, (T) reifer Embryo, (U) Schote. Die Balken entsprechen 50 µm.

AtNAT12 ist eher konstitutiv und stärker als *AtNAT11* exprimiert. Schon zwei Tage nach der Imbibition (DAI) konnte eine GUS-Färbung des gesamten Embryos beobachtet werden (Abbildung 21I). Vier Tage nach der Keimung verschob sich die Expression dahin, daß jetzt das Hypokotyl, die Keimblätter und die Wurzelspitze gefärbt waren (Abbildung 21J). Diese Expressionsmuster wurde erhalten bis Tag 12, als das Leitgewebe anfang, eine sehr starke GUS-Expression zu zeigen (Abbildung 21K). Drei Wochen alte Keimlinge zeigten die GUS-Färbung in allen oberirdischen Teilen der Pflanze, auch in Mesophyllzellen und Leitgeweben (Abbildung 21L-M). In Wurzeln beschränkte sich die Expression auf die Seitenwurzeln (Abbildung 21N). In Blüten konnte die Färbung in Kelchblättern (Sepalen), Filamenten der Staubblätter (Abbildung 21O), und im Fruchtknoten, mit eingeschlossen das Leitgewebe, die Samenanlagen und die Narbe (Abbildung 21O und P), gefunden werden. Der *AtNAT12* Promotor war während der gesamten Stadien der Embryogenese tätig, und zwar im Embryogewebe, dem Endosperm und dem gesamten Gewebe der Schoten (Abbildung 21U).

2.4. Untersuchungen von *AtNATs* zur Induzierbarkeit der Promotoraktivität in undifferenziertem Gewebe

Um Informationen über die Expression der *AtNAT*-Gene zu erhalten wurden Daten von der öffentlichen Datenbank Genevestigator analysiert (<http://www.genevestigator.ethz.ch/>; Zimmermann et al., 2004). Dabei fiel auf, daß die Expression von *AtNAT7* und *AtNAT8* in durch *Agrobacterium tumefaciens* induziertem Tumorgewebe um ein mehrfaches erhöht war (*AtNAT7*: 7,86-fach; *AtNAT8*: 3,51-fach; Genevestigator expression analysis, analysis-type: stress-specific expression profile (Response Viewer) Chip type: ATH1 (22k full genome *Arabidopsis* Affimetrix Gene Chip); *NAT7*: Locus ID: AT1G60030/ATH1 Probeset: 263734_at; *NAT8*: Locus ID: AT1G10540/ATH1 Probeset: 263258_at). Um diese Daten zu bestätigen, wurden *A. thaliana* Pflanzen am Stängelansatz der Infloreszenzen mit *Agrobacterium tumefaciens* infiziert (virulenter Stamm C58). Nach verschiedenen Zeiten während der Entwicklung der Tumore wurde Gewebe entnommen und daraus RNA extrahiert. Die Transkripthöhe von *AtNAT7* und -8 wurde mit semiquantitativer RT-PCR bestimmt (Abbildung 22).

Der Transkriptgehalt von *AtNAT7* und des homologen Gens *AtNAT8* stieg während der Entstehung und Entwicklung des Tumors an (Abbildung 22A). Im Einklang damit zeigten

Pflanzen, die das *GUS*-Gen unter den Promotoren von *AtNAT7* und *AtNAT8* exprimierten (*pAtNAT7::GUS*- und *pAtNAT8::GUS*-Pflanzen), eine GUS-Färbung in Tumoren der infizierten Pflanzen (Abbildung 22B).

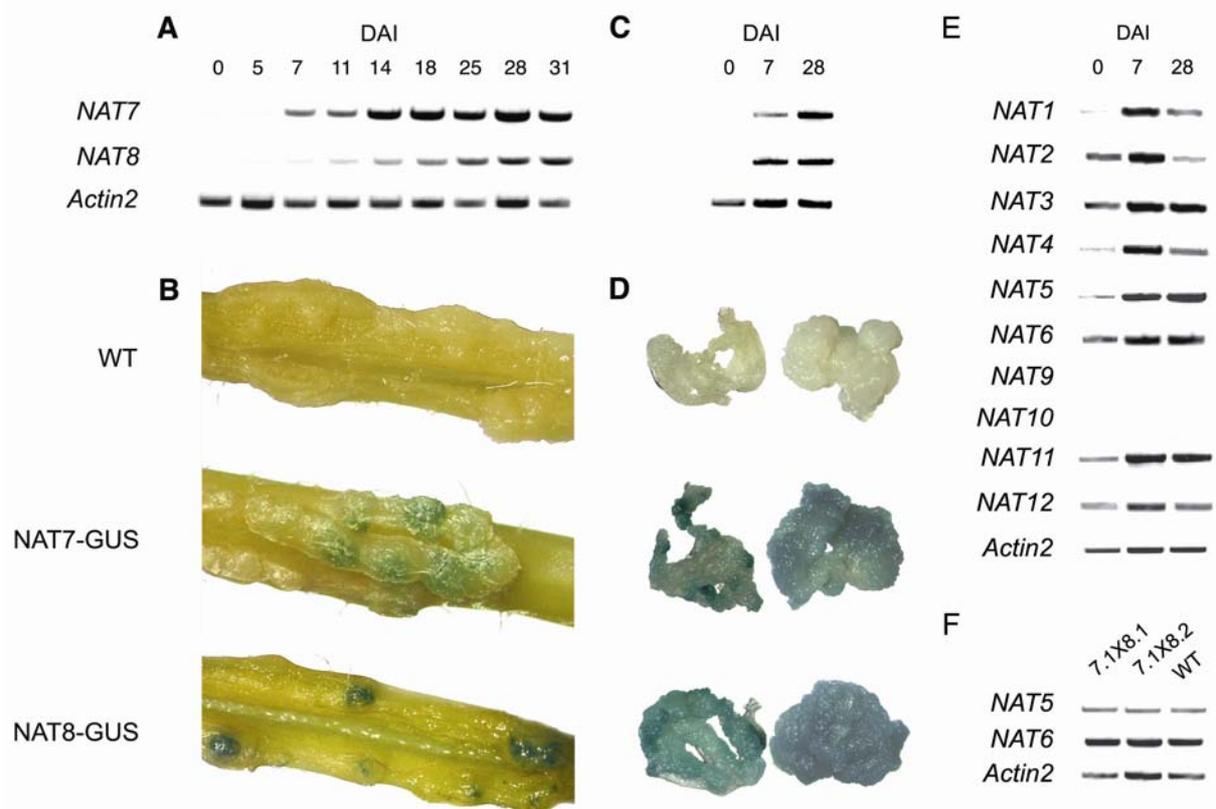


Abbildung 22: Expression von *AtNAT7* und *AtNAT8* in Tumoren, die durch *Agrobacterium tumefaciens* induziert wurden, und Kalluskulturen.

(A) Expression von *AtNAT7* und -8 während der Entwicklung von induzierten Tumoren, analysiert mit semiquantitativer RT-PCR, jeweils 30 PCR-Zyklen, *Actin2* als Kontrolle, 29 PCR-Zyklen, DAI: Tage nach Infizierung (*days after infection*).

(B) GUS-Färbung in Tumoren, die sich auf den transgenen *A. thaliana* Pflanzen *pAtNAT7::GUS* und *pAtNAT8::GUS* entwickelt haben, als Kontrolle der Wildtyp (WT), jeweils 18 DAI.

(C) Analyse der *AtNAT7* und -8 Expression während der Entstehung und Entwicklung von Kalluskulturen mit semiquantitativer RT-PCR, jeweils 30 PCR-Zyklen, *Actin2* als Kontrolle, 29 PCR-Zyklen, Proben von WT-Kalluskulturen zur RNA-Isolation jeweils nach 0, 7 und 28 DAI.

(D) GUS-Färbung in Kalluskulturen, die aus Kotyledonen von den transgenen *A. thaliana* Pflanzen *pAtNAT7::GUS* und *pAtNAT8::GUS* gewonnen wurden, Wildtyp (WT) als Kontrolle, jeweils 7 (links) bzw. 8 (rechts) DAI.

(E) Analyse aller übrigen *AtNAT* Expressionen außer *AtNAT7* und -8 während der Entstehung und Entwicklung von Kalluskulturen mit semiquantitativer RT-PCR, jeweils 30 PCR-Zyklen, *Actin2* als Kontrolle, 29 PCR-Zyklen, Proben von WT-Kalluskulturen zur RNA-Isolation jeweils nach 0, 7 und 28 DAI.

(F) Analyse der *AtNAT5* und -6 Expression während der Entstehung und Entwicklung von Kalluskulturen mit semiquantitativer RT-PCR, jeweils 30 PCR-Zyklen, *Actin2* als Kontrolle, 29 PCR-Zyklen, Proben von Doppelmutanten *nat7.1 x nat8.1*- und *nat7.1 x nat8.2*-Kalluskulturen zur RNA-Isolation jeweils nach 0, 7 und 28 DAI.

Die Entstehung von Tumoren in pflanzlichem Gewebe wird durch ein Ungleichgewicht der Hormone Auxin und Cytokinin hervorgerufen. Ein anderes Beispiel für unkontrollierte Zellteilungen und Zellwachstum in pflanzlichem Gewebe ist die Bildung von undifferenziertem Kallusgewebe. Die Expression von *AtNAT7* und *AtNAT8* wurde deswegen in einem zweiten experimentellen Ansatz während der Entwicklung von Kallusgeweben aus *A. thaliana* Kotyledonen analysiert. In Abbildung 22C sieht man, daß die Transkriptlevel für beide Gene im Laufe der Kallusentwicklung anstieg, während zu Beginn in den zur Kallusentstehung verwendeten Kotyledonen kein Transkript detektierbar war. Außerdem zeigten aus Kotyledonen von homozygoten transformierten Pflanzen von *pAtNAT7::GUS* und *pAtNAT8::GUS* entwickelte Kalluskulturen, im Gegensatz zum Spendergewebe, eine intensive GUS-Aktivität (Abbildung 22D).

Durch RT-PCR Analysen der WT-Kalluskulturen mit den entsprechenden *AtNAT* Primern (siehe Tabelle 1) konnte die Expression weiterer *AtNAT*-Gene untersucht werden (Abbildung 18E). *AtNAT9* und *AtNAT10* zeigten keine Expression. Eine verstärkte Expression nach Induktion des Kallusgewebes war nach 7 Tagen bei allen anderen *AtNAT*-Genen zu beobachten, nach 28 Tagen konnte eine Abnahme der Expression, im Vergleich zum 7. Tag, bei *AtNAT1*, *AtNAT2* und *AtNAT4* festgestellt werden. Für *AtNAT3*, *AtNAT5*, *AtNAT6*, *AtNAT11* und *AtNAT12* blieb die Transkriptmenge gleich.

Die Induktion der Expression von *AtNAT7* und *AtNAT8* durch Agrobakterien und Kallusbildung führte zu der Frage nach dem Verhalten der anderen Mitglieder der gleichen Subfamilie, *AtNAT5* und *AtNAT6*. In Abbildung 23E ist zu sehen, daß die Expression beider Gene durch die Kallusinduktion steigt. Nun sollte überprüft werden, ob in den Doppelknockout-Pflanzen *nat7.1 x nat8.1*, bzw. *nat7.1 x nat8.2* die Gene *AtNAT5* und *AtNAT6* ein anderes Verhalten zeigen als im WT, da sie aus derselben Subfamilie stammen und möglicherweise die Funktion der ausgeschalteten Gene übernehmen. Abbildung 23F zeigt die Analyse der *AtNAT5* und -6 Expression während der Entstehung und Entwicklung von Kalluskulturen mit semiquantitativer RT-PCR. Die Kalluskulturen wurden hier aus den Doppelmutanten *nat7.1 x nat8.1*- und *nat7.1 x nat8.2* gebildet. Die Expression ändert sich weder für *AtNAT5* noch für *AtNAT6* im Vergleich zwischen Mutante und WT.

2.5. Expressionsmuster der *pAtAzg1::GUS* Pflanzen

pAtAzg1::GUS Pflanzen zeigten in einem frühen Stadium, ca. ab dem 9. Tag eine Färbung am Übergang zwischen Hypokotyl und Keimblättern (Abbildung 23E), die sich in den folgenden Tagen verstärkte (Abbildung 23D), jedoch bei älteren Pflanzen wieder verblaßte. Ab der 2. Woche war eine Färbung in den Wurzeln zu beobachten (Abbildung 23C), die sich zur dritten Woche hin intensivierte (Abbildung 23A). Diese GUS-Expression begann in einem Bereich hinter der Wurzelspitze von Haupt-, sowie Nebenwurzeln, und war dort auf das gesamte Wurzelgewebe gleichmäßig verteilt, auch Wurzelhaare wurden gefärbt.

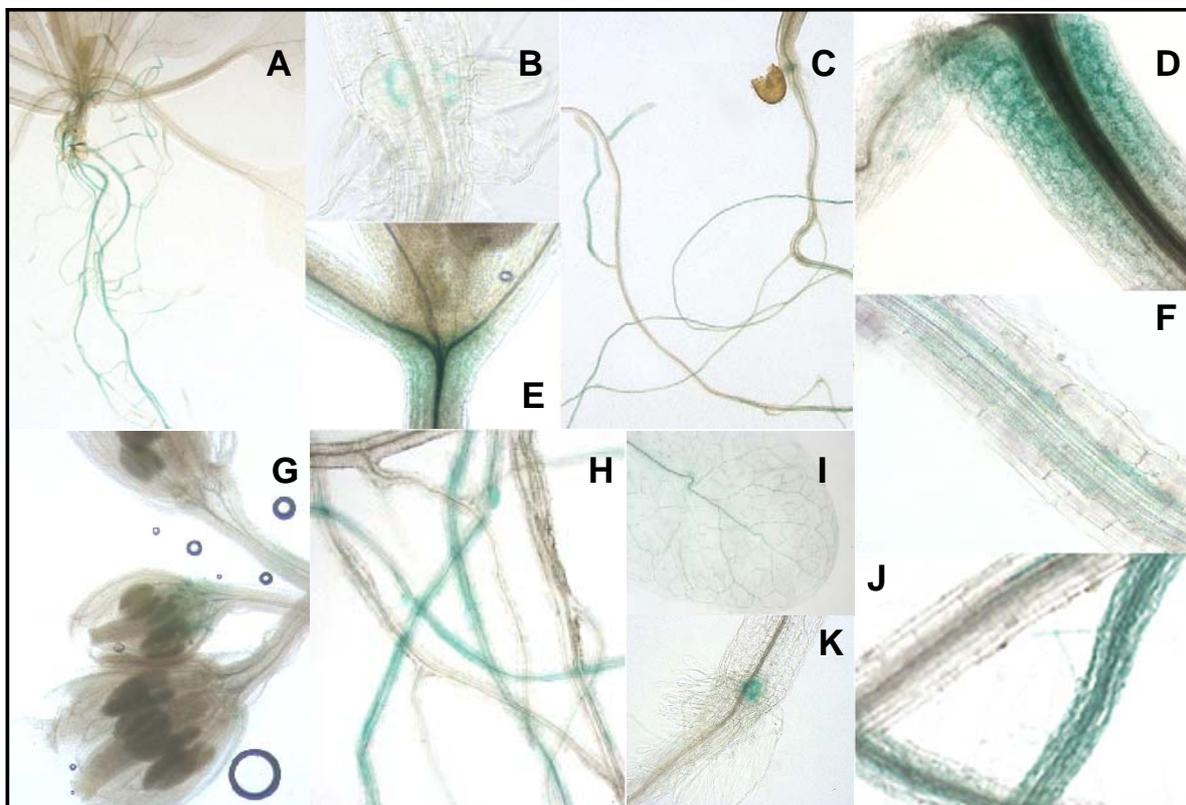


Abbildung 23: Untersuchung von *AtAzg1* Expression durch Promotor:GUS Fusion.

(A) 21 Tage alter Keimling, auf Erde angezogen.

(B, E) Zehn Tage alte Keimlinge, auf MS-Platten gewachsen, GUS-Expression in der Verbindungszone zwischen Wurzel-Hypokotyl (B) und Hypokotyl-Keimblättern (E).

(C, D, F) 16 Tage alte Keimlinge, auf MS-Platten gewachsen. Expression im Wurzelsystem (C), Hypokotyl (D) und Zentralzylinder der Hauptwurzel (F).

(G) junge Blüten einer ausgewachsenen Pflanze, auf Erde angezogen.

(H, J) Wurzelsystem von 16 Tage alten Keimlingen, in Flüssigkultur gewachsen. Flüssigkultur ohne Zusätze (H), Flüssigkultur mit 0,2 µM trans-Zeatin (J).

(I) senescentes Blatt, ausgewachsene Pflanze, auf Erde angezogen,

(K) 15 Tage alter Keimling, auf MS-Platte gewachsen, GUS-Expression in der Verbindungszone zwischen Wurzel-Hypokotyl.

Ältere Pflanzen zeigten eine stärkere Färbung. In älteren Wurzelteilen war die Färbung zunächst schwächer als in jüngeren und beschränkte sich dort auf den Zentralzylinder der Wurzeln (Abbildung 23F). Später intensivierte sich die Färbung im reiferen Wurzelgewebe (Abbildung 23A, H). Eine sehr markante Färbung trat in Keimlingen zwischen Hypokotyl und Wurzel auf (Abbildung 23B, C, K).

Besonders gut zu sehen war die GUS-Expression in Pflanzen, die auf Erde angezogen wurden (Abbildung 23A), bzw. in Pflanzen, die in Flüssigkultur gewachsen waren (Abbildung 23H, J). In allen drei hier getesteten Anzuchtbedingungen (Kultur in Erde im Gewächshaus, sterile Kultur in MS-Platten, sterile Schüttelkultur) wurde nie das gesamte Wurzelmaterial durch GUS-Expression blau gefärbt und es zeigte sich nie eine GUS-Expression in den Wurzelspitzen. Bei älteren, auf Erde angezogenen Pflanzen konnte gelegentlich eine leichte Färbung der Blattadern in seneszenten Blättern (Abbildung 23I) und an der Basis sehr junger Blüten (Abbildung 23G) entdeckt werden.

2.6. Untersuchungen von *AtAzg1* zur Induzierbarkeit der Promotoraktivität durch pflanzliche Hormone

Durch die Vorversuche mit der heterologen Expression von *AtAzg1* in Hefe (siehe Einleitung) ergab sich ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der Substrate Adenin und Cytokinin bei der Funktion des Transporters. Der *AtAzg1* Transporter war in der Lage, Adenin in Hefe zu transportieren, und der Transport wurde durch verschiedene Cytokinine inhibiert. Zusätzlich konnten auf der Genevestigator Internetseite (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) Hinweise darauf gefunden werden, daß der Transkriptlevel von *AtAzg1* durch Applikation von *trans*-Zeatin steigt (1,7-fach; Genevestigator expression analysis, analysis-type: stress-specific expression profile (Response Viewer) Chip type: ATH1 (22k full genome *Arabidopsis* Affimetrix Gene Chip); *Azg1*: Locus ID: AT3G10960/ATH1 Probeset: 256443_at). Um diese Aussagen zu überprüfen, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurde eine RT-PCR an in Flüssigkultur angezogenen Wildtyp *A. thaliana* Pflanzen, die mit *trans*-Zeatin behandelt wurden, durchgeführt. Zum zweiten wurden *pAtAzg1::GUS* Pflanzen mit verschiedenen Cytokininen behandelt. Dadurch sollte die Induzierbarkeit des *AtAzg1* Promotors durch Cytokinine untersucht werden.

2.6.1. Die semiquantitative RT-PCR zeigt eine Reaktion des *AtAzg1* Promotors auf die Behandlung mit Cytokinin

Die direkteste und einfachste Methode um eine Erhöhung des mRNA Gehaltes eines Transkriptes zu untersuchen ist die semiquantitative RT-PCR (siehe Material und Methoden 3.15). Hier wurden Proben von 11 Tage alten Pflanzen aus Flüssigkultur verwendet und die RNA extrahiert. Am 10. Tag nach der Keimung wurde der Flüssigkultur *trans*-Zeatin bis zu einer Konzentration von 1 μ M zugegeben. Nach 24 Stunden wurde das Wurzelmaterial mit Leitungswasser gewaschen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach Umsetzung der gewonnenen RNA in cDNA wurde eine PCR mit spezifischen Primern für *AtAzg1* durchgeführt (siehe Abbildung 24).

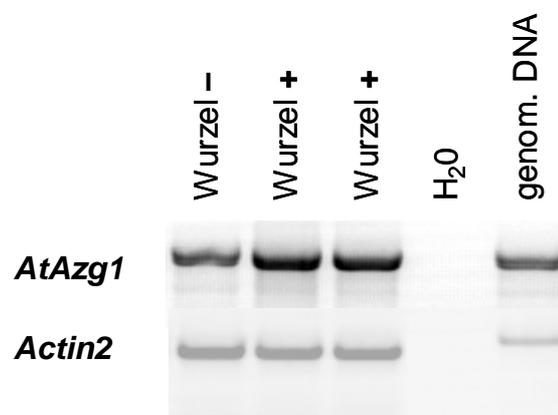


Abbildung 24: Semiquantitative RT-PCR, durchgeführt mit WT cDNA als Template. cDNA gewonnen aus RNA von 11 Tage alten Pflanzen aus Flüssigkultur. *AtAzg1*: spezifische Primer für *AtAzg1*, PCR mit 36 Zyklen; *Actin2*: spezifische Primer für *Actin2* als Kontrolle, PCR mit 30 Zyklen; Wurzel -: RNA gewonnen aus Wurzeln ohne *t*-Zeatin Behandlung; Wurzel +: RNA aus Wurzeln mit 24 h Behandlung von 1 μ M *t*-Zeatin.

Es ist nach 36 Zyklen deutlich zu sehen, daß in den mit *trans*-Zeatin behandelten Pflanzen die Expression von *AtAzg1* höher ist als in den nicht behandelten Pflanzen. Offensichtlich hat das beigegebene *trans*-Zeatin, das in diesem Versuchsansatz jedoch über die gesamte Pflanzenoberfläche aufgenommen werden konnte, eine Aktivierung des *AtAzg1* Promotors bewirkt. Als Kontrolle für gleichmäßige Lademengen an cDNA wurde *Actin2* mit spezifischen Primern für 30 Zyklen amplifiziert.

2.6.2 *pAtAzg1::GUS*-Pflanzen zeigen eine GUS-Induktion durch verschiedene Cytokinine

Um die Induzierung der Promotoraktivität zu untersuchen wurden Keimlinge unterschiedlichen Alters unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und unterschiedlichen Konzentrationen an Cytokinin untersucht. Gezeigt ist in Abbildung 25 ein Experiment mit Keimlingen von WT-Pflanzen, die mit dem *pAtAzg1::GUS* Konstrukt transformiert waren. Es wurden nur homozygote Transformanten für die nachfolgenden Experimente verwendet. Die Keimlinge wurden 10 Tage in Flüssigkultur angezogen, dann wurde die Kultur mit $1\mu\text{M}$ *trans*-Zeatin versetzt. Nach 18 und 24 Stunden wurde das Pflanzenmaterial mit Leitungswasser gewaschen und in GUS-Färbelösung über Nacht inkubiert.

Nach 18 Stunden setzt eine Färbung des Wurzelgewebes hinter den Wurzelspitzen ein (Abbildung 25B). In diesem Bereich ist das Gewebe gleichmäßig (Epidermis, Rinde, Zentralzylinder, etc.) gefärbt. Diese Färbung intensiviert sich nach 24 Stunden und auch der gefärbte Bereich vergrößert sich (Abbildung 25C). Eine höhere Konzentration an *trans*-Zeatin ruft eine stärkere Färbung und stärkere Verbreitung der Färbung auch auf älteres Wurzelgewebes hervor. Ähnliche Ergebnisse konnten mit Isopentenyladenin (Abbildung 25E-H) und Kinetin (hier nicht gezeigt) hervorgerufen werden.

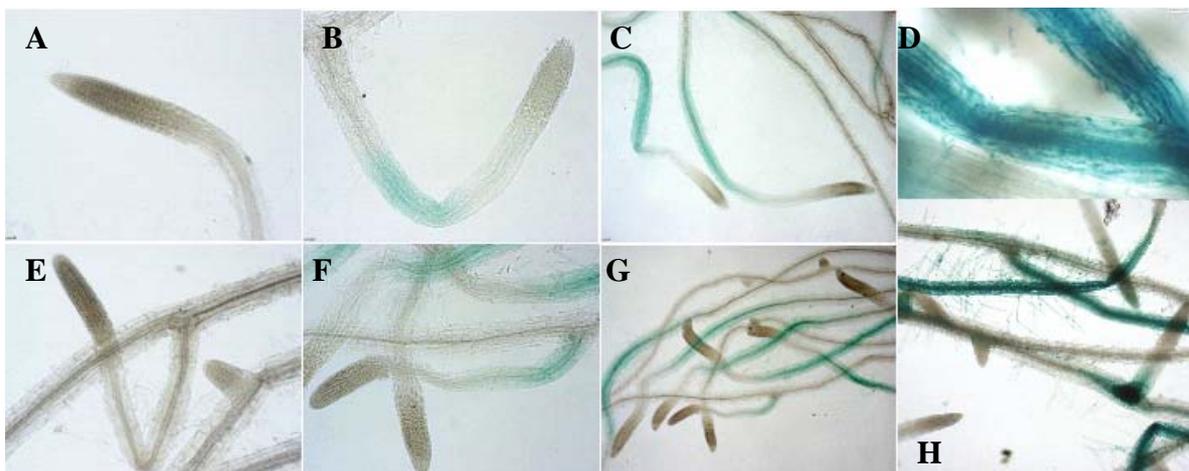


Abbildung 25: *pAzg1::GUS* Expression in Wurzeln: Promotorinduzierbarkeit mit *t*-Zeatin und Isopentenyladenin.

(A, B, C, D) Pflanzen 10 Tage in Flüssigkultur (Dauerlicht) + *t*-Zeatin: (A) MS als Kontrolle: $0\mu\text{M}$ *t*-Zeatin, 24 Std.; (B) *t*-Zeatin $1\mu\text{M}$, 18 Std. (C) *t*-Zeatin $1\mu\text{M}$ 24 Std; (D) *t*-Zeatin $30\mu\text{M}$, 24 Std.

(E, F, G, H) Pflanzen 10 Tage in Flüssigkultur (Dauerlicht) + Isopentenyladenin: (E) MS als Kontrolle: $0\mu\text{M}$ Isopentenyladenin, 24 Std.; (F) Isopentenyladenin $1\mu\text{M}$, 18 Std.; (G) Isopentenyladenin $1\mu\text{M}$, 24 Std.; (H) Isopentenyladenin $30\mu\text{M}$, 24 Std. Lichtbedingungen ca. $16\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$.

Als Kontrolle wurden immer *Azg1*-GUS Pflanzen in Flüssigkultur ohne Cytokininzusätze gleichen Alters für die GUS-Färbung verwendet. Die Kontrollpflanzen zeigten keine GUS-Aktivität (Abbildung 25A und E). Es wurden relativ junge Pflanzen (10 Tage alte Keimlinge) verwendet, weil zu einem späteren Zeitpunkt die endogene Expression einsetzt und sich von Tag zu Tag verstärkt (vergleiche hierzu Abbildung 23H und J, nach 16 Tagen in Flüssigkultur, ohne Zusätze und mit 0,2 μ M *trans*-Zeatin). Eine GUS-Expression konnte auch in auf Platten angezogenen *pAtAzg1::GUS* Pflanzen erzielt werden. Diese mußten aber mindestens 3 Tage auf den mit Cytokinen angereicherten Platten wachsen, bevor eine Induktion der GUS-Expression in den Wurzelspitzen sichtbar wurde. Die GUS Expression war wesentlich schwächer als in den Flüssigkulturen. Gleichaltrige Pflanzen, die nur auf mit Cytokinen angereichertem Medium gewachsen waren, zeigten keine durch die Cytokine veränderte GUS-Färbung, sondern eine ihrem Entwicklungsstand entsprechende GUS-Färbung des Gewebes wie in Abbildung 23 dargestellt.

3. Lokalisation der NATs und des *Azg1* aus *A. thaliana*

3.1. Lokalisation der AtNAT-GFP Fusionsproteine in *A. thaliana*

Zellsuspension und *Allium cepa* Epidermiszellen

Analysiert man die *AtNAT* Gene mit Hilfe der Aramemnon-Vorhersageprogramme für plastidäre Präsequenzen, so ergibt sich für nur ein einziges Gen eine positive Vorhersage, und zwar für *AtNAT12*. Von verschiedenen Vorhersageprogrammen (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>) wird eine Plastiden-Lokalisation für *AtNAT12* angenommen (siehe Abbildung 26), ebenso für die phylogenetisch nahestehenden *OsNAT10* und *OsNAT11*. Ein Sequenz-Vergleich der NAT-Proteine zeigt eine stark hydrophile N-terminale Extension der *AtNAT* Proteine *AtNAT11* und *AtNAT12*, welche sich über eine Länge von ca. 120 bis 130 Aminosäuren erstreckte. Alle anderen NAT-Proteine besitzen offensichtlich keine solche Präsequenzen. Für das *AtNAT11* Protein ist trotz der N-terminalen Extension eine Insertion in eine andere Membran als die Plasmamembran nicht wahrscheinlich (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>).

Um mit einem experimentellen Ansatz zu untersuchen, in welche Membran AtNAT12 integriert wird, wurde ein *AtNAT12-GFP* Fusionkonstrukt generiert und in *A. thaliana* Zellen transient exprimiert. Die *A. thaliana* Zellen wurden durch *A. tumefaciens* transformiert. Als paralleler Ansatz wurde die ballistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen gewählt. Diese sind sehr groß und deswegen gut zu mikroskopieren. Mit beiden Methoden konnte die Fluoreszenz der AtNAT12 Fusionsproteine in der peripheren Region der Zellen erkannt werden (Abbildung 27A, 32B).

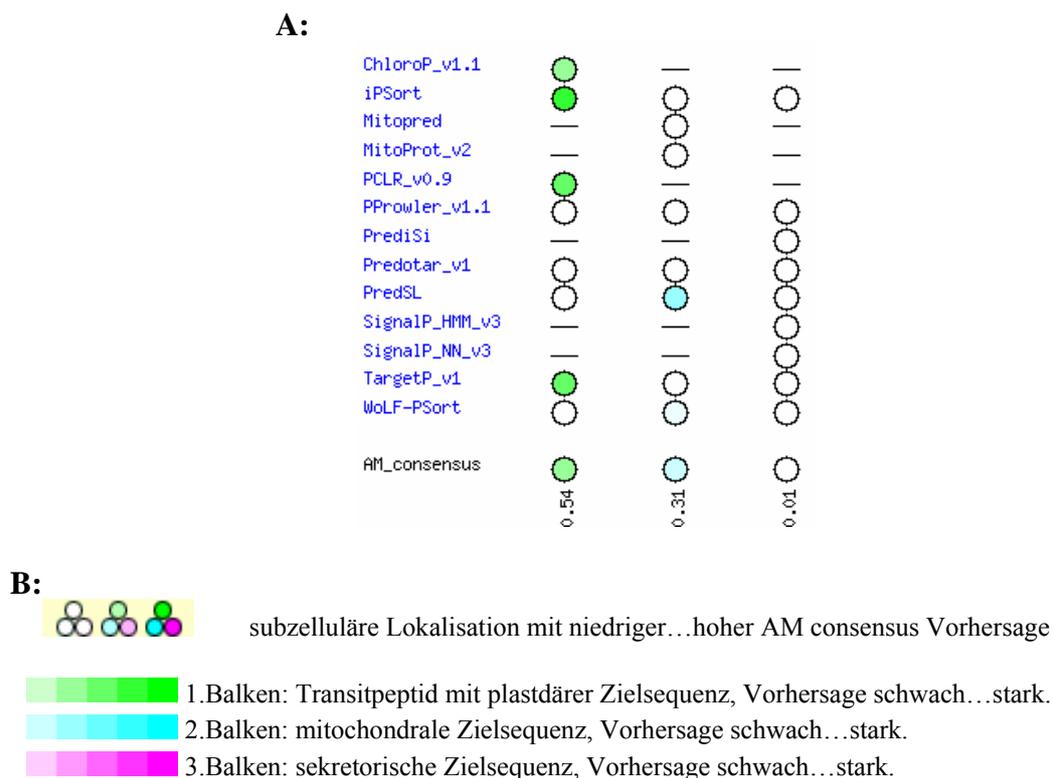


Abbildung 26: (A) Verschiedene Vorhersageprogramme für N-terminale Transitpeptide für *AtNAT12*, zusammengefaßt in AM consensus, (B) Farbschema zur AM consensus Vorhersage.

Wurde das Fusionsprotein *AtNAT12_{Transitpeptid}-GFP* mit der möglichen N-terminalen Präsequenz von *AtNAT12* verwendet (siehe Material und Methoden 4.2), dann konnte die Fluoreszenz im Cytosol der Zellen detektiert werden (hier nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen auf eine Lokalisation von *AtNAT12* in der Plasmamembran hin und nicht, wie vermutet, in den Chloroplasten.

Zusätzlich wurde bei den einzigen beiden *AtNAT* Genen, die offensichtlich durch äußere Faktoren beeinflussbar sind, *AtNAT7* und *AtNAT8*, in welchem zellulärem Kompartiment die

exprimierten Proteine ihre Funktion als Transporter erfüllen. Für diese beiden Proteine aus einer Untergruppe der Subfamilie III konnte ebenfalls eine Lokalisation in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Abbildung 27C und D).

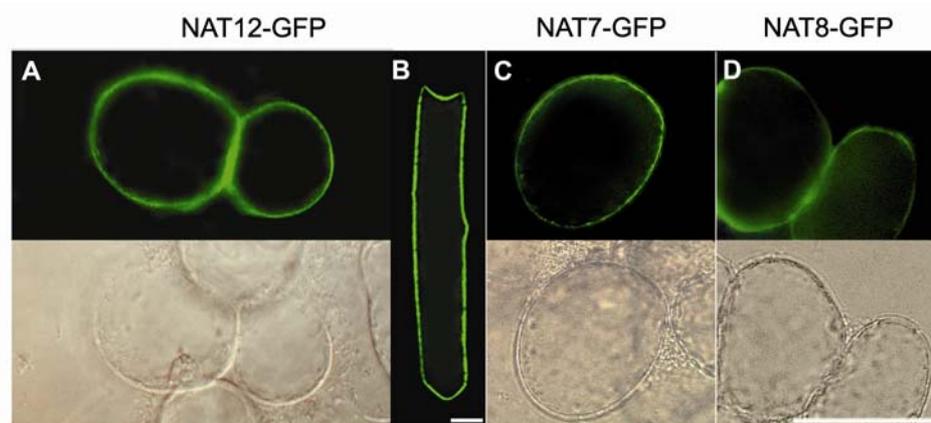
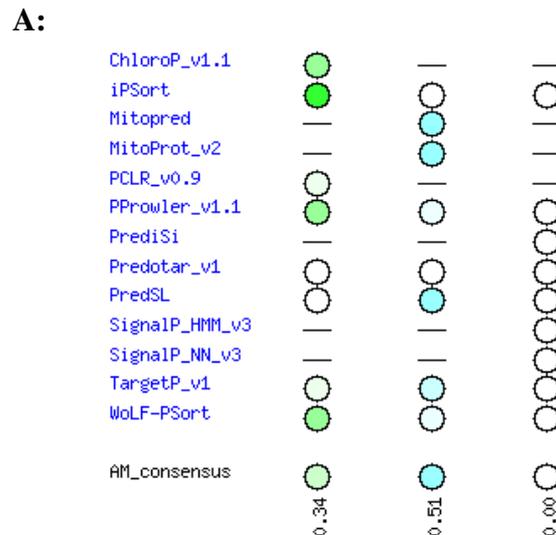


Abbildung 27: Subzelluläre Lokalisation von AtNAT12, AtNAT7 und AtNAT8. Transiente Expression von *AtNAT12-GFP* (A), *AtNAT7-GFP* (C) und *AtNAT8-GFP* (D) in *A. thaliana* Zellsuspensionen (Hellfeld-Foto jeweils unterhalb des Fluoreszenzbildes). Transiente Expression von *AtNAT12-GFP* in Zwiebelepidermiszellen (B). Die Balken entsprechen 30 µm.

3.2. Lokalisation der AtAzc1-GFP Fusionsproteine in *A. thaliana*

Zellsuspension und *Allium cepa* Epidermiszellen

Die Purinaufnahme-Experimente mit Hefezellen, die das AtAzc1 Protein überexprimierten, gaben erste Hinweise auf Transport von Substraten über die Plasmamembran (Benjamin Schumacher, Diplomarbeit 2006). Trotzdem kann die Überexpression in Hefe auch zu einer falschen Insertion des zu untersuchenden Transporters führen. In Arabidopsis wurde der Transporter außerdem von verschiedenen Vorhersageprogrammen in unterschiedlichen Kompartimenten der pflanzlichen Zelle vorhergesagt. Vier Programme sagen eine Lokalisation im Chloroplasten voraus, vier im Mitochondrium und vier Vorhersageprogramme nehmen die Plasmamembran als wahrscheinlich an (siehe Abbildung 28). Um die subzelluläre Lokalisation zu klären, wurden zwei AtAzc1-GFP Konstrukte hergestellt (siehe Ergebnisse 6.1). Das AtAzc1-GFP-Fusionsprotein wurde in einer *A. thaliana* Zellkultur durch eine Transformation mit Agrobakterien transient exprimiert. Hierdurch konnte eine Lokalisation des Transporters in der Plasmamembran nachgewiesen werden (siehe Abbildung 29A, B).

**B:**

subzelluläre Lokalisation mit niedriger...hoher AM consensus Vorhersage

- 1. Balken: Transitpeptid mit plastdärer Zielsequenz, Vorhersage schwach...stark.
- 2. Balken: mitochondrale Zielsequenz, Vorhersage schwach...stark.
- 3. Balken: sekretorische Zielsequenz, Vorhersage schwach...stark.

Abbildung 28: (A) Verschiedene Vorhersageprogramme für N-terminale Transitpeptide für *AtA zg1*, zusammengefaßt in AM_consensus, (B) Farbschema zur AM_consensus Vorhersage.

Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde die durch ballistische Transformation herbeigeführte transiente Expression in *Alium cepa* Epidermiszellen gewählt. Da diese Zellen besonders groß sind, eignen sie sich gut für derartige Untersuchungen. Auch in den Epidermiszellen konnte eine Lokalisation des GFP-Fusionsproteins in der Plasmamembran festgestellt werden (siehe Abbildung 29C, D, E). D und E zeigen die Plasmolyse. In der Plasmolyse, hier hervorgerufen durch Inkubation mit 500 mM NaCl, konnte eindeutig zwischen Zellwand, Plasmamembran und Tonoplast unterschieden werden (Abbildung 29E). Die GFP-Proteine verblieben deutlich in der Plasmamembran. Die GFP-Fluoreszenz konnte bei Verwendung des Fusions-Konstruktes *AtA zg1*_{Transitpeptid}-GFP, vergleichbar mit *AtNAT12*_{Transitpeptid}-GFP, im Cytosol detektiert werden (hier nicht gezeigt). Auch hier wird *AtA zg1*-GFP eindeutig zur Plasmamembran dirigiert.

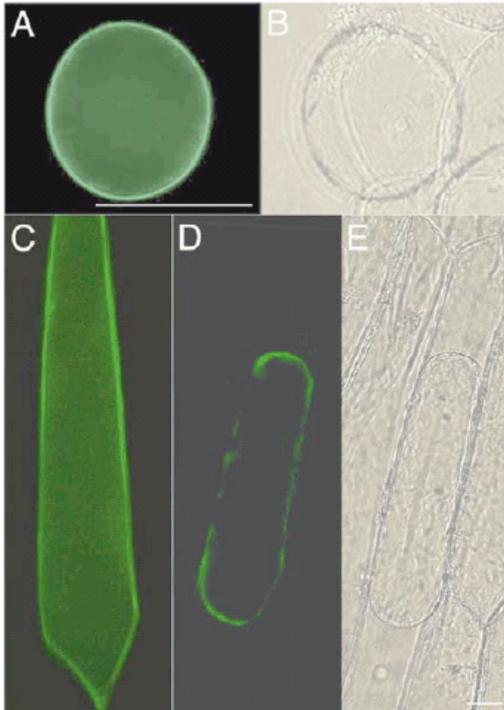


Abbildung 29: Lokalisierung des AtAzg1-GFP Fusionsproteins in der Zelle. Transiente Expression. (A) Mikroskopische Aufnahme Protoplast einer *A. thaliana* Zellsuspension, (B) Hellfeldfoto des Protoplasten aus A, (C) mikroskopische Aufnahme einer Zwiebelepidermiszelle, (D) Zwiebelepidermiszelle nach Plasmolyse mit 500 mM NaCl, (E) Hellfeldfoto der Zwiebelepidermiszelle aus D. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem GFP-Filter aufgenommen.

4. Untersuchung von *A. thaliana* NAT-Insertionsmutanten

4.1 Identifikation der *AtNAT*-Insertionsmutanten

Zur weiteren Untersuchung der *AtNAT*-Gene wurde nach T-DNA Insertionsmutanten gesucht, die wahrscheinlich zu einer Null-Mutante führen, und entsprechende Linien für alle *AtNAT*-Gene von Wisconsin-, Salk-, und GABI-Kat bestellt (siehe Tabelle 4). Die isolierten *AtNAT*-Insertionslinien sind in Abbildung 30 dargestellt. Zur Untersuchung des Transkripts wurde RNA aus pflanzlichen Geweben homozygoter Pflanzen (siehe Material und Methoden) isoliert und mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die PCR Reaktionen wurde die cDNA als Template eingesetzt. Da alle *AtNAT*-Gene (außer *AtNAT9* und *AtNAT10*) in Blüten exprimiert werden (siehe Ergebnisse 2.1 und 2.4), wurde die RNA aus Blüten isoliert. Für keine der homozygoten *AtNAT* T-DNA Insertionen, die im weiteren verwendet wurden, konnte ein Transkript detektiert werden. Das bedeutet, daß alle verwendeten Linien Nullmutationen, bzw. Knockout Linien sind (außer *nat9* und *nat10*, siehe Diskussion).

4.2. Knockout Pflanzen der *AtNAT*-Familie zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp

Keine der analysierten homozygoten Mutanten Linien zeigte einen erkennbaren informativen Phänotyp im Vergleich mit dem Wildtyp, weder unter Gewächshausbedingungen, noch unter verschiedenen Streßbedingungen (siehe Material und Methoden: Hochlicht, UV-Streß, (Zink- und Nickelstreß) Schwermetallstreß, Behandlung mit Paraquat, Phosphat-, Sulfat- oder Eisenmangel, Trockenstreß, Bildung von Kallusgewebe). Alle Ergebnisse wurden photographisch dokumentiert, da aber nie ein Unterschied zum WT ersichtlich war, wird hier auf eine ausführliche Darstellung verzichtet. Dies entspricht auch den Expressionsdaten von Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>); dort konnte für keinen der *AtNATs* eine signifikante Veränderung der Expression durch äußere Einflüsse detektiert werden, abgesehen von der Expressionsänderung durch *Agrobacterium tumefaciens* bei *AtNAT7* und *AtNAT8* (siehe Ergebnisse 2.4).

4.3. Herstellung von Doppel- und Tripelmutanten

Die Abwesenheit eines erkennbaren mutanten Phänotyps läßt auf funktionelle Redundanz innerhalb der *AtNAT* Subfamilien schließen, welche möglicherweise den Funktionsverlust eines einzelnen Gens kompensiert. Um mögliche redundante Effekte aufzudecken, wurden durch Kreuzungen von Einzelmutanten derselben Subfamilie/Untergruppe homozygote Doppel-Knockout Pflanzen hergestellt: *nat1* und *nat2* (Subfamilie I), *nat4* und *nat9* (Subfamilie II), *nat4* und *nat10* (Subfamilie II), *nat9* und *nat10* (Subfamilie II), *nat5* und *nat6* (Subfamilie III) und *nat7* und *nat8* (Subfamilie III). Aus *nat1*, *nat2* und *nat3* (Subfamilie I) wurde eine Tripelmutante durch Kreuzung der Doppelmutante *nat1* und *nat2* mit *nat3* hergestellt (siehe Tabelle 5).

Mit den Doppelmutanten wurden, wie schon mit den Einfachmutanten, vielfältige Untersuchungen durchgeführt (siehe Material und Methoden: UV-Streß, Hochlicht, Tumorinduzierung durch Agrobakterien, Kallusinduktion). Keine dieser Pflanzen zeigte eine erkennbare phänotypische Veränderung im Vergleich zum Wildtyp, auch nicht die Tripelmutante.

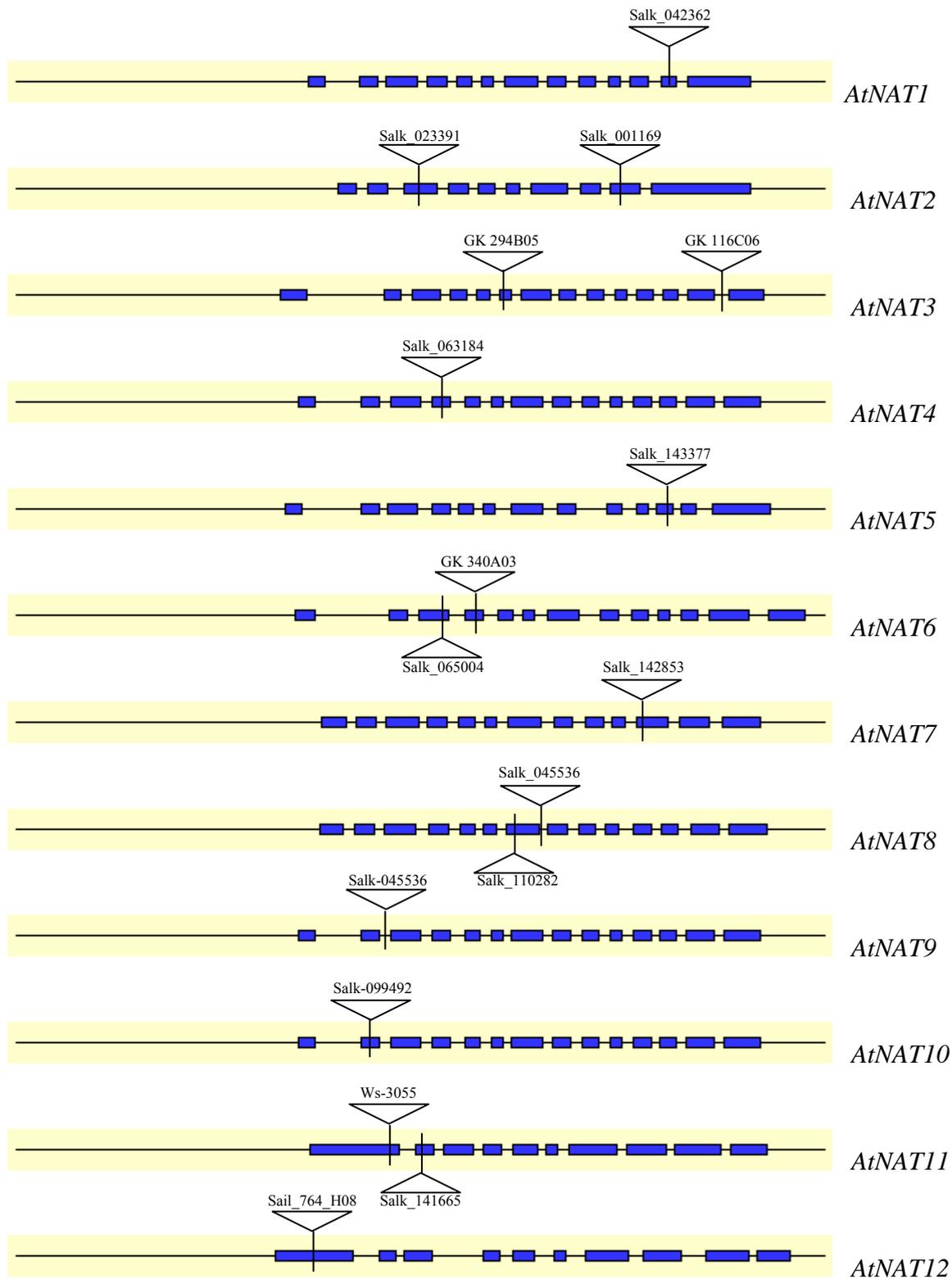


Abbildung 30: Exon/Intron-Struktur und T-DNA Insertionsanalyse in *AtNAT*-Genen.

Exon-Intron Struktur der *AtNAT*-Gene (Grafik von Aramemnon) mit T-DNA Insertionsstellen der untersuchten Insertionslinien. Insertionslinien aufgelistet in Tab. 4 und Tab. 5. ARAMEMNON release 4.0 - June 14, 2006 - ©Flügge Group, Botanical Institute, University of Cologne.

4.4. Experimentelle Untersuchungen von *AtNAT* Knockout-Pflanzen im Zusammenhang mit Ascorbat und Glutathion

Cordoba-Pedregosa *et al.* haben 1996 experimentell nachgewiesen, daß Zwiebelwurzeln auf Medium mit 1 mM Ascorbat um 50 % länger waren als auf Kontrollmedium, und immerhin noch um ca. 27 % auf Medium mit 2 mM L-Galactono-1,4-Lacton, dem direkten Vorläufer von L-Ascorbat in der Ascorbat-Synthese. Die erhöhte Ascorbatkonzentration in den Wurzelzellen wirkt sich hemmend auf die Aktivität von Zellwand assoziierten Peroxidasen aus. Die Peroxidasen vernetzen Zellwandpolymere miteinander, was die Zellwand stabilisiert und die Elongationsrate herabsetzt (Fry, 1986). Ein hoher Ascorbatgehalt führt so zu längeren Wurzeln.

Durch die nahe Verwandtschaft der *AtNAT*-Proteine zu den Ascorbat transportierenden SVCT Transportern von Säugetieren, liegt die Vermutung nahe, daß auch *AtNAT*-Proteine am Ascorbat Transport in der Pflanze beteiligt sein könnten. Einen einfachen experimentellen Ansatz bietet oben beschriebenes Experiment. Eine Funktion der *AtNAT*-Proteine im Ascorbat-Transport müßte in den Knockout-Mutanten auf Medien mit Ascorbat, bzw. L-Galactono-1,4-Lacton, zu deutlich kürzeren Wurzeln verglichen mit dem WT führen, da sie Ascorbat, bzw. die Vorstufe L-Galactono-1,4-Lacton, nicht in ihre Wurzeln aufnehmen könnten, oder nicht weitertransportieren würden.

Für diesen Versuch wurden die *nat* Knockout-Mutanten wie unter Material und Methoden 3.4.1 beschrieben, angezogen und die Wurzeln vermessen. Es ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede im Wurzelwachstum verglichen mit dem WT (Daten nicht gezeigt).

In einem neuen Versuchsansatz sollten die Ascorbat- und Glutathiongehalte, beides starke pflanzliche Antioxidantien, bestimmt werden. Bei einem Ausfall des Ascorbattransportes in einer der Knockout-Linien sollte sich dies auf den Ascorbatgehalt, aber möglicherweise auch auf den Glutathiongehalt der Pflanzen auswirken. Um Unterschiede im Gehalt an Ascorbat und/oder Glutathion (GSH) in den verschiedenen *nat* Knockout-Mutanten (Doppel- und Tripelmutanten) zu untersuchen, wurden Rosettenblätter von Pflanzen geerntet. Die Pflanzen wurden unter moderaten Lichtbedingungen angezogen und Proben wurden genommen bevor und nachdem diese Pflanzen dem Einfluß von Hochlicht ausgesetzt waren (500 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$). Der Gehalt an Ascorbat und GSH wurde mittels HPLC bestimmt (Nele

Horemans, Antwerpen, Belgien). Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Gehalt an Ascorbat oder GSH im Vergleich mit dem Wildtyp gemessen werden, auch nicht im Verhältnis der reduzierten zur oxidierten Form von Ascorbat, bzw. GSH (Daten nicht gezeigt).

5. Untersuchung von *A. thaliana* *Azg1*-Insertionsmutanten und Überexpressionslinien

5.1. Identifikation der *Azg1*-Insertionsmutanten

Um die Transporteigenschaften von AtAzc1 näher zu untersuchen, wurden Knockout-Pflanzen und *CaMV35S::AtAzc1*-überexprimierende transgene Pflanzen untersucht. Es sollten *A. thaliana* Linien gefunden werden, die eine T-DNA Insertion im *AtAzc1* Locus trugen. Dafür wurden Pflanzenpopulationen durch einen „reverse Genetics“ Ansatz durchgemustert.

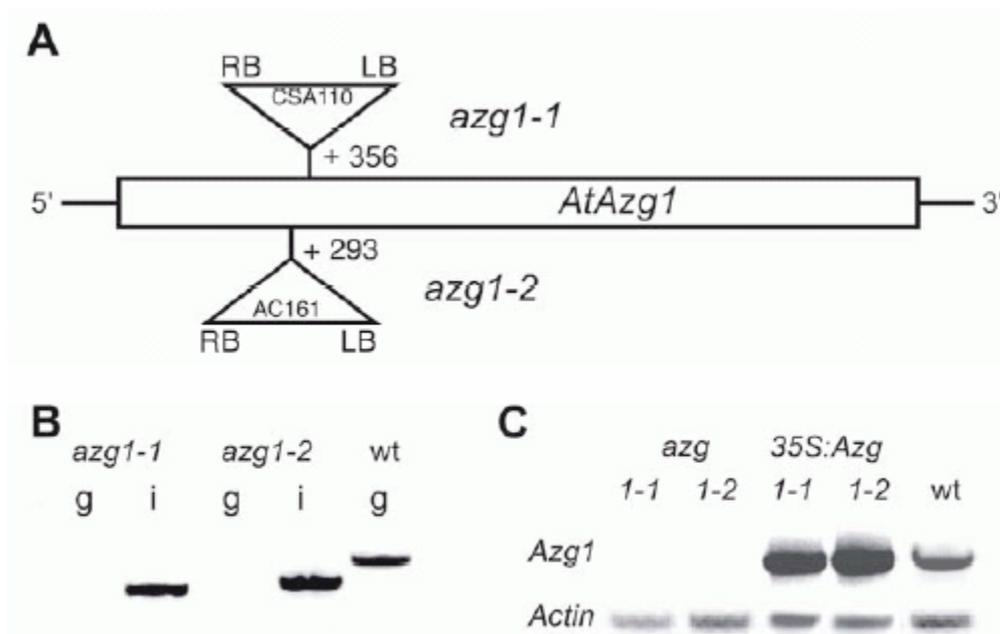


Abbildung 31: Insertions- und Expressionsanalyse von *AtAzc1* Knockout- und Überexpressionslinien. (A) Insertion der T-DNA in das *AtAzc1*-Gen für *azg1-1* und *azg1-2*; RB: Right Border-, LB: Left Border-Sequenz der T-DNA. (B) PCR mit genomischer DNA zur Insertionsanalyse für *azg1-1* und *azg1-2* bestätigt, daß homozygote Pflanzen verwendet wurden. g: es wurden Primer verwendet, um das WT-Allel nachzuweisen, i: es wurden Primer verwendet, die die T-DNA-Insertion nachwies, wt (Wildtyp) als Kontrolle (Primer siehe Tabelle 4). (C) RT-PCR mit cDNA zur Expressionsanalyse die Knockout-Pflanzen *azg1-1* und *azg1-2*, sowie die Überexpressionslinien *CaMV35S::AtAzc1-1* und *CaMV35S::AtAzc1-2*, wt als Kontrolle, Actin als Mengenkontrolle für eingesetzte cDNA.

Es konnten Linien in der Sail und GABI-Kat Kollektion identifiziert werden, die die T-DNA an Position +370 (*azg1-1*) bzw. an Position +293 (*azg1-2*) stromabwärts vom ATG im *AtAzg1*-Gen inseriert hatten (Abbildung 31A und Tabelle 4). Für beide Allele konnten homozygote Insertionslinien isoliert werden (siehe Abbildung 31B).

Die Insertionsstelle wurde durch Sequenzierung mit Primern des Left-Border Bereichs der T-DNA und des Right-Border Bereichs festgelegt. Beide Linien, *azg1-1* und *azg1-2*, konnten als homozygote Linien erhalten werden (Abbildung 31B), keine der beiden homozygoten Linien zeigte eine detektierbare Expression des *AtAzg1*-Gens, wenn eine semiquantitative RT-PCR mit Primern für die gesamte Länge der cDNA durchgeführt wurde (Abbildung 31C).

5.2. Isolierung der *AtAzg1*-Überexpressionslinien

Zur näheren Untersuchung der Funktion von *AtAzg1* wurden Überexpressions-Mutanten hergestellt. Als Pflanzenexpressionsvektor wurde pGreen II gewählt (siehe Material und Methoden 4.3.). Der gesamte kodierende Bereich des *AtAzg1* Gens wurde in pGreen II hinter den *CaMV35S*-Promotor kloniert. Nur homozygote Linien wurden zur weiteren Untersuchung zugelassen. Aus den Blättern der Überexpressionlinien wurde RNA isoliert und nach der cDNA-Synthese eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt (siehe Material und Methoden 3.14.). Abbildung 31C zeigt, daß die Überexpressionslinien eine starke Überexpression des *AtAzg1*-Gens aufwiesen.

5.2.1. Northern-Blot Analyse

Dieselbe RNA, die aus den Blättern der überexprimierenden Pflanzen isoliert und für die semiquantitative PCR in cDNA umgewandelt wurde, wurde auch für einen Northern-Blot verwendet (Abbildung 32). Hier bestätigte sich die Überexpression des *AtAzg1*-Gens, die in der RT-PCR schon gezeigt wurde (siehe Abbildung 31C). Die Expression in WT-Col-0 war so schwach, daß sie hier nicht detektiert werden konnte. Herstellung der Sonden, siehe Material und Methoden 3.13.1.

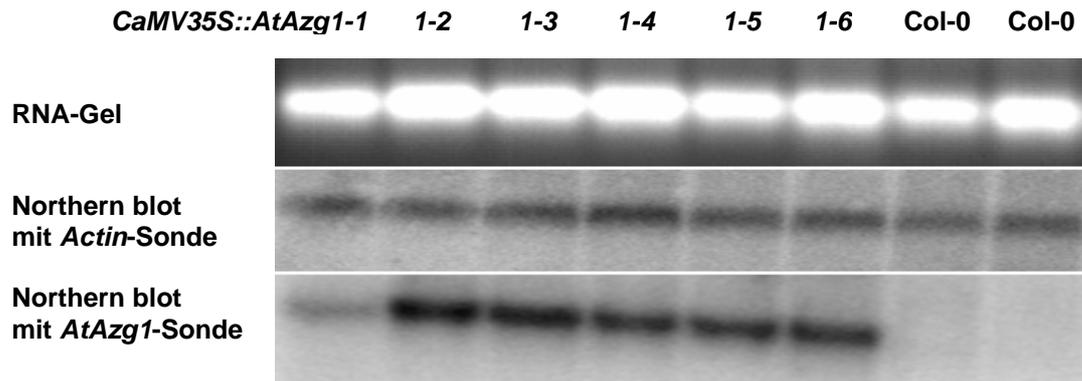


Abbildung 32: Northern Blot von verschiedenen *AtAzg1* Überexpressionslinien. *CaMV35S::AtAzg1-1* und *CaMV35S::AtAzg1-2* sind die im weiteren näher untersuchten Linien. Die obere Reihe zeigt das RNA-Gel vor dem Blot, die Banden resultieren aus der UV-Bestrahlung der Ethidiumbromid-gefärbten RNA. Die mittlere Reihe zeigt die Visualisierung der radioaktiv markierten Banden mit Hilfe des Phosphor Imagers. Das Gleiche gilt für die unterste Reihe. Die Markierung der Banden erfolgte in der untersten Reihe mit einer *AtAzg1*-Sonde (ca. 450 bp) und in der mittleren Reihe mit einer *Actin*-Sonde (ca. 550 bp). Als Kontrolle ist die RNA von zwei unabhängig isolierten Col-0 Pflanzenproben aufgetragen worden.

5.3 Phänotypische Charakterisierung und *in vivo* Transportversuche mit *azg1* Knockout- und *CaMV35S::AtAzg1*-überexprimierenden transgenen Pflanzen

5.3.1. Wachstum auf Hemmstoffen und Cytokinen

Unter Gewächshausbedingungen zeigten weder die Knockout-Pflanzen noch die überexprimierenden Linien einen erkennbaren Phänotyp, der diese Pflanzen vom WT unterschieden hätte. Trotzdem konnten konditionelle Phänotypen unter verschiedenen Bedingungen beobachtet werden.

5.3.1.1. Der Effekt toxischer Purinanaloge auf das Wachstum von Keimlingen

Nach vertikalem Wachstum auf MS-Platten konnte weder in den Knockout-Pflanzen *azg1-1* und *azg1-2* noch in den *CaMV35S::AtAzg1* überexprimierenden Pflanzen ein Unterschied in Entwicklung oder Morphologie im Vergleich zum WT beobachtet werden. Transferiert man aber 10 Tage alte, auf MS-Platten gewachsene Keimlinge auf Platten mit einem MS-Medium, das die toxischen Purinanaloge 8-aza-Adenin oder 8-aza-Guanin enthält (vergleiche Einleitung 3.3.1.1), so ist deutlich eine verzögerte Entwicklung, kleinerer Wuchs und eine Akkumulation von Anthocyanen im WT zu beobachten, während die Knockout-Pflanzen *azg1-1* deutlich besser wuchsen (Abbildung 33).

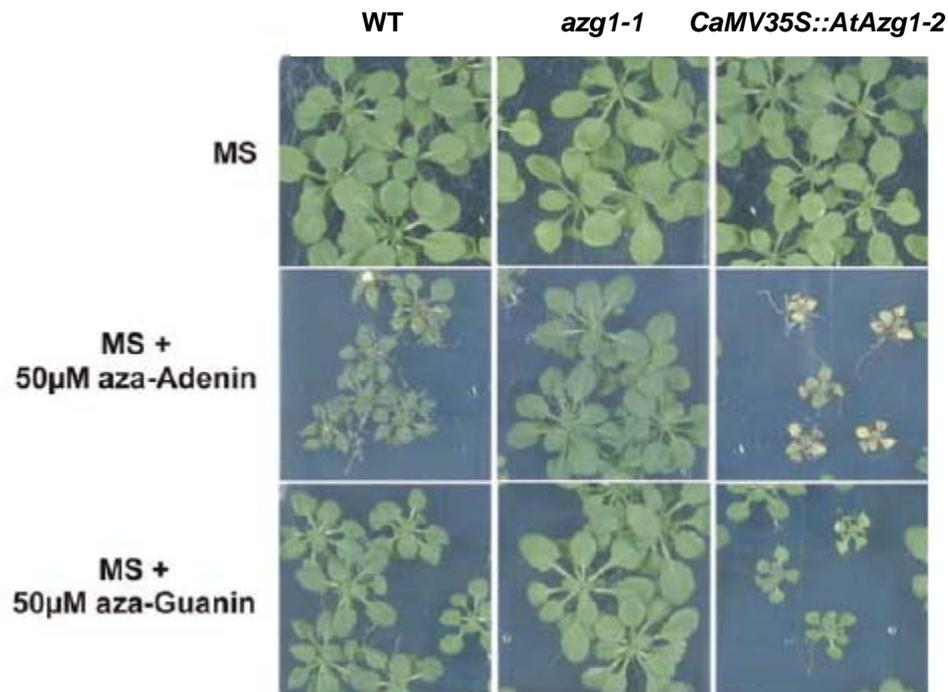


Abbildung 33: Sensitivität von WT, *azg1-1* und *CaMV35S::AtAzg1-2* gegenüber 8-aza-Adenin und 8-aza-Guanin

Im Unterschied dazu wuchsen die *CaMV35S::AtAzg1-2* überexprimierenden Pflanzen noch schlechter als der WT auf diesen toxischen Purinanalogen und zeigten eine verstärkte Akkumulation an Anthocyanen und ein Ausbleichen der Blätter (Abbildung 33). Das gleiche Ergebnis zeigte sich, wenn die zweite Knockout-Linie *azg1-2* und weitere *CaMV35S::AtAzg1-2* überexprimierende Linien unter gleichen Bedingungen getestet wurden.

5.3.1.2 Der Effekt von Cytokinin auf die Entwicklung von Keimlingen

Wenn Pflanzen von außen Cytokinine zugeführt werden, verursacht dies ein Ungleichgewicht im Hormonhaushalt und auffällige Unterschiede in der Entwicklung der Pflanzen. Da sich Cytokinine hemmend beim Transport von Adenin in den Hefemutanten ausgewirkt haben (Benjamin Schumacher, Diplomarbeit 2006), und die Cytokinine außerdem die Expression des *AtAzg1*-Gens beeinflussen, wurden hier Untersuchungen zur Reaktion der pflanzlichen Mutanten im Hinblick auf Cytokinine durchgeführt. Dazu wurden die T-DNA Insertionslinien *azg1-1* und *azg1-2* und die Überexpressionslinien *CaMV35S::AtAzg1-1* und *CaMV35S::AtAzg1-2* auf MS-Medium mit 0,2 µM *trans*-Zeatin ausgesät. Als Kontrolle diente der Wildtyp.

Beim Wildtyp zeigte sich deutlich nach 20 Tagen, daß das Wachstum sowohl der Blattrosetten als auch der Hauptwurzel gehemmt wurde und weniger Seitenwurzeln gebildet wurden (Abbildung 34A und B). Außerdem verfärbten sich die Rosettenblätter gelb. *azg1-1* und *azg1-2* konnten wesentlich besser auf Medium mit 0,2 µM *trans*-Zeatin wachsen. Es bildete sich eine größere Rosette aus und die Blätter färbten sich nicht gelb (Abbildung 34A und B). Die Mutanten bildeten eine größere Anzahl an Seitenwurzeln aus. Dennoch konnte auch bei den Knockout Mutanten ein Effekt durch *trans*-Zeatin beobachtet werden, wenn die *trans*-Zeatin Konzentrationen auf 0,5 µM und 1 µM erhöht wurden. Mit 0,2 µM Kinetin anstatt 0,2 µM *trans*-Zeatin konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

Beim Wachstum der Überexpressionslinien auf *trans*-Zeatin ließ sich ebenfalls ein starker Effekt beobachten (siehe Abbildung 34A und B). Die Reaktion auf *trans*-Zeatin war noch stärker als die des Wildtyps: Die Pflanzen blieben insgesamt kleiner und bildeten eine kleinere, gelblich verfärbte Rosette, eine kürzere Hauptwurzel und nahezu keine Nebenwurzeln.

Um die Transporteigenschaften von AtA zg1, der möglicherweise in der Lage ist, *trans*-Zeatin in die Pflanzenzellen zu transportieren, näher zu untersuchen, wurde in Rosettenblättern die Gewebekonzentrationen von verschiedenen Cytokinin nach der Behandlung mit *trans*-Zeatin bestimmt (Miroslav Strnad, Olomouc, Tschechien). WT und Knockout-Pflanzen zeigten keine Unterschiede in freien oder konjugierten Cytokinin, wenn beide auf MS-Platten gewachsen waren (Abbildung 34C). Wie erwartet, waren erhöhte Cytokinin-Werte in den WT auf MS-Platten mit 0,2 µM *trans*-Zeatin zu beobachten (Abbildung 34D). Sowohl die Werte für *trans*-Zeatin und seine Derivate als auch für Isopentenyladenin und seine Derivate sind im Vergleich zum WT auf MS-Medium erhöht. Besonders gestiegen ist die Konzentration von *trans*-Zeatin-Ribosid im untersuchten Gewebe. Vergleicht man hierzu *azg1-1*, so ist ein leichter Anstieg nur in der Konzentration von *trans*-Zeatin selbst zu beobachten (Abbildung 34D). Somit weist der WT deutlich höhere Konzentrationen an Cytokinin in dem untersuchten Blattmaterial auf, als die Knockout-Mutante *azg1-1*.

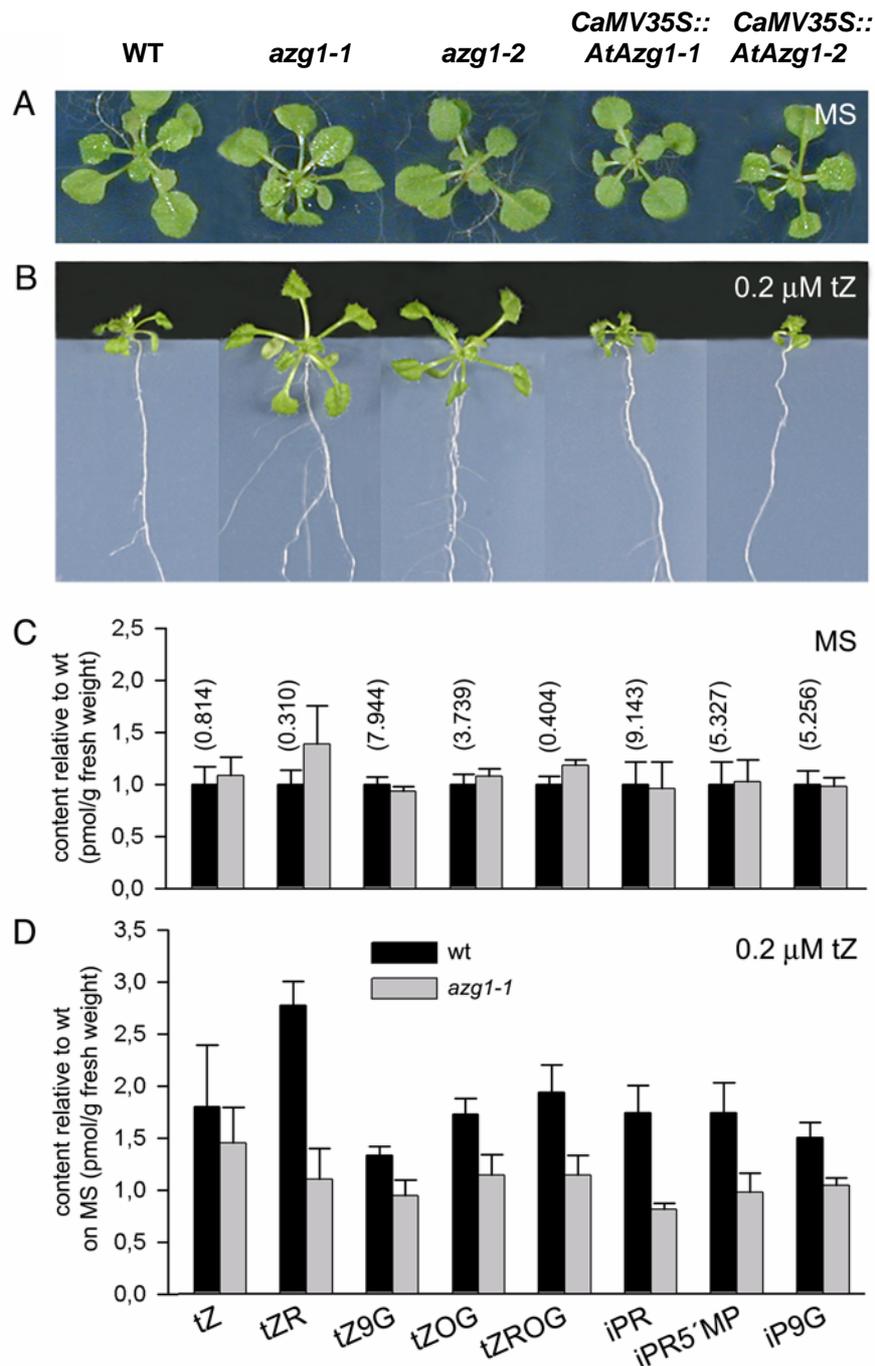


Abbildung 34: Vergleich von WT und *azg1-1* Pflanzen auf MS-Platten mit und ohne *trans*-Zeatin.

(A) drei Wochen alte Keimlinge, auf MS-Platten kultiviert.

(B) drei Wochen alte Keimlinge, auf MS-Platten mit 0,2 μ M t-Zeatin kultiviert.

(C) Endogener Cytokiningehalt in Rosettenblättern von WT und *azg1-1* Pflanzen, auf MS-Platten kultiviert.

(D) Endogener Cytokiningehalt in Rosettenblättern von WT und *azg1-1* Pflanzen, auf MS-Platten mit 0,2 μ M t-Zeatin kultiviert. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von n = 4 unabhängigen Messungen. tZ, *trans*-Zeatin; tZR, *trans*-Zeatinribosid; tZ9G, *trans*-Zeatin-9-Glucoside; tZOG, O-Glucosyl-*trans*-Zeatin; tZROG, O-Glucosyl-*trans*-Zeatinribosid; iPR, Isopentenyl-adeninribosid; iPR-5'MP, Isopentenyl-adeninribosid-5' Monophosphat; iP9G, Isopentenyl-adenin-9-Glucosid. Für jedes Cytokinin, bzw. Cytokininderivat, wurde der relative Wert im Vergleich zum Wert für den WT auf MS-Platten ohne t-Zeatin errechnet, der Wert für den WT auf MS wurde standardisiert auf 1. Der reale Mittelwert für den WT auf MS ist in Klammern über den Balken in C aufgelistet.

5.3.2 *in vivo* Transport von Adenin und Cytokinin durch AtAzg1

Zur weiteren Analyse des *AtAzg1* wurde die Aufnahme von radioaktiv markiertem Adenin in *A. thaliana* Keimlingen bestimmt (siehe Material und Methoden 5.3). Mit diesen Aufnahmeexperimenten in Pflanzen sollte der schon durch die heterologe Expression von *AtAzg1* in Hefemutanten erbrachte Nachweis eines Adenintransportes (Benjamin Schumacher, Diplomarbeit 2006) *in vivo* bestätigt werden, zumal auch die Reaktion der *AtAzg1* Mutanten (Knockout und Überexpressionslinien) indirekt auf eine Aufnahme des toxischen Purinanalogs 8-aza-Adenin über die Wurzeln hinwies.

Hierzu wurden zwei Wochen alte steril angezogene *A. thaliana* Keimlinge in flüssigem MS-Medium inkubiert, dem ^{14}C -Adenin (Endkonzentration $25\ \mu\text{M}$) zugesetzt wurde. Das Substrat konnte so über die gesamte Oberfläche der Pflanze aufgenommen werden. In Abständen von 10 min wurden über 30 min Proben entnommen, gewaschen und die Radioaktivität bestimmt. Aus der Radioaktivität und dem vorher bestimmten Gewicht der Keimlinge konnte die aufgenommene Menge ^{14}C -Adenin in pmol pro mg Frischgewicht bestimmt werden. Wie in Abbildung 35 dargestellt, ist die Aufnahme linear und daher auch die Inkubation mit dem Substrat für 30 min in weiteren Versuchen zulässig, da die Pflanzen in diesem kurzen Zeitrahmen keine Aufnahmelimitation zeigten.

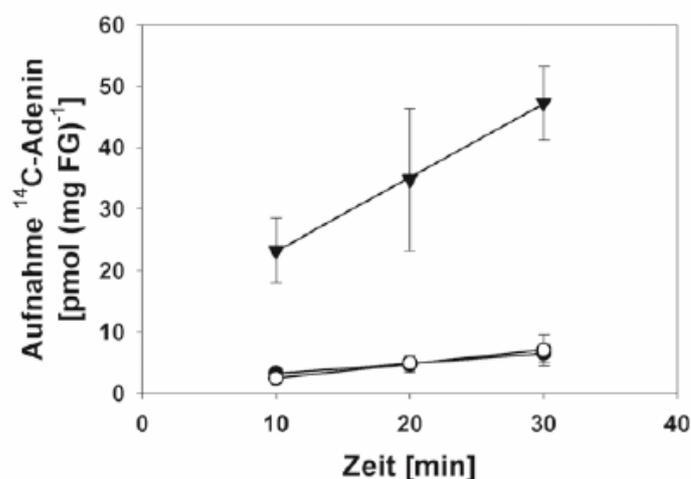


Abbildung 35: Aufnahme von ^{14}C -Adenin in Pflanzen.

Die Aufnahme von ^{14}C -Adenin wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten gemessen. Als Substrat wurde ^{14}C -Adenin in einer Endkonzentration von $25\ \mu\text{M}$ zugesetzt. FG: Frischgewicht. Mittelwert und Standardabweichung errechnet aus $n = 4$ Proben.

- Wildtyp Col-0; ○ *azg1-2* KO-Mutante; ▼ *CaMV35S::AtAzg1-2* Überexpressionslinie.

Die *CaMV35S::AtAzg1* Mutante nahm ca. die 9-fache Menge an Substrat pro Milligramm Frischgewicht im Vergleich zum WT oder *azg1-2* auf. Allerdings gibt es keinen Unterschied zwischen der KO-Mutante *azg1-2*, was auf eine sehr niedrige Transportrate in WT-Pflanzen zurückzuführen sein könnte. Durch diesen Versuch läßt sich belegen, daß die Aufnahme von ^{14}C -Adenin in der Hefezelle auch der Funktion des Transporters in seiner nativen Umgebung in der Pflanze entspricht.

Zur weiteren Charakterisierung der Transporteigenschaften sollte der Transportmechanismus genauer untersucht werden. In Abbildung 36 ist die Abnahme der Aufnahmekapazität des Transporters in der *CaMV35S::AtAzg1-2* Überexpressionslinie durch Diethylstilbestrol (DES), einem ATPase-Inhibitor, deutlich zu erkennen. In der gleichen Zeit wurde mit DES im Medium etwa zwei Drittel weniger an ^{14}C -Adenin in die Pflanzen aufgenommen, als in der Kontrolle ohne DES. Durch die Aufhebung des Protonengradienten über die Membran wird also auch der Transport von ^{14}C -Adenin über die Membran gehemmt.

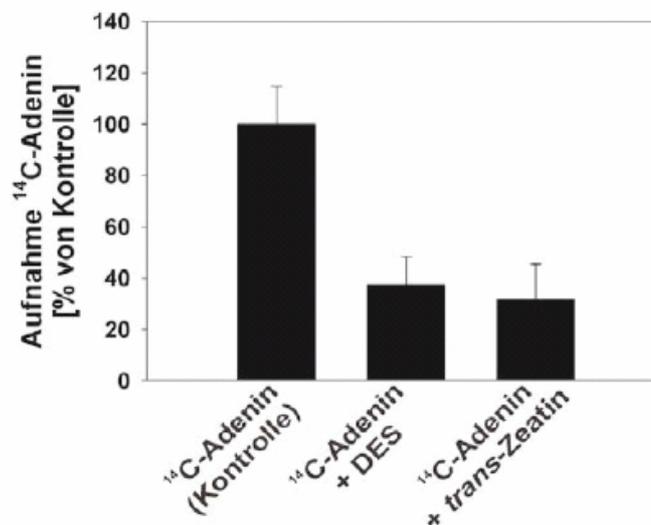


Abbildung 36: Protonenabhängigkeit und Competition der ^{14}C -Adeninaufnahme

Gezeigt ist die ^{14}C -Adeninaufnahme (25 μM) durch *CaMV35S::AtAzg1-2* als Kontrolle ohne weitere Zusätze, die ^{14}C -Adeninaufnahme unter Zugabe von Diethylstilbestrol (DES), die ^{14}C -Adeninaufnahme unter Zugabe von 250 μM *trans*-Zeatin zum Medium. Die Aufnahme wurde nach 30 min gestoppt. Mittelwert und Standardabweichung errechnet aus $n = 4$ Proben.

Die vorliegende Arbeit befasst sich unter anderem mit der Wirkung von *trans*-Zeatin auf *AtAzg1* (siehe Ergebnisse 2.6 und 5.3.2.1.). Der durch diese Ergebnisse implementierte Transport von *trans*-Zeatin durch *AtAzg1* sollte zunächst durch ein Competitionsexperiment untersucht werden. Hierzu wurde *trans*-Zeatin in einem 10-fachen Überschuß als Inhibitor zu

den *in vivo* ^{14}C -Adenin-Aufnahmeexperimenten zugegeben. In Abbildung 36 ist die Auswertung des Versuchs gezeigt. Die Aufnahme des ^{14}C -Adenin ist um ca. zwei Drittel niedriger als in der Kontrolle ohne *trans*-Zeatin. Der Überschuß an *trans*-Zeatin führt somit zu einer Inhibition der Adeninaufnahme. Dies deutet darauf hin, daß *AtAzg1* *trans*-Zeatin zumindest binden kann.

Letztlich wurde der direkte Nachweis für einen Transport von *trans*-Zeatin durch *AtAzg1* mit einem Experiment zum *in vivo* Transport von ^3H -*trans*-Zeatin erbracht. Das Experiment war ähnlich aufgebaut, wie die Aufnahme von ^{14}C -Adenin, nur wurde als Substrat nicht ^{14}C -Adenin sondern ^3H -*trans*-Zeatin eingesetzt. Es wurde wieder ein Ansatz gewählt, bei dem nach 10, 20 und 30 Minuten die Aufnahme des markierten Substrats bestimmt wurde. Die Auswertung ist in Abbildung 37 gezeigt. Die Aufnahme verläuft linear und zeigt, dass die *CaMV35S::AtAzg1-2*-Linie ca. 10 pmol radioaktiv markiertes *trans*-Zeatin pro mg Frischgewicht innerhalb von 20 min aufnimmt, während WT und KO-Mutante keine Aufnahme zeigen. Insgesamt ist die Aufnahme von *trans*-Zeatin jedoch deutlich geringer als die von Adenin (ca. um den Faktor 3-4). Der Unterschied zwischen den *azg1-2* -Keimlingen und dem WT ist vernachlässigbar gering. Der Transport ist nach 30 Minuten noch nicht gesättigt.

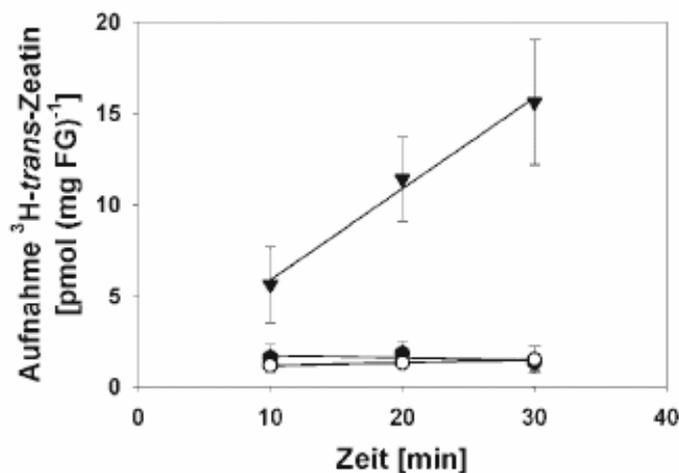


Abbildung 37: Aufnahme von radioaktiv markiertem t-Zeatin in *A. thaliana*.

Die Aufnahme von ^3H -t-Zeatin wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten gemessen. Als Substrat wurde ^3H -t-Zeatin in einer Endkonzentration von $25\ \mu\text{M}$ zugesetzt. Mittelwert und Standardabweichung errechnet aus $n = 4$ Proben. ● Wildtyp Col-0; ○ *azg1-2* KO-Mutante; ▼ *CaMV35S::AtAzg1-2* Überexpressionslinie.

Die geschilderten Ergebnisse zeigen, daß es sich bei *AtAzg1* um einen von einem Protonengradienten abhängigen Adenintporter handelt, der ebenfalls *trans*-Zeatin transportiert. Dieser Befund paßt außerdem zu den zuvor gemachten Beobachtungen im Hinblick auf die Auswirkung von 8-aza-Adenin und *trans*-Zeatin auf das Wachstum von *AtAzg1* Mutanten (Knockout-Pflanzen und Überexpressionslinien) im Vergleich zum WT, sowie dem verminderten Gehalt an Cytokinin im Blattmaterial von *azg1-1* im Vergleich mit dem WT nach einem Fütterungsexperiment mit *trans*-Zeatin.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die *A. thaliana* Mitglieder der Nukleobase/Ascorbat-Transporterfamilie identifiziert und eine nähere Charakterisierung vorgenommen. Dies beinhaltete die phylogenetische Einordnung der 12 in *A. thaliana* identifizierten Gene in vier der fünf Subfamilien der pflanzlichen NAT-Familie. Zusätzlich wurden NAT-typische Sequenzähnlichkeiten aufgezeigt und auf die wahrscheinliche Anzahl der Transmembrandomänen, die für die individuellen *AtNAT*-Mitglieder zwischen 11 und 13 liegt, eingegangen. Die mit der NAT-Familie eng verwandte *Azg*-Familie wurde ebenfalls charakterisiert. Sie besteht in *A. thaliana* aus zwei Mitgliedern, von denen eines, *AtAzg1*, in dieser Arbeit näher untersucht wurde.

Für alle zu untersuchenden Membranproteine wurden Promotor-GUS Konstrukte hergestellt, in WT-Pflanzen transformiert und GUS-Expressionsstudien durchgeführt. Parallel hierzu wurde die Expression jedes Transporters in verschiedenen Pflanzengewebe mit semiquantitativer RT-PCT untersucht. Die Expression konnte, außer für *AtNAT10*, in verschiedenen Geweben und Organen der Pflanzen lokalisiert werden. Mit Ausnahme von *AtNAT7 -10* werden alle *AtNATs* in Leitgewebe der Blätter, der Wurzel, oder in Leitgewebe der Blättern und Wurzeln exprimiert.

Für *AtAzg1* und außerdem für *AtNAT7* und *AtNAT8* konnte eine Induktion der Expression unter spezifischen Bedingungen beobachtet werden: Bei *AtAzg1* konnte eine GUS-Färbung in Gewebe der Wurzel nachgewiesen werden, wenn Cytokinine in das Flüssigmedium gegeben wurden, bzw. diese Pflanzen auf Medium mit verschiedenen Cytokinin umgesetzt wurden. Dieser Befund konnte durch semiquantitative RT-PCR bestätigt werden. Bei *pAtNAT7::GUS*

und *pAtNAT8::GUS* transformierten Pflanzen wurde die GUS-Induktion unter anderem durch von *Agrobacterium tumefaciens* hervorgerufene Tumoren eingeleitet. Es konnte eine Expression von *AtNAT7* und *AtNAT8* in Kalluskulturen sowohl durch GUS-Expressionsstudien als auch durch semiquantitative RT-PCR nachgewiesen werden.

Die subzelluläre Lokalisation von GFP-Fusionskonstrukten in *A. thaliana*-Zellkulturen, bzw. Zwiebelepidermiszellen, zeigte eine Lokalisation von *AtNAT7*, *AtNAT8*, *AtNAT12* und *AtAzg1* in der Plasmamembran.

Zu den Transportern der *AtNAT*-Familie wurden umfangreiche Studien durchgeführt, die sich mit der Reaktion von T-DNA-Insertionslinien auf verschiedene Stressbedingungen befassten. Zu allen *AtNAT*-Genen wurden Knockout-Linien isoliert und auf Zygotie untersucht. Anschließend wurde die Genexpression analysiert, um Nullmutationen zu bestätigen. Letztlich wurde eine Reihe von Studien zur näheren Charakterisierung eines eventuellen Phänotyps durchgeführt: Pflanzen wurden unter verschiedenen Mangelbedingungen (PO_4^- , SO_4^- , NO_3^- , Fe^{3+}), auf Medien mit toxischen Zusätzen (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Paraquat), auf Medien mit Ascorbat oder L-Galactono-1,4-Lacton und unter veränderten Umweltbedingungen (erhöhte Lichtintensität, UV-Licht, Trockenstreß) angezogen. Außerdem wurde in Doppel- und Tripelmutanten der Gehalt an Ascorbat und Glutathion bestimmt und mit dem WT verglichen. Keine der Knockout-Pflanzen zeigte eine vom Wildtyp abweichende Reaktion auf diese Bedingungen. Es konnte somit bei keiner der Knockout-Pflanzen der *AtNAT*-Familie ein Phänotyp nachgewiesen werden, obwohl auch Doppel- und Tripel-Mutanten hergestellt und untersucht wurden.

AtAzg1 zeigte einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp sowohl in Knockout- als auch in überexprimierenden Pflanzen. Die *AtAzg1* Knockout-Mutanten *azg1-1* und *azg1-2* zeigten eine wesentlich geringere Wachstumshemmung durch 8-aza-Adenin, 8-aza-Guanin und Cytokininen als Col-0 Wildtyp Pflanzen. Die *CaMV35S::AtAzg1* überexprimierenden Linien zeigten auf diesen Medien ein zu den Knockout Mutanten antagonistisches Verhalten, d.h. eine noch stärkere Beeinflussung des Wachstums als die Wildtyp-Kontrolle. In der Knockout Mutante *azg1-1* konnten geringere Gehalte an verschiedenen Cytokininen und Cytokininderivaten im Vergleich mit dem Wildtyp gemessen werden, wenn *azg1-1* und Wildtyp auf Medium mit *trans*-Zeatin angezogen wurden. Offensichtlich findet eine Aufnahme oder Weiterleitung dieser Stoffe durch den untersuchten Transporter statt. Diese

Annahme konnte erfolgreich durch „*in vivo*“ Transportmessungen mit den *CaMV35S::AtAzg1-2* überexprimierenden Pflanzen bestätigt werden. Es hat sich gezeigt, daß *AtAzg1* in Pflanzentransportexperimenten Adenin und *trans*-Zeatin mit hoher Affinität transportiert.

IV Diskussion

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der molekularen Charakterisierung von Mitgliedern zweier neuer putativer Purin-Transporterfamilien in *Arabidopsis thaliana*. In den Ergebnissen wurden beide Familien gemeinsam besprochen. Hier sollen beide Familien, die *AtNAT*-Familie und die *AtAzg*-Familie, getrennt voneinander diskutiert werden.

1. Nukleobase/Ascorbat-Transporter

Durch die Analyse des phylogenetischen Stammbaums konnte gezeigt werden, daß sich die 12 Gene der *AtNAT*-Familie auf vier von fünf Subfamilien der pflanzlichen *NAT*-Familie verteilen. Keines der *A. thaliana* *NAT*-Proteine befindet sich mit *Lpe1* aus Mais in einer Subfamilie des *NAT*-Stammbaumes (Ergebnisse 1.2., Abbildung 9 und 10). *Lpe1* ist jedoch bis heute der einzige pflanzliche *NAT* mit bekannten Substraten (Xanthin, Harnsäure, siehe Einleitung 3.2.; Li und Schultes, 2002). Die vorliegende Arbeit befaßt sich ausführlich mit der individuellen Expression der 12 *AtNAT*-Gene und der Charakterisierung der jeweils zugehörigen Knockout-Pflanzen, bzw. deren Kreuzungen. Zur Expressionsanalyse wurden zu jedem einzelnen Gen Promotor-GUS Studien durchgeführt und für drei der 12 Gene zusätzlich die intrazelluläre Lokalisation mittels GFP-Fusionskonstrukten untersucht.

Für alle *AtNATs*, außer *AtNAT7*, -8, -9 und -10, wurde eine erhöhte GUS-Aktivität in den Leitbahnen und den umliegenden Geweben festgestellt (siehe Ergebnisse 2.3). Dies könnte auf eine Bedeutung der *AtNATs* im Langstreckentransport hinweisen. Die unter ARAMEMNON zusammengefaßte Vorhersage für 11 von 12 *AtNAT* Proteinen zur Lokalisation in der Plasmamembran steht dieser Interpretation nicht entgegen. Für *AtNAT12* wurde von verschiedenen Vorhersageprogrammen unter ARAMEMNON eine Lokalisation in Plastiden vorhergesagt. Diese Aussage wurde aber in der vorliegenden Arbeit widerlegt. Für *AtNAT12* ebenso wie auch für *AtNAT7* und *AtNAT8* wurde mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen eine Lokalisation der Proteine in der Plasmamembran nachgewiesen (siehe Ergebnisse 3.1., Abbildung 27).

Es gibt eine große Bandbreite an Substraten, die von *AtNATs* transportiert werden könnten. Transportiert werden müssen in Pflanzen grundsätzlich alle Substanzen (oder deren geeignete

Vorstufen), die in den heterotrophen Zellen nicht synthetisiert werden können (Strasburger, Lehrbuch der Botanik, 1998). Zumeist sind deswegen die mengenmäßig häufigsten Transportsubstanzen im Langstreckentransport Zucker. Durch Analysen des Phloemsaftes wurden unter anderem Aminosäuren, andere Stickstoffverbindungen, Nukleinsäuren und ihre Bausteine, auffallend hohe Konzentrationen von ATP, Vitamine, organische Säuren, Enzyme, Hormone, Ubiquitin, Chaperone und anorganische Komponenten nachgewiesen (Läuchli, 1972; Ziegler, 1975; Zimmermann und Ziegler, 1975; Lohaus *et al.*, 1994; Baker, 2000a; Baker, 2000b; Lalonde *et al.*, 2003).

Obwohl die Beteiligung mehrerer *AtNAT*-Gene im Langstreckentransport möglich ist, gibt es Hinweise auf weitere wichtige Funktionen. Die GUS-Expression von *pAtNAT4::GUS* in den Filamenten der Antheren und in den Papillen der Narbe nach der Befruchtung weist auf eine Rückgewinnung von Nährstoffen hin, oder den Transport von Botenstoffen, die ein Ende der Befruchtung signalisieren. Das *pAtNAT6::GUS* Konstrukt wird ebenfalls in den Filamenten der Antheren und in der Region des Griffels exprimiert. *AtNAT4* und *AtNAT6* haben möglicherweise beide eine Funktion in, bzw. nach der Befruchtungsphase. Vor, während und nach der Befruchtung wird besonders der Transport von Hormonen und deren Vorstufen und auch von mobilisierten Zuckern zur Signalübermittlung zwischen den einzelnen Blütenorganen angenommen (O'Neill, 1997). Die GUS-Expression für das *pAtNAT9::GUS*-Konstrukt konnte ausschließlich im Gewebebereich um Hydathoden beobachtet werden. Möglicherweise dient der Transporter dort zur Rückgewinnung von energiereichen Verbindungen aus der austretenden Flüssigkeit. Für den unter anderem in den Epithelzellen von Hydathoden exprimierten *AtPUP1* wird eine Rolle bei der Rückgewinnung von Cytokininen aus dem Xylemsaft vermutet (Bürkle *et al.*, 2003). Das Konstrukt *pAtNAT12::GUS* wird konstitutiv in allen Geweben, außer in Staubbeuteln und Pollen, exprimiert. Die Rolle von *AtNAT12* in der Pflanze ist somit als eher generell einzustufen. In Staubbeuteln und Pollen konnte zu keinem der *AtNAT-Promotor::GUS*-Konstrukte eine Expression festgestellt werden.

Li *et al.* haben (2002) eine Arbeit zu Promotor-GUS Studien von *AtNAT6* veröffentlicht. Demnach wird *AtNAT6* hauptsächlich im Transmissionsgewebe des Griffels und den Tapetum-Zellen der Antheren exprimiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch unter der Promotor::GUS-Aktivität von *AtNAT6* eindeutig eine starke GUS-Expression in allen Leitgeweben, sowohl im Sproß als auch in der Wurzel, sowie in den an das

Leitgewebe angrenzenden Zellen. Dieses Ergebnis wird von den gesammelten Microarray-Chipdaten auf der Genevestigator-Webseite unterstützt. Unter “*Gene Atlas*” ist eine starke Expression des *AtNAT6*-Gens in nahezu allen Pflanzenorganen zu finden. Eher niedriger als in den übrigen Geweben ist hingegen die Expression in Antheren und Pollen. (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>, Zimmermann *et al.*, 2004). Dies entspricht den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen und widerspricht ebenfalls den von Li *et al.* 2002 vorgelegten Untersuchungen. Der Unterschied in den Promotor-GUS Studien könnte an den verwendeten Promotor::GUS-Konstrukten liegen. Li *et al.* (2002) haben ein ca. 2400 bp Fragment der 5'-UTR-Region bis zum Start-Kodon für die Promotor-GUS Expression verwendet, wohingegen in der vorliegenden Arbeit ein kürzeres Stück der 5'-UTR-Region (1562 bp) verwendet wurde, das aber über das Start-Kodon hinaus bis in die Mitte des 1. Introns reichte. Offensichtlich sind in dieser ersten Genregion noch steuernde Elemente für die Genexpression enthalten. In der Regel liegen Promotorsequenzen in der 5'-flankierenden Region eines Gens, manchmal gehören aber auch Bereiche in einem Gen oder 3'-flankierende Sequenzen dazu (Bruhat *et al.*, 1990; Voigtländer *et al.*, 1999). Hierzu zeigen Fu *et al.* (1995a; 1995b) und Sieburth und Meyerowitz (1997), daß Intronsequenzen nicht nur Verstärker an sich, sondern auch Regulatoren der räumlichen und zeitlichen Genexpression sein können. In 3'-flankierenden Bereichen von Genen können z.B. auch Elemente liegen, die die RNA-Stabilität erhöhen (Thornburg *et al.*, 1987; An *et al.*, 1989)

pAtNAT7::GUS und *pAtNAT8::GUS* zeigten eine GUS-Expression in sich entwickelnden Samenanlagen. Durch Hinweise in Genevestigator wurden Expressionsstudien zur Promotorinduktion von *AtNAT7* und *AtNAT8* mit virulenten Agrobakterien durchgeführt. Dadurch konnte in transgenen *AtNAT7::GUS*- und *AtNAT8::GUS*-exprimierenden *Arabidopsis thaliana* eine GUS-Färbung in durch Agrobakterien ausgelösten wucherndem Gewebe beobachtet werden (Ergebnisse 2.4.). Von den Agrobakterien wird ein Teil ihres Genoms in das pflanzliche Genom eingeschleust und löst dort in den infizierten Zellen die Produktion von Cytokinin und Auxin aus (Veselov *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 2005). Dies wiederum stimuliert ein vermehrtes, unkontrolliertes Wachstum von undifferenzierten Zellen (Tumor). Die Promotor-vermittelte Induktion der Genexpression könnte also auch in undifferenziertem Gewebe ausgelöst werden und nicht durch die Agrobakterien verursacht sein. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Experimente mit Kalluskulturen durchgeführt. Tatsächlich war die GUS-Expression auch in Kallusgeweben aus *pAtNAT::GUS* transgenen Pflanzen nachzuweisen (Ergebnisse 2.4.). Da hier das Gewebe stark gefärbt war, ist es sehr

wahrscheinlich, daß die Expression besonders in undifferenzierten Zellen hochreguliert wird, und nicht, wie zuerst vermutet, durch die Anwesenheit der Agrobakterien. Das Transkript für *AtNAT7* und *AtNAT8* konnte mit RT-PCR sowohl in Tumorgewebe als auch in Kalluskulturen nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse 2.4). Ob diese Expression in undifferenziertem und embryonalem Gewebe in einem Zusammenhang steht, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Der Transport von Hormonen oder die Konzentrierung verschiedener Substanzen in undifferenziertem oder embryonalem Gewebe kann aber der Determination/Differenzierung von Zelltypen und Organen dienen (Stephen und Lawrence, 2000; Dolan und Langdale, 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Expression von *AtNAT7* und *AtNAT8* kann mit den für Arabidopsis-Gene gesammelten Transkriptionsdaten auf der Genevestigator-Internetseite verglichen werden. Hier finden sich unter „Gene Atlas“ für die beiden Gene *AtNAT7* und -8 hohe Transkriptmengen in Schoten (1424 Einheiten, bzw. 5248 Einheiten). Dies entspricht der in dieser Arbeit belegten Expression von *AtNAT7* und *AtNAT8* in den Samenanlagen (Fruchtknoten, bzw. Schoten). Für Kalluskulturen wurde für *AtNAT7* und -8 nur eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge (550 Einheiten, bzw. 640 Einheiten) im Vergleich mit anderen Geweben angegeben. Transkriptmengen, die für die übrigen Gewebe angegeben wurden, liegen vergleichsweise sehr niedrig (ca. um 200-300 Einheiten). Die in Genevestigator gezeigten Daten bestätigen die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen für die Expression von *AtNAT7* und *AtNAT8*.

Trotz der für alle *AtNAT*-Gene außer *AtNAT10* nachgewiesenen Expression, vorwiegend in Leitgeweben, aber auch in einigen anderen Geweben, konnte in isolierten Knockout-Mutanten, sowie Doppel- und Tripel-Mutanten der *AtNATs* kein aussagefähiger Phänotyp beobachtet werden, obwohl verschiedene Metabolitmessungen und umfangreiche Tests durchgeführt wurden (Ergebnisse 4.). Auch die *nat12* Mutante zeigt keinen Phänotyp, obwohl das *pAtNAT12::GUS*-Konstrukt in Pflanzen eine konstitutive Expression in fast allen Geweben aufweist. Eine Kreuzung mit einer Knockout-Mutante des ebenfalls konstitutiv (außer in Wurzeln) exprimierten Purintransporters *AtPUP1* (hochspezifisch für Adenin und Cytosin, aber möglicherweise auch für andere Purinderivate, Cytokinine und Alkaloide; Gillissen *et al.*, 2000; Bürkle *et al.*, 2003) könnte einen informativen Phänotyp hervorrufen, da die Funktion von *AtNAT12* in der Knockout-Mutante *nat12* möglicherweise durch *AtPUP1* ersetzt wird. Es ist möglich, daß eine andere Kombination von *nat* Knockout-

Mutanten zu einem Phänotyp führt. Nishimura *et al.* konnten 2004 erst mit einer *ahk2-1 ahk3-1 ahk4-1* Tripelmutante aus drei Genen, die Sensor-Histidin-Kinasen exprimieren, einen Phänotyp unter verschiedenen Wachstumsbedingungen hervorrufen, bei dem die Einzelmutanten kaum einen sichtbaren Unterschied zum WT zeigten. Ebenso konnte eine *yuc1 yuc2 yuc4 yuc6* Quadrupel-Mutante der YUCCA-Gene aus Arabidopsis einen Phänotyp hervorbringen, der bei den Doppelmutanten aus *yuc1 yuc4* oder *yuc2 yuc6* noch nicht sichtbar war (Cheng *et al.*, 2006).

In der Arbeitsgruppe von Prof. Flügge wurden bereits verschiedene Untersuchungen zu den Transporteigenschaften der AtNATs durchgeführt. Weder durch Komplementationsstudien mit *Saccharomyces cerevisiae* (getestete Substrate: Adenin, Adenosin, Guanin, 8-aza-Guanin, Hypoxanthin, Cytosin, Uridin) und *Aspergillus nidulans* (getestete Substrate: Adenin, Guanin, Xanthin, Hypoxanthin, Harnsäure) konnten Hinweise auf die Transportfunktion erhalten werden, noch durch Aufnahmestudien mit radioaktiv markierten Substraten (Guanin, Adenin, Thymin, Cytosin, Hypoxanthin, Uracil, Ascorbat). Ebenso führten elektrophysiologische Aufnahmeexperimente in *Xenopus laevis* Oocyten (getestet: Adenin, Allantoin, Xanthin, Hypoxanthin, Uracil und Ascorbat) nicht zur Identifizierung des Transportsubstrates (Markus Gierth, Verónica Maurino und Marcelo Desimone, persönliche Mitteilung).

Welche Funktion die AtNATs auch haben mögen, sie ist möglicherweise nicht zwingend notwendig, oder kann durch andere Transporter (aus der NAT-Familie oder aber auch aus anderen Transporter-Familien) ersetzt werden. Es ergab sich durch all diese Experimente kein Hinweis, daß eines der genannten Substrate durch *A. thaliana* NATs transportiert wurde. Es ist nicht auszuschließen, daß vollkommen andere Substrate transportiert werden als die bisher angenommenen. Wie schon erwähnt, ist keines der AtNAT-Proteine mit Lpe1 aus Mais in einer Subfamilie des NAT-Stammbaums. Dies kann darauf hindeuten, daß auch die Substratspezifität eine andere ist und tatsächlich keines der AtNAT-Proteine z.B. Xanthin oder Harnsäure transportiert. Auch die Fähigkeit der AtNAT-Proteine zum Transport anderer Purine oder Pyrimidine ist bisher unbestätigt.

Die Sequenzähnlichkeit tierischer Ascorbat-Transporter der NAT-Familie (Daruwala *et al.*, 1999; Tsukaguchi *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2001, siehe Einleitung 3.2.) zu pflanzlichen NAT-Proteinen kann ein Hinweis darauf sein, daß auch von pflanzlichen NAT-Proteinen ein Transport von Ascorbat durchgeführt wird. Zwei wichtige Funktionen des Ascorbats in

Pflanzen liegen in seiner Rolle als Antioxidant in der Photosynthese, sowie in der Umwandlung von Violaxanthin im Xanthophyllzyklus (Asada 1994; Foyer *et al.*, 1994; Smirnoff 1995; Smirnoff 2000b, Muller-Moule *et al.*, 2002). Beide Funktionen spielen eine wichtige Rolle beim Schutz des Photosyntheseapparates vor überschüssiger Lichtenergie. Da die Biosynthese von Ascorbat in Chloroplasten bisher nicht nachgewiesen werden konnte, wird ein Transport von Ascorbat aus dem Cytosol in den Chloroplasten angenommen (Horemans *et al.*, 2000, Smirnoff 2000b). Für drei AtNATs, AtNAT7, -8 und -12, konnte jedoch eine Lokalisation in der Plasmamembran nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse 3.1, Abbildung 27). Auch für die übrigen AtNAT-Proteine wurde von verschiedenen Vorhersageprogrammen unter ARAMEMNON eine Lokalisation in der Plasmamembran vorhergesagt. Somit ist ein Transport von Ascorbat über die Chloroplastenmembran durch AtNATs unwahrscheinlich. Die von uns durchgeführten Experimente mit L-Ascorbinsäure, bzw. L-Galactono-1,4-Lacton (siehe Ergebnisse 4.4.) und die UV- und Lichtstreibversuche (siehe Ergebnisse 4.2.) weisen ebenfalls auf keinen Zusammenhang zwischen Ascorbat und AtNAT-Proteinen hin. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ascorbat- und Glutathionmessungen des Blattgewebes an den Doppel-, bzw. Tripel-Knockoutmutanten durchgeführt, um Unterschiede in den Gehalten aufzuspüren, welche einerseits auf eine Streßsituation, andererseits auf einen Zusammenhang mit Ascorbattransport hätte hindeuten können. Die getesteten *AtNAT*-Doppel- bzw. Tripel- Knockout-Pflanzen zeigten weder veränderte Ascorbat- noch Glutathiongehalte im Vergleich mit dem WT (siehe Ergebnisse 4.4.). Die Möglichkeit eines Ascorbat-Transportes über die Plasmamembran durch AtNAT Proteine ist nicht ausgeschlossen. Dennoch lassen die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse, sowie gesammelte Microarray- Daten zur *A. thaliana vtc1* Mutante (Conklin *et al.*, 1997; Pastori *et al.*, 2003; Olmos *et al.*, 2006), nicht auf eine Beteiligung der AtNAT Proteine schließen.

2. Azg-Transporter

Cecchetto *et al.* charakterisierten 2004 den schon länger bekannten *AzgA* Purin Transporter aus *Aspergillus nidulans*. Außer Aufnahmestudien zur Festlegung der Transporteigenschaften führten sie auch Inhibitionsstudien mit einer großen Anzahl an Substraten durch. Zusätzlich wurde der Transporter phylogenetisch untersucht und eine neue Transporterfamilie, bzw. Subfamilie, postuliert. Untersuchungen zeigten, daß der *AzgA* Purin Transporter auf einem Ast des phylogenetischen Baumes der *NAT*-Familie liegt und somit mit dieser möglicherweise verwandt ist. In dem von Cecchetto *et al.* (2004) vorgestellten phylogenetischen Stammbaum

sind außer *AzgA*-ähnlichen Genen unterschiedlicher Organismen, wie z. B. *A. thaliana*, *N. crassa* und *S. pombe*, auch beispielhaft einige Vertreter der NAT und PUP-Familien vertreten. Obwohl die untersuchten Proteine eine starke Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen, zeigen die *AzgA*-ähnlichen Proteine, unter anderem von *A. thaliana*, eine geringere Konservierung in der „NAT-Erkennungssequenz“ als sie für Mitglieder der NAT-Familie typisch ist und auch in den anderen konservierten Bereichen weniger Ähnlichkeit (Cecchetto *et al.*, 2004). Deswegen werden die zu *AzgA*-ähnlichen Gene einer neuen Familie zugeordnet, die möglicherweise eine phylogenetische Verwandtschaft zur NAT-Familie aufweist (Cecchetto *et al.*, 2004).

Im Genom von *A. thaliana* wurden durch Sequenzvergleiche (BLAST-Suche) in der nicht-redundanten NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>) zwei zu *AzgA* ähnliche Gene identifiziert: *AtAzg1* und *AtAzg2*. Ein Alignment von *AtAzg1* und *AtAzg2* zeigt starke Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz (Abbildung 14). Dies spiegelt sich auch im Hydrophobizitäts-Blot wider (Abbildung 15C). Die Ähnlichkeit ist auch auf Nukleinsäurebasis konserviert. Zusätzlich zu den zwei *A. thaliana* *Azg*-Proteinen konnten einige weitere zu *AzgA* aus *A. nidulans* ähnliche Proteine von Pflanzen, Bakterien und Pilzen identifiziert werden, die noch nicht im phylogenetischen Stammbaum von Cecchetto *et al.* (2004) aufgenommen waren (Abbildung 13).

Durch semiquantitative RT-PCR konnte eine Expression des *AtAzg1* in allen untersuchten Geweben, besonders in jungen Blättern, Blüten und Wurzeln nachgewiesen werden (Abbildung 17). Um die gewebespezifische Expression des *AtAzg1* Proteins noch genauer untersuchen zu können, wurde die Promotorregion und ein Teil der kodierenden Sequenz des *AtAzg1* Gens vor das GUS Reporter-gen kloniert und in *A. thaliana* transformiert. Im Unterschied zu den Resultaten aus der semiquantitativen RT-PCR konnte die GUS-Expression hauptsächlich in den Wurzelsystemen und dem Hypokotyl aller unabhängigen *AtAzg1::GUS*-Linien gefunden werden. Diese Diskrepanz könnte an der Abwesenheit von zusätzlichen Promotorelementen /-verstärkern liegen, die nicht durch die für das Promotorkonstrukt benutzte Sequenz abgedeckt sind. Es gibt Promotor- und Enhancerelemente, die bis zu 10.000 bp vor dem Gen liegen, und für die optimale Transkription des Gens sorgen (Pinkert *et al.*, 1987), bzw. in oder hinter dem Gen (Bruhat *et al.*, 1990; Fu *et al.* 1995a; Fu *et al.*, 1995b; Sieburth und Meyerowitz 1997; Voigtländer *et al.*, 1999). Zu den Ergebnissen der RT-PCR ist zu bemerken, daß eine hohe Anzahl an

Amplifikationszyklen verwendet wurde um sichtbare Banden zu bekommen. Unter Genevestigator konnte ebenfalls nur eine sehr niedrige Expression für *AtAzg1* in den Arabidopsis Expressionsstudien gefunden werden (Genevestigator, <http://www.genevestigator.ethz.ch/>). Diese niedrige Genexpression kann auf eine allgemein niedrige Genexpression hindeuten, oder darauf, daß die Genexpression nur unter bestimmten Bedingungen auftritt. Dies scheint für *AtAzg1* zumindest für die Expression in Wurzeln der Fall zu sein.

Zu der Expression läßt sich zusammenfassend sagen, daß *AtAzg1* eine entwicklungsabhängige Expression in Wurzeln, Hypokotyl, Blättern und Blüten zeigte. Offensichtlich ist die Expression von *AtAzg1* stark reglementiert, teilweise durch zeitliche Einflüsse, bzw. das Alter der Pflanze, aber auch durch Umweltfaktoren, wie die Unterschiede zwischen MS-Platten, Erde und Flüssigkultur deutlich machen (Ergebnisse 2.5.). Eine Induktion der *AtAzg1* Promoteraktivität konnte durch Cytokinine ausgelöst werden (Ergebnisse 2.6.).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten GFP-Fusionsanalysen belegen eindeutig eine Lokalisation des *AtAzg1* Transporters in der Plasmamembran (Ergebnisse 3.2, Abbildung 29). Dies entspricht dem auf ARAMEMNON aus verschiedenen Vorhersageprogrammen zusammengefaßten Konsens (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>). Der durch *AtAzg1* vermittelte Transport findet somit zwischen Zellen und nicht zwischen Zellkompartimenten statt.

Der in dieser Arbeit gezeigte direkte Nachweis des Transportes von Adenin und *trans*-Zeatin durch *AtAzg1* in Pflanzen (Ergebnisse 5.3.2.) ist ein erster wichtiger Schritt zur Funktionsaufklärung des *AtAzg1*-Gens. Adenin und *trans*-Zeatin sind sich strukturell ähnlich, mehr noch, Adenin ist ein Vorläufer in der *trans*-Zeatin Synthese (Chen *et al.*, 1985; Dickinson *et al.*, 1986) und entsteht auch beim Abbau von Cytokinen durch die Cytokininoxidase (Armstrong *et al.*, 1994; Werner *et al.*, 2001). Erstaunlicherweise transportiert AtPUP1 ebenfalls Adenin mit hoher Affinität und auch *trans*-Zeatin, daß den Transport von Adenin nachweislich kompetitiv ($K_i = 35 \mu\text{M}$) hemmt (Bürkle *et al.*, 2003; Gillissen *et al.*, 2000). *AtPUP1* ist im Gegensatz zu *AtAzg1* in allen Pflanzenorganen, außer den Wurzeln, exprimiert (Bürkle *et al.*, 2003; Gillissen *et al.*, 2000). Der in dieser Arbeit näher charakterisierte *AtAzg1*-Transporter ist, zumindest nach den Promotor-GUS Studien, hauptsächlich in den verschiedenen Geweben der Wurzel aktiv (Ergebnisse 2.5.). Dies kann

ein Hinweis auf eine Zusammenarbeit der beiden Transporter in der Pflanze in Hinblick auf den Transport von Adenin und *trans*-Zeatin sein.

Bisher konnte der Transport von Adenin und *trans*-Zeatin in Arabidopsis-Keimlingen durch die *CaMV35S::AtAzg1* überexprimierenden transgenen Linien nachgewiesen werden. Dies liegt wahrscheinlich an der niedrigen Expression des *AtAzg1*-Gens im WT unter normalen Bedingungen, wodurch offensichtlich ein Unterschied zwischen Knockout-Mutante und WT nicht mehr meßbar ist. In Zukunft könnten die Pflanzen mit niedrigen Cytokinin-konzentrationen, welche eine Promotorinduktion in Wurzeln hervorrufen (Ergebnisse 2.6.), vorinkubiert werden. Außerdem wäre es hilfreich für die *in vivo* Transporte ältere Pflanzen, möglichst aus Flüssigkultur oder Erde, zu benutzen, da in den Promotor-GUS Studien unter diesen Bedingungen eine stärkere Expression beobachtet werden konnte (Ergebnisse 2.5.). Zur Aufklärung des Transportmechanismus von *AtAzg1* wurde Diethylstilbestrol (DES) verwendet. DES, ein Inhibitor der H⁺-ATPase-Tätigkeit in Plasmamembranen (Boominathan und Doran, 2003), kann nur einen ersten Hinweis auf die Arbeitsweise des Transporters liefern. DES zählt zu den Entkopplern: Da die ATPase keine Protonen mehr über die Membran transportiert, kann kein pH-Gradient mehr über die Membran aufgebaut werden. Aus dem durch DES inhibierten Transport von Adenin in Arabidopsis-Keimlingen (siehe Ergebnisse 5.3.2., Abbildung 36) kann auf eine Abhängigkeit vom transmembranen pH-Gradienten geschlossen werden.

Die Fütterungsversuche mit 8-aza-Guanin und 8-aza-Adenin (siehe Ergebnisse 5.3.1.1) deuten darauf hin, daß *AtAzg1* in der Lage ist beide toxischen Purinanaloge in die Pflanzenzellen zu transportieren. Die offensichtlich nur teilweise auftretende Resistenz der Knockout-Pflanzen gegenüber den toxischen Substanzen kann entweder durch ungerichtete Diffusion oder durch ein alternatives weiteres bisher unbekanntes System für den Transport dieser giftigen Komponenten ausgelöst sein. Das alternative System zum Transport von 8-aza-Adenin könnte z.B. aus den Adenin transportierenden Purintransportern *AtPUP1* und *AtPUP2* bestehen (Gillissen *et al.*, 2000; Bürkle *et al.*, 2003). Allerdings konnte für *AtPUP1* und *AtPUP2* bisher keine Expression in den Wurzeln nachgewiesen werden (Gillissen *et al.*, 2000; Bürkle *et al.*, 2003). Auch die heterologe Expression von *AtAzg1* in Hefe zeigte eine Aufnahme von 8-aza-Adenin und 8-aza-Guanin (Benjamin Schumacher, Diplomarbeit 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Aufnahme beider toxischen Purinanaloge durch *AtAzg1* in intakte Pflanzen gezeigt werden.

Das bessere Wachstum der *AtAzg1* Knockout-Mutanten, bzw. das schlechtere Wachstum der *CaMV35S::AtAzg1* überexprimierenden Linien auf MS-Platten mit 0,2 μ M *trans*-Zeatin (Abb. 37A und B), bzw. mit 0,2 μ M Kinetin, unterstützt gleichfalls einen Zusammenhang mit dem Cytokininmetabolismus. Die Pflanzen wiesen bei diesen Cytokininkonzentrationen eine ähnliche Reaktion wie mit den toxischen Purinanalogen auf. Die Beeinflussung des Wachstums war bei den Knockout-Pflanzen deutlich geringer und in den *CaMV35S::AtAzg1* überexprimierenden Linien deutlich stärker als im WT. In einem ähnlichem Versuchsansatz mit *trans*-Zeatin-Ribosid und Isopentenyladenin-Ribosid anstelle von *trans*-Zeatin konnten Sun *et al.* (2005) mit Knockoutmutanten für *AtENT3* und *AtENT8* eine reduzierte Sensitivität nachweisen, wohingegen die *AtENT8* überexprimierenden Pflanzen hypersensitiv auf diese Cytokinin-Riboside reagierten. Unter anderem aus diesen Experimenten schlossen Sun *et al.* (2005) auf eine Beteiligung am Transport von Cytokinin-Nukleosiden durch *AtENT3* und *AtENT8*. Ebenso läßt das vergleichbare antagonistische Verhalten der *AtAzg1*-Mutanten auf eine Beteiligung am Transport von *trans*-Zeatin schließen und bestätigt so die Transportversuche mit Keimlingen.

In Fütterungsexperimenten mit 0,2 μ M *trans*-Zeatin wurde eine niedrigere Konzentration für verschiedene *trans*-Zeatin- und Isopentenyladenin-Derivate in den *azg1-1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum WT gemessen (Ergebnisse 5.3.1.2.). Die Konzentrationsunterschiede zum WT dienen als weitere Bestätigung der Transportfunktion des *AtAzg1*-Proteins, da offensichtlich nur sehr geringe Mengen des angebotenen *trans*-Zeatins durch die Knockout-Mutante aufgenommen wurden. Die Konzentration von *trans*-Zeatin-Ribosid im Blattgewebe des WTs stieg am stärksten an (ca. um das 2,75-fache). Die erhöhten Konzentrationen von Cytokinin-Derivaten in den Blättern könnten ein Hinweis darauf sein, daß das für die Pflanze als überschüssig anzusehende *trans*-Zeatin in inaktive Formen umgebaut wird. Cytokinine haben auf Pflanzen, ebenso wie die anderen Pflanzenhormone, schon in sehr niedrigen Konzentrationen deutliche Wirkungen auf das Wachstum. Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Cytokininkonzentrationen in den Blättern von *Arabidopsis* (ca. 0,3 bis 10 pmol/g FW) entsprechen anderen experimentell gefundenen Cytokininkonzentrationen in *A. thaliana* (Foo *et al.*, 2007) und Mais (Takei *et al.*, 2001; Foo *et al.*, 2007). *Trans*-Zeatin-Ribosid gilt als die inaktive Form von *trans*-Zeatin (siehe Einleitung 3.3.1). Cytokinin-Riboside gelten zudem als die Transportformen der Cytokinine (Takei *et al.*, 2001). Laut Singh *et al.* (1992) kann Cytokinin als Antwort auf Ammonium- oder Stickstoffbehandlung in Blättern synthetisiert werden. Der größte Teil der in Blättern gemessenen Cytokinine stammt jedoch

aus den Wurzeln (Takei et al., 2001). Von dort wird es via Xylem in Form von Cytokinin-Ribosiden ins Blatt transportiert und löst hier, wieder umgewandelt in die freie Form der Cytokinine (die Basenform), eine erhöhte Expression von Response Regulatoren aus (Takei et al., 2001).

Es wurde schon vorher beobachtet, daß die externe Applikation von Cytokinin zu einer Umsetzung innerhalb von Pflanzenzellen führt, weshalb es einen Importmechanismus für Cytokinine in Wurzeln geben muß (Fusseder et al., 1989). Da die Wurzelspitzen prinzipiell als Hauptsyntheseorte für Cytokinine gelten, ist auch der Sproß von einem Transport dieser Hormone über den Transpirationsstrom abhängig (Letham und Palni, 1983; Horgan, 1992). Darüber hinaus wurde auch der Rückfluß von Cytokinin vom Sproß zurück zur Wurzel über das Phloem beobachtet (Weiler und Ziegler, 1981). Demnach existieren Cytokinintransporter in Wurzeln offensichtlich in allen Gewebetypen: Sowohl in der Rhizodermis, dem Rindenparenchym und der Endodermis, als auch im Xylem und Phloemgewebe. Das Promotor-GUS Konstrukt des *AtAzg1*-Gens zeigt ebenfalls eine Expression in allen Gewebetypen der Wurzel (Ergebnisse 2.5., Abbildung 23). Die schon zuvor beschriebenen Transporteigenschaften des *AtAzg1* für Cytokinine entsprechen damit auch den durch frühere Beobachtungen geforderten Expressionsorten für funktionelle Cytokinin-Transporter in den Wurzeln.

Der Purintransporter *AtPUP1* transportiert, wie *AtAzg1*, sowohl *trans*-Zeatin als auch Adenin mit hoher Affinität (Gillissen et al., 2000; Bürkle et al., 2003). Auch *AtPUP2* kann Adenin, und sehr wahrscheinlich auch verschiedene Cytokinine transportieren, welche den Adeninttransport maßgeblich inhibieren (Bürkle et al., 2003). Möglicherweise ist diese gleichzeitige Fähigkeit zum Transport von Adenin und *trans*-Zeatin wichtig für das Gleichgewicht der Komponenten im Zellsaft. Das aus den Wurzeln durch das Xylem exportierte Cytokinin wird in den Blättern durch die Cytokininoxidase (CKX) in Adenin + Aldehyd umgesetzt (Armstrong et al., 1994; Werner et al., 2001). Möglicherweise wird Adenin im Phloem zurück zu den Wurzeln transportiert, wo es wieder in die Cytokininsynthese einfließt (Chen et al., 1985; Dickinson et al., 1986).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß *AtAzg1* Adenin und *trans*-Zeatin über die pflanzliche Plasmamembran transportiert. Diese Transporteigenschaft wurde in dieser Arbeit durch verschiedene experimentelle Ansätze bestätigt. Es bleibt offen, ob zusätzliche weitere Substrate transportiert werden. Durch RT-PCR und Promotor-GUS Studien konnte eine

Expression von *AtAzg1* in verschiedensten Wurzelgeweben nachgewiesen werden. Möglicherweise ist der Transporter aktiv am Export von Cytokinin von den Wurzelspitzen zum Xylem beteiligt.

Die Expression von *AtAzg2* konnte bisher nur in Blüten und Wurzeln nachgewiesen werden. Hier bleibt abzuwarten, was weitere Experimente mit Promotor-GUS-Konstrukten und unterschiedlichen Wachstumsbedingungen zeigen. Daß aber die Expression der beiden einzigen Vertreter der *AtAzg*-Familie in den Wurzeln stattfindet, bleibt festzuhalten, da diese beiden sehr ähnlichen Transporter möglicherweise ähnliche Substrate transportieren und hier auch zusammenarbeiten könnten.

3. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die komplette *AtNAT*-Familie (12 Gene) und 1 Gen der *AtAzg*-Familie auf molekularer Ebene untersucht. Für 11 *AtNAT*-Gene konnte die Expression in verschiedenen Geweben und Organen nachgewiesen werden. Überwiegend konnte eine Expression der *AtNAT*-Gene in Leitbahnen und den umliegenden Geweben nachgewiesen werden. Die *AtNAT*-Gene wurden aufgrund ihrer Expressionseigenschaften und der phylogenetischen Verwandtschaft auf Proteinebene in vier der fünf pflanzlichen Subfamilien der NAT-Familie eingeordnet werden. Zwei Gene, *AtNAT7* und *AtNAT8*, zeigten zusätzlich eine Induktion des Promotors in undifferenzierten Geweben. Drei der 12 Gene konnten auf zellulärer Ebene in der Plasmamembran lokalisiert werden. Keine der isolierten und analysierten Knockout-Mutanten der *AtNAT*-Familie zeigte unter den untersuchten Bedingungen einen offensichtlichen Phänotyp.

Für das näher charakterisierte Gen der *AtAzg*-Familie, *AtAzg1*, ließ sich erstmals ein *in vivo* Transport von Cytokinin und Adenin nachweisen. Zusätzlich läßt sich die Genexpression durch externe Zugabe von verschiedenen Cytokinin hochregulieren. Sowohl Knockout-Mutanten des *AtAzg1*-Gens als auch *35S::AtAzg1* überexprimierende transgene Linien zeigten phänotypische Auswirkungen bei Anzucht auf extern zugegebenen Cytokinin und auch auf toxischen Purinanalogen. Knockout-Mutanten von *AtAzg1* zeigen außerdem deutliche Veränderungen in verschiedenen Cytokinin(-derivat-)konzentrationen im Vergleich zum WT, wenn beide auf geringen Konzentrationen von *trans*-Zeatin angezogen wurden. Diese Daten

lassen eine Rolle von *AtAzg1* bei der Verteilung von Purinen und Cytokininen in Pflanzen vermuten.

4. Abstract

This work deals with the complete *A. thaliana* NAT-family (12 genes), and the newly described *A. thaliana* Azg-family (2 genes). Both families were analysed at the molecular level.

Eleven *AtNAT*-genes were found to be expressed in different tissues and organs. Most *AtNATs* showed expression in the vasculature. On the basis of expression patterns and identities at the protein level, *AtNAT*-genes clustered into four out of five *NAT*-subfamilies. Two of the *AtNAT*-genes, *AtNAT7* and *AtNAT8*, showed induced expression in undifferentiated tissues. Three out of 12 *AtNAT*-genes were shown to be localised in the plasmamembrane. We were able to isolate and analyse knockout plants. For all members of the *AtNAT*-family homozygous plants were isolated. However, under the experimentally tested environmental and nutritional conditions, none of the mutants showed an informative phenotype.

One gene of the *A. thaliana* Azg-Family, *AtAzg1*, was characterised in detail. *AtAzg1* was shown to transport cytokinin and adenine *in vivo*. The expression of the *AtAzg1* gene increased in response to external cytokinines. Knockout plants of the *AtAzg1* gene and *35S::AtAzg1* overexpressing plants showed changes in morphology and growth on externally applied toxic purine analogues and also on different cytokinines. Knockout plants growing on media with 0,2 µM *trans*-zeatin showed clear differences in the levels of cytokinines and cytokinin derivatives in comparison to wild-type plants. This data led to the suggestion that *AtAzg1* may play a major role in the distribution of adenine and cytokinines in plants.

V. Literaturverzeichnis

- Acimovic Y., Coe I.R.** (2002) Molecular evolution of the equilibrative nucleoside transporter family: identification of novel family members in prokaryotes and eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 2199-2210.
- Agius F., Gonzalez-Lamotte R., Caballero J.L., Monoz-Blanco J., Botella M.A., Valpuesta V.** (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* **21**, 177-181.
- Argyrou E., Sophianopoulou V., Schultes N., Diallinas G.** (2001) Functional characterization of a maize purine transporter by expression in *Aspergillus nidulans*. *The Plant Cell* **13**, 953-964.
- Armstrong D.J.** (1994) Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. Mok D.W.S., Mok M. C., editors. Boca Raton, FL: CRC; 139–154.
- Arrigoni O.** (2000) The role of ascorbic acid in cell metabolism between gene/directed functions and unpredictable chemical reactions. *Journal of Plant Physiology* **175**, 481-488.
- Arrigoni O., De Tullio M.** (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta* **1569**, 1-9.
- Arteca, R.** (1996). Plant Growth Substances: Principles and Applications. New York: Chapman & Hall.
- Asada K.** (1994) Production and action of active oxygen in photosynthetic tissue. In: Foyer CH, Mullineaux PM, eds. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Boca Raton, FL: CRC Press, 77–104.
- Baker D.** (2000a). Vascular transport of auxins and cytokinins in Ricinus. *Plant Growth Regul* **32**, 157-160.
- Baker D.A.** (2000b). Long-distance vascular transport of endogenous hormones in plants and their role in source : sink regulation. *Israel J Plant Sci* **48**: 199-203.
- Balanzá V., Navarrete M., Trigueros M., Ferrándiz C.** (2006) Patterning the female side of Arabidopsis: the importance of hormones. Flower Development. *Journal of Experimental Botany*. **57**(13):3457-3469.
- Barth C., De Tullio M., Conklin P.L.** (2006) The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1657-1665.
- Bateman A., Birney E., Cerruti L., Durbin R., Etwiller L., Eddy S.R., Griffiths-Jones S., Howe K.L., Marshall M., Sonnhammer E.L.** (2002) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **30**(1):276-80.

- Bechthold N., Ellis J, Pelletier G.** (1993) In Planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* **316**: 1194-1199.
- Becker D.** (1990) Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes. *Nucleic Acid Res.* **18**(1): 203.
- Becker D., Kemper E., Schell J., Masterson R.** (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* **20**(6): 1195-1197.
- Bevan M.** (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**: 8711-8721.
- Birnboim, H.C., and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Boominathan R., Doran P.M.** (2003) Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *J. Biotechnol.* **101** (2): 131-146.
- Bruhat A., Tourmente S., Chapel S., Sobrier M.L., Couderc J.L., and Dastugue B.** (1990) Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional regulation of the beta 3 tubulin gene by 20-hydroxyecdysone in *Drosophila Kc* cells. *Nucleic Acids Res.* **18**(10): 2861–2867.
- Bürkle L., Cedzich A., Döpke C., Stransky H., Okumotu S., Gillissen B., Kühn C., Frommer W.B.** (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **34**, 13-26.
- Cecchetto G., Amillis S., Diallinas G., Scazzocchio C., Drevet C.** (2004) The AzgA Purine Transporter of *Aspergillus nidulans*: Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J. Biol. Chem.* **279**, 3132-3141.
- Chen C.M., Ertl J.R., Leisner S.M., Chang C.C.** (1985) Localization of Cytokinin Biosynthetic Sites in Pea Plants and Carrot Roots. *Plant Physiol.* **78**(3):510-513.
- Cheng W.H., Taliercio E.W., Chourey P.S.** (1996) The Miniature1 Seed Locus of Mais. Encodes a Cell Wall Invertase Required for Normal Development of Endosperm and Maternal Cells in the Pedicel. *Plant Cell.* **8**(6):971-983.
- Cheng Y., Dai X. und Zhao Y.** (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **20**:1790-1799.
- Conklin P.L., Barth C.** (2004) Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell and Environment* **27**, 959-970.
- Conklin P.L., Pallanca J.E., Last R.L., Smirnoff N.** (1997) L-ascorbic acid metabolism in

- the ascorbate-deficient arabidopsis mutant *vtc1*. *Plant Physiol.* **115**(3):1277-85.
- Corbesier L., Prinsen E., Jacqmar A., Lejeune P., Van Onckelen H., Périlleux C., Bernier G.** (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *J. Exp. Bot.* **54**: 2511-2517.
- Church, G.M., and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 1991-1995.
- D'Agostino I.B., Deruere J. und Kieber J.J.** (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Cell*.
- Darlington A.J., Scazzocchio C.** (1967) Use of analogues and the substrate specificity of mutants in analysis of purine uptake and breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology.* **93**: 937-940.
- Daruwala R., Song J., Koh W.S., Rumsey S.C., Levine M.** (1999) Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporter hSVCT1 and hSVCT2. *FEBS Letters* **469**, 480-484.
- Deeken R., Iwashikina N., Czirjak T., Philippar K., Becker D., Ache P., Hedrich R.** (2003) Tumour development in *Arabidopsis thaliana* involves the Shaker-like K⁺ channels AKT1 and AKT2/3. *The Plant Journal* **34**, 778-787.
- De Koning H., Diallinas G.** (2000) Nukleobase transporters. *Molekular Membrane Biology* **75**, 75-94.
- De Koning H.P., Watson C.J., Sutcliffe L., Jarvis S.M.** (2000) Differential regulation of nucleoside and nucleobase transport in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei* in response to purine stress. *Molecular and Biochemical Parasitology.* **106**: 93-107.
- Desimone M., Catoni E., Ludewig U., Hilpert M., Schneider A., Kunze R., Tegeder M., Frommer W., Schumacher K.** (2002). A novel superfamily of transporters for Allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**, 847-856.
- Diallinas G., Gorfinkiel L., Arst H.N. Jr., Cecceto G., Scazzocchio C.**(1995) Genetic and molecular characterization of a gene encoding a wide specificity purine permease of *Aspergillus nidulans* reveals a novel family of transporters conserved in prokaryotes and eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 8610-8622.
- Diallinas G., Valdez J., Sophianopoulou v., Rosa A., Scazzocchio C.** (1998) Chimeric purine transporters of *Aspergillus nidulans* define a domain critical for function and specificity conserved in bacterial, plant and metazoan homologues. *EMBO Journal* **17**, 3827-3837.
- Dickinson J.R., Forsyth C., Van Staden J.** (1986) The role of adenine in the synthesis of cytokinins in tomato plants and in cell-free root extracts. *Biomedical and Life Sciences* **4** (4): 325-334. Plant Growth Regulation, Springer Netherlands.
- Dolan L., Langdale J.A.** (2004) New insights into plant development in New England.

Development **131**: 5215-5220.

- Donahue J.L., Okpodu C.M., Cramer C.L., Grabau E.A., Alscher R.G.** (1997) Responses of Antioxidants to Paraquat in Pea Leaves (Relationship to Resistance). *Plant Physiol.* **113**: 249-257.
- Edwards, K., Johnstone, 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.
- Ferreira F.J., Kieber J.J.** (2005) Cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology.* **8**: 518-525.
- Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J.** (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* **92**: 696–717.
- Foyer C.H., Lelandais M.** (1996) A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasma membranes of pea leaf mesophyll cells. *Journal of Plant Physiology* **148**, 391-398.
- Foo E., Morris S.E., Parmenter K., Young N., Wang H., Jones A., Rameau C., Turnbull C.G.N., Beveridge C.A.** (2007) Feedback Regulation of Xylem Cytokinin Content Is Conserved in Pea and Arabidopsis. *Plant Physiol.* **143**(3): 1418–1428.
- Fosket, D. E.** (1998) in *Plant Physiology* (Zeiger, E., ed) 2nd Ed., 621–650, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, M.A.
- Fu H., Kim S.Y., Park W.D.** (1995a) High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato Sus4 sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell.* **7**(9): 1387-94.
- Fu H., Kim S.Y., Park W.D.** (1995b) A potato Sus3 sucrose synthase gene contains a context-dependent 3' element and a leader intron with both positive and negative tissue-specific effects. *Plant Cell.* **7**(9): 1395-403.
- Franceschi V.R., Tarlyn N.N.** (2002) L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology* **130**, 694-656.
- Friml J.** (2003) Auxin transport - shaping the plant. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**(1):7-12. Review.
- Friml J., Palme K.** (2002) Polar auxin transport-old questions and new concepts? *Plant Mol. Biol.* **49**(3-4):273-84. Review.
- Fusseder A., Ziegler P., Peters W., Beck E.** (1989) Turnover of O-glucosides of dihydrozeatin and dihydrozeatin-9-riboside during the cell growth cycle of photoautotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Bot. Acta* **102**:335-340.
- Gan S., Amasino R.M.** (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.

- Ganapathy V., Leibach F.H.** (1983) Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit. Studies with L-carnosine and glycyl-L-proline. *J. Biol. Chem.* **258**(23): 14189-92.
- Gaudinová A., Süssenbeková H., Vojtchová M., Kamínek M., J. Eder J., Kohout L.** (1995) Different effects of two brassinosteroids on growth, auxin and cytokinin content in tobacco callus tissue. *Plant Growth Regulation* **17**: 121-126.
- Gietz R.D., Schiestl R.H.** (1995) Transforming Yeast with DNA. *Meth. Mol. Cell Biol.* **5**: 255-269.
- Gillissen B., Bürkle L., Andre B., Kühn C., Rentsch D., Brandl B., Frommer W.B.** (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in Arabidopsis. *The Plant Cell* **12**, 291-300.
- Gray J.H., Owen R.P., Giacomini K.M.** (2004) The concentrative nucleoside transporter family. *SLC28. Pflugers Arch* **447**, 728–734.
- Guangyong L., Kunfan L., Baldwin S.A., Daowen W.** (2003) Equilibrative Nucleoside Transporters of Arabidopsis thaliana cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *J. Biol. Chem.* **278**(37): 35732-35742.
- Hellens R.P., Edwards E.A., Leyland N.R., Bean S., Mullineaux P.M.** (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **42**(6): 819-832.
- Henderson, J.F. and Paterson, A.R.P.** (1973). Nucleotide Metabolism: An Introduction (New York, Academic Press) 1-304.
- Henikoff S., Henikoff J.** (1994) *Genomics* **19**: 97-107.
- Heyl A., Schmulling T.** (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**(5):480-8. Review.
- Hirose N., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H.** (2005) Functional Characterization and Expression Analysis of a Gene, OsENT2, Encoding an Equilibrative Nucleoside Transporter in Rice Suggest a Function in Cytokinin Transport. *Plant Physiology.* **138**: 196-206.
- Horemans N., Foyer C.H., Asard H.** (2000) Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science* **5**, 263-267.
- Horemans N., Foyer C.H., Potters G., Asard H.** (2000) Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant physiology and biochemistry* **38**(7-8): 531-540.
- Horgan R.** (1992) Present and future prospects of cytokinin research. In *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*, M. Kamínek, D.W.S. Mok, and E. Zazimalová, eds. The Hague, SPB Academic Publishers, pp. 3–13.
- Huang Q.Q., Yao S.Y., Ritzel M.W., Paterson A.R., Cass C.E., Young J.D.** (1994) Cloning and functional expression of a complementary DNA encoding a mammalian

- nucleoside transport protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 17757-17769.
- Hwang T., Sheen J.** (2001) Two component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature*. **413**: 383-389.
- Hyde, R.J., Cass, C.E., Young, J. D. and Baldwin, S. A.** (2001) The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoFms. *Mol. Membr. Biol.* **18**, 53-63.
- Jefferson R.A., Kavanagh Z.A., Bevan M.W.** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* **66**, 3901-3907.
- Kafer C., Zhou L., Santoso D., Guirgis A., Weers B., Park S., Thornburg R.** (2004) Regulation of Pyrimidine Metabolism in Plants. *Frontiers in Bioscience* **9**, 1611-1625.
- Kakimoto, T.** (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* **42**: 677-685.
- Koncz C., Schell J.** (1986) The promoter of the TI-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Gen.* **204**: 383-396.
- Kong, W., Engel, K. and Wang, J.** (2004) Mammalian nucleoside transporters. *Curr. Drug Metab.* **5**, 63-84.
- Koroleva O.A., Tomlinson M.L., Leader D., Shaw P., Doonan J.H.** (2005) High-throughput protein localization in Arabidopsis using Agrobacterium-mediated transient expression of GFP-ORF fusions. *The Plant Journal* **41**, 162-174.
- Koukaki M., Vlanti A., Goudela S., Pantazopoulou A., Gioule H., Tournaviti S., Diallinas G.** (2005) The nucleobase-ascorbate transporter (NAT) signature motif in UapA defines the function of the purine translocation pathway. *Journal of Molecular Biology* **350**, 499-513.
- Krysan P.J., Young J.C., Sussmann M.R.** (1999) T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. *Plant Cell.* **11**: 2283-2290.
- Kulaeva O.N., Karavaiko N.N., Selivankina S.Y., Kusnetsov V.V., Zemlyachenko Y.V., Cherepneva G.N., Maslova G.G., Lukevich T.V., Smith A.R., Hall M.A.** (2000) Nuclear and chloroplast cytokinin-binding proteins from barley leaves participating in transcription regulation. *Plant Growth Regulation* **32**(2-3).
- Lalonde S., Tegeder M., Throne-Holst M., Frommer W.B., and Patrick J.W.** (2003). Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell Environ.* **26**, 37-56.
- Läuchli A.** (1972) Translocation of Inorganic Solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23**, 197-&.
- Lejeune P., Bernier G., Requier M.C., Kinet J.M.** (1994) Cytokinins in phloem and xylem

- saps of *Sinapis alba* during floral induction. *Physiol. Plant.* **90**: 522-528.
- Letham, D.S., and Palni, L.M.S.** (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **34**:163-197.
- Lexa M., Genkov T., Malbeck J., Machackova I., Brzobohaty B.** (2003) Dynamics of endogenous cytokinin pools in tobacco seedlings: a modelling approach. *Ann. Bot.* **91**(5):585-97.
- Li G., Liu K., Baldwin S.A., Wang D.** (2003) Equilibrative nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, expression pattern and analysis of transport activities. *J. Biol. Chem.* **278**, 35732–35742.
- Li Q., Schultes N.P.** (2002) *Arabidopsis thaliana* locus At5g62890, a nucleobase-ascorbate transporter family member, is preferentially expressed in carpel transmitting tract and tapetal cells. *Plant Science* **163**(2) 233-&.
- Liang W.-J., Johnson D., Jarvis S.M.** (2001) Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Molecular Membrane Biology* **18**, 87-95.
- Lohaus G., Burba M., Heldt H.W.** (1994). Comparison of the Contents of Sucrose and Amino-Acids in the Leaves, Phloem Sap and Taproots of High and Low Sugar-Producing Hybrids of Sugar-Beet (*Beta-Vulgaris* L). *J Exp Bot* **45**: 1097-1101.
- Lyukevich T.V., Kusnetsov V.V., Karavaiko N.N., Kulaeva O.N., Selivankina S.Y.** (2002) The Involvement of the Chloroplast Zeatin-Binding Protein in Hormone-Dependent Transcriptional Control of the Chloroplast Genome. *Russian Journal of Plant Physiology* **49**(1).
- Mauseth, J. D.** (1991). Botany: An Introduction to Plant Biology. Philadelphia: Saunders. 348-415.
- Meintanis C., Karagouni A.D., Diallinas G.** (2000) Amino acids residues N450 and Q449 are critical for the uptake capacity and specificity of UapA, a prototype of a universally conserved nucleobase-ascorbate transporter family. *Molecular Membrane Biology.* **17**: 47-58.
- Miller C.O., Skoog F., Okomura F.S., von Saltza M.H., Strong F.M.** (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1345-1350.
- Miller J.H.** (1972) Experiment in molecular genetics. Cold Spring Habor Laboratory, Cold Spring Habor, New York.
- Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T.** (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* **37**: 128-138.
- Möhlmann T., Mezher Z., Schwerdtfeger G., Neuhaus H.E.** (2001) Characterization of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT1, At). *FEBS Lett* **509**, 370-374.

- Moffatt B., Ashihara H.** (2002) Purine and Pyrimidine nucleotide synthesis and Metabolism. *The Arabidopsis Book*, eds. C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, American Society of Plant Biologists, Rockville, 1-20
- Moffat B., and Somerville C.** (1988) *Plant Physiol.* 86, 1150–1154
- Mok M.C.** (1994) Cytokinins and plant development: an overview. In DWS Mok, MC Mok, eds, Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function. *CRC Press, Boca Raton, FL*, 155–166.
- Mok D.W., Mok M.C.** (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **89**, 89-118.
- Muller-Moule P., Conklin P.L., Niyogi K.K.** (2002) Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiol.* **128**(3): 970-7.
- Napoli C.A., Beveridge C.A., Snowden K.C.** (1999) Reevaluating concepts of apical dominance and the control of axillary bud outgrowth. *Curr. Top. Dev. Biol.* **44**:127-69. Review.
- Nishikimi M., Fukuyama R., Minoshima S., Shimizu N., Yagi K.** (1994) Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L- gulono-gamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J. Biol. Chem.* **269**(18): 13685-13688.
- Noctor G., Foyer C.H.** (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249-279.
- Olmos E., Kiddle G., Pellny T.K., Kumar S., Foyer C.H.** (2006) Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1645-1655.
- Owen R.P., Badagnani I., Giacomini K.M.** (2006) Molecular determinants of specificity for synthetic nucleoside analogs in the concentrative nucleoside transporter, CNT2. *J. Biol. Chem.* **281** (36), 26675-82.
- Owen R.P., Lagpacan L.L., Taylor T.R., De La Cruz M., Huang C.C., Kawamoto M., Johns S.J., Stryke D., Ferrin T.E., Giacomini K.M.** (2006) Functional characterization and haplotype analysis of polymorphisms in the human equilibrative nucleoside transporter ENT2. *Drug Metab. Dispos.* **34** (1), 12-25.
- Paciorek T., Friml J.** (2006) Auxin signaling. *J. Cell Sci.* **119**(Pt 7):1199-202. Review.
- Page R.D.M.** (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Bioscience* **12**, 357-358.
- Pastori G.M., Kiddle G., Antoniw J., Bernard S., Veljovic-Jovanovic S., Verrier P.J., Noctor G., Foyer C.H.** (2003) Leaf Vitamin C Contents Modulate Plant Defense Transcripts and Regulate Genes That Control Development through Hormone Signaling. *The Plant Cell* **15**: 939-951.

- Pélissier H.C., Frerich A., Desimone M., Schumacher K., Tegeder M.** (2004) PvUPS1, an allantoin transporter in nodulated roots of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* **134**: 664-675.
- Pinkert C.A., Ornitz D.M., Brinster R.L., Palmiter R.D.** (1987) An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. *Genes Dev.* **1**(3):268-76.
- Raven, P. H., Evert, R. F., and Eichhorn, S. E.** (1992). *Biology of Plants*. New York: Worth. 545-572.
- Ren Q., Kang K.H., Paulsen I.T.** (2004) TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. *Nucleic Acids Res.* **32**(Database issue):D284-8.
- Richmond A.E., Lang A.** (1957) Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science* **125**: 650–651.
- Ritzel M.W., Ng A.M., Yao S.Y., et al.** (2001) Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺- nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J. Biol. Chem.* **276**, 2914-2927.
- Ritzel M.W., Ng A.M., Yao S.Y., et al.** (2001) Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *Mol. Membr. Biol.* **18**, 65-72.
- Rodríguez-Concepción M., Forés O., Martínez-García J.F., González V., Phillips M.A., Ferrer A. und Boronat A.** (2004) Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during Arabidopsis Seedling Development. *Plant Cell* **16** (1): 144–156.
- Roef L., Van Onckelen H.** (2004) Cytokinin regulation of the cell division cycle. In Davies PJ (Ed.). *Plant hormones. biosynthesis, signal transduction, action* (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands) 241–261.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**(4839): 487-491.
- Sakakibara H.** (2005) Cytokinin biosynthesis and regulation. *Vitam. Horm.* **72**: 271-287.
- Sakakibara H.** (2006) CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**(1): 431
- Salisbury, F. B., and Ross, C. W.** (1992). *Plant Physiology*. Belmont, CA: Wadsworth. 357-407, 531-548.

- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Scazzocchio C.** (1966) Ph.D. Thesis, University of Cambridge, Cambridge.
- Scazzocchio C., Darlington A.J.** (1967) The genetic control of xanthine dehydrogenase and urate oxidase synthesis in *Aspergillus nidulans*. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **9**(11):1503-8.
- Scheres B., Di Laurenzio L., Willemsen V., Hauser M.-T., Janmaat K., Weisbeek P., Benfey P.N.** (1995) Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **121**, 53-62.
- Schild, Alexander** (2004) Nucleobasen-Ascorbat Transporter in *A. thaliana*. Expressionsanalyse und funktionelle Charakterisierung. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Schmidt A., Baumann N., Schwarzkopf A., Frommer W.B., Desimone M.** (2006) Comparative studies on Ureide Permeases in *Arabidopsis thaliana* and analysis of two alternative splice variants of AtUPS5. *Planta*, **224**(6):1329-40.
- Schmidt A., Su Y.H., Kunze R., Warner S., Hewitt M., Slocum R.D., Ludewig U., Frommer W.B., Desimone M.** (2004) UPS1 and UPS2 from *Arabidopsis* mediate high affinity transport of uracil and 5-fluorouracil. *J. Biol. Chem.* **279**(43):44817-24.
- Schmitz R.Y., Skoog F.** (1972) Cytokinins: Synthesis and Biological Activity of Geometric and Position Isomers of Zeatin. *Plant Physiol.* **50**(6):702-705.
- Schmülling T.** (2000) New Insights into the Functions of Cytokinins in Plant Development. *J. Plant Growth Regul.* **21**(1):40-49.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupkova E., Bartrina Y., Manns I.** (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J. Plant Res.* **116**(3):241-52. Review.
- Schultes N.P., Brutnell T.P., Allen A., Dellaporta S.L., Nelson T., Chen J.** (1996) *Leaf permease1* gen of maize is required for chloroplast development. *The Plant Cell* **8**, 463-470.
- Schumacher, Benjamin** (2006) Identifizierung und Charakterisierung eines Transporters für Purine und Purinderivate in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität Tübingen.
- Schwacke R., Schneider A., van der Graaff E., Fischer K., Catoni E., Desimone M., Frommer W.B., Flügge U.I., Kunze R.** (2003) ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiology* **131**, 16-26.
- Sharman D. O'Neill S.D.** (1997) Pollination Regulation of Flower Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 547-574
- Sherson S.M., Hemmann G., Wallance G., Forbes S., Germain V., Stadler R., Bechthold N., Sauer N., Smith S.M.** (2000) Monosaccharide / proton symporter AtSTP1 plays a

- mayor role in uptake and response of Arabidopsis seeds and seedlings to sugar. *Plant J.* **24**: 849-857.
- Sieburth L.E., Meyerowitz E.M.** (1997) Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell.* **9**(3):355-65.
- Singh S., Letham D.S., Jameson P.E., Zhang R., Parker C.W., Bandenoch-Jones J., Nooden L.D.** (1988) Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. IV. Cytokinin metabolism in soybean explants. *Plant Physiol.* **88**: 788-794.
- Smirnoff H.** (1995) Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smirnoff H., ed. Environment and plant metabolism. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers, 217-244.
- Smirnoff N.** (2000a) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 229-235.
- Smirnoff N.** (2000b) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol.* **355**(1402): 1455-64. Review.
- Smith P.M.C., Atkins V.A.** (2002) Purin biosynthesis: Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* **128**, 793-802.
- Spichal L., Rakova N.Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G.A., Strnad M., Schmölling T.** (2004) Two cytokinin receptors of Arabidopsis thaliana, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1299-1305.
- Stasolla C., Katahira R., Thorpe T.A., Ashihara H.** (2003): Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* **160**, 1271-1295
- Stein A., Vaseduvan G., Carter N.S., Ullman B., Landfear S.M., Kavanaugh M.P.** (2003) Equilibrative nucleoside transporter family members from *Leishmania donovani* are electrogenic proton symporters. *J Biol Chem* **278**, 35127-35134.
- Stephen J.D., Lawrence A.P.** (2000) Measuring dimensions: the regulation of size and shape. *Development* **127**: 2977-2987.
- Strasburger,** Lehrbuch der Botanik (1998) Gustav Fischer Verlag, Ulm, 34. Auflage.
- Sun J., Hirose N., Wang X., Wen P., Xue L., Sakakibara H., Zuo J.** (2005) Arabidopsis *SOI33/AtENT8* gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport in planta. *Journal of Integrative Botany* **47**, 588-603.
- Swarup R., Marchant A., Bennett M.J.** (2000) Auxin transport: providing a sense of direction during plant development. *Biochem. Soc. Trans.* **28**: 481-485.
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T.** (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in Arabidopsis thaliana. *J Biol. Chem.* **276**(28):26405-10.

- Tatusov R.L., Natale D.A., Garkavtsev I.V., Tatusova T.A., Shankavaram U.T., Rao B.S., Kiryutin B., Galperin M.Y., Fedorova N.D., Koonin E.V.** (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.* **29**(1):22-8.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequences of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.** (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.
- Torrey J.G.** (1976) Root Hormones and Plant Growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **27**: 435-59
- Tsukaguchi H., Tokoi T., Macenzie B., Berger U.V., Chen X.Z., Wang Y., Brubaker R.F., Hediger M.A.** (1999) A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* **399**, 70-75.
- Valpuesta V., Botella M.A.** (2004) Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: New Pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science* **9**, 573-577.
- Veach Y.K., Martin R.C., Mok D.W., Malbeck J., Vankova R., Mok M.C.** (2003) O-glycosylation of cis-zeatin in maize. Charakterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiol.* **131**: 1374-1380.
- Veselov D., Langhans M., Hartung W., Aloni R., Feussner I., Gotz C., Veselova S., Schlomski S., Dickler C., Bachmann K., Ullrich C.I.** (2003) Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid. *Planta.* **216**(3):512-22.
- Voigtländer T., Ganten D., Bader M.** (1999) Transcriptional Regulation of the Rat Renin Gene by Regulatory Elements in Intron I. *American Heart Association Inc., Hypertension* **33**: 303-311.
- Wagner, K.G. and Backer, A. I.** (1992) *Int. R. Azgol.* **134**, 1-84.
- Weber E., Rodriguez C., Chevallier M.R., Jund R.** (1990) The purine-cytosine permease gene of *Saccaromyces cerevisiae*: Primary structure and deduced protein sequence of the FCY2 gene product. *Mol. Microbiol.* **4**: 585-596.
- Weiler, E., and Ziegler, H.** (1981) Determination of phytohormones in the phloem exudate from tree species by radioimmunoassay. *Planta* **152**:168-170.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T.** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10487-10492.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmülling T.** (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in regulating shoot and root

- meristem activity. *Plant Cell*. **15**: 2532-2550.
- Wheeler G., Jones M.A., Smirnov N.** (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **93**, 365-368.
- Wilson J.X.** (2002) The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Letters* **527**, 5-9.
- Wisniewska J., Xu J., Seifertova D., Brewer P.B., Ruzicka K., Blilou I., Rouquie D., Benkova E., Scheres B., Friml J.** (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*. **312**(5775):883.
- Wolucka B.A., Van Montagu M.** (2003) GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 47483-47490.
- Wormit A., Traub M., Flörchinger M., Neuhaus E., Möhlmann T.** (2004) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochemical Journal* **383**, 19-26
- Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H.** (2004) Molecular characterization of cytokinin-responsive histidinekinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant Physiol.* **134**: 654-661.
- Yoo, H.S., Cunnigham, T.S. and Cooper, T.G.** (1992) The allantoin and uracil permease gene sequences of *Saccharomyces cerevisiae* are nearly identical. *Yeast* **8**, 997-1006.
- Yu J., Hu S., Wang J., Wong G.K., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X., et al.** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa L. ssp. Indica*). *Science* **296**, 79-92.
- Ziegler H.** (1975) Nature of transported substances. In Phloem Transport. *Encyclopedia of Plant Physiology*, 59-100 (Springer, Berlin, Deutschland).
- Zielinski, Julia** (2006) Funktionelle Analyse von Nucleobasen- und Ascorbattransportern an *Arabidopsis thaliana*. Untersuchungen zur physiologischen Rolle von AtNAT7 und AtNAT8. Bachelorarbeit, Universität zu Köln.
- Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Henning L., Grissem W.** (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiology* **136**, 2621-2632.
- Zimmermann M.H., Ziegler H.** (1975) List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In Transport in Plants, *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series Vol. **1** I. Phloem Transport, M.H. Zimmermann and J.A. Milburn, eds (New York: Springer-Verlag), pp. 245-271.

VI. Anhang

Tabelle 1: Primer, die zur RT-PCR Analyse benutzt wurden.

F, 5´-3´ Aufwärts-Primer; R, 3´-5´ Abwärts-Primer.

Primer Name	Primer Sequenz
AtNAT1 F1	5´-TCGAGTCTACTGGAGCTTACA-3´
R1	5´-AGATTCTTCCCTCCTACATAG-3´
AtNAT2 F1	5´-TGTAAGCCAGAGGAGATAAGT-3´
R1	5´-TTACAAACACCGACCTCACCA-3´
AtNAT3 F1	5´-GCATTCTCAAGGATTTCTATG-3´
R1	5´-TCGGCTCCGTTGGTGGCGACCA-3´
AtNAT4 F1	5´-ATGGATCCAAAGACCGATGATTTTGCA-3´
R1	5´-TCAACCGATTCTCCCTTCATTCTGA-3´
AtNAT5 F1	5´-AACAAACAGTTCTGATTCCATCG-3´
R1	5´-ATTTCAACGAGCACACAGCCA-3´
AtNAT6 F1	5´-CCTCTCTGGCAGATTCAGTG-3´
R1	5´-GGTTGTCCAGATAGCTGCAG-3´
AtNAT7 F1	5´-TGGTGGTGGAGGAGGAGGA-3´
R1	5´-AAGTATTTTCCCTCTGTGTGA-3´
AtNAT8 F1	5´-GCGTAGAAAATGCAAAGCCAC-3´
R1	5´-CCTCAAAGGACAAGACG-3´
AtNAT9 F1	5´-GCAAATGGAGCCGGCAATGGT-3´
R1	5´-GGTGAAGAAAGGACCGATGATT-3´
AtNAT10 F1	5´-ATGACAAACGGTGGTGGC-3´
R1	5´-CCTGTGATAGCTGTAGC-3´
AtNAT11 F1	5´-CGTAACGGGATCTGAGCCTGT-3´
R1	5´-TGGCTAGCAGAAGAGCTTTGG-3´
AtNAT12 F1	5´-ATGTCAAGCTCCGACCCGAAA-3´
R1	5´-TGGTCTTAGAGATACTCCTGGACT-3´
AtAzg1 F1	5´-ATGGAGCAACAGCAACAACAACACTA-3´
R1	5´-ATTTCAACAAACCTTCTTCTCCCAAT-3´
AtAzg2 F1	5´-CCCGGGATGACATCCTCCTGCATTGCT-3´
R1	5´-GTCGCTACCATCGAGATCGTTTACTCGAG-3´
Actin2 F1	5´-TGTACGCCAGTGGTCCTACAACC-3´
R1	5´-GAAGCAAGAATGGAACCACCG-3´

Tabelle 2: Primer zur Amplifikation der *AtNAT* und *AtAzg* Promoter Regionen, einschließlich eines Teils der genomischen DNA für Promoter-GUS Fusionen. F: 5'-3' Aufwärts-Primer; R: 3'-5' Abwärts-Primer, kgS: kodierende genomische Sequenz in Basenpaaren (bp) von ATG ausgehend bis zum STOPP-Kodon des offenen Leserasters (ORF).

Primer Name	Primer Sequenz	Bindestelle der Primer an der genomischen DNA	Verwendetes Vektorsystem
AtNAT1 F2	5'-CACCAACGCAGTCTCTTTCTCCCG-3'	-1617	Gateway pGWB3
R2	5'-CGGGAGAAAGAGACTGCGTTGGTG-3'	Mitte 2. Exon	
AtNAT2 F2	5'-ACTCTAGATCTCCAGCTAGTACTCAAG-3'	-1622	pGPTV
R2	5'-GCTTTAGGAACTGCAGTGATGACCCGGGTA-3'	Mitte 2. Exon	
AtNAT3 F2	5'-TCAAGCTTGGCTTAGAGGCAACCCTGAT-3'	-1644	pGPTV
R2	5'-GCTTTCCAGCATTACATCGTTACCCGGGTA-3'	Mitte 2. Exon	
AtNAT4 F2	5'-CACCGAATCGATCATTGCAATAC-3'	-1591	Gateway pGWB3
R2	5'-GTAATGCTTGGAACACTGTAATC-3'	Mitte 2. Exon	
AtNAT5 F2	5'-CACCTGTAACCTTAGGTTATCTTC-3'	-1644	Gateway pGWB3
R2	5'-GCTGGATTGAACACACTGCTCAA-3'	Mitte 2. Exon	
AtNAT6 F2	5'-AAAGCTTATGGATCACGGGACTAGAA-3'	-1562	pGPTV
R2	5'-TGGCGTGAGACCTTCTCCCTACCCGGGTA-3'	Mitte 1. Intron	
AtNAT7 F2	5'-CACCACTGTTAGAACGTGACGACTA-3'	-1676	Gateway pGWB3
R2	5'-GAGAACAGTTGTTCCAAGCATCAC-3'	Mitte 2. Exon	
AtNAT8 F2	5'-CACCTCGATTTGAGTCTGGACCC-3'	-1656	Gateway pGWB3
R2	5'-TTAGTGATGCTTGAACAACACTGTT-3'	Mitte 2. Exon	
AtNAT9 F2	5'-CACCTGGAATCATGTACAAGAATTG-3'	-1627	Gateway pGWB3
R2	5'-CATTATTTGTTGAGTCTTGGTATT-3'	Mitte 2. Exon	
AtNAT10 F2	5'-CACCTCACTTGTCGTTGTGAAGTAAC-3'	-1660	Gateway pGWB3
R2	5'-CATTACTTGTGAGTCTTGGCATC-3'	Mitte 2. Exon	
AtNAT11 F2	5'-CACCACTGAGCCACATGGACCTGAT-3'	-1717	Gateway pGWB3
R2	5'-CATGGCTGGTACAATGACCAGAGGA-3'	Mitte 2. Exon	
AtNAT12 F2	5'-CACCACTTCTTCAGGGGTGAATCTTGGT-3'	-1645	Gateway pGWB3
R2	5'-GGTTTGCAGCATTACCTTTCAATG-3'	Mitte 2. Exon	
AtAzg1 F2	5'-CACCACTGCGGCCTAAGAGAACAAC-3'	-1713	Gateway pGWB3
R2	5'-GGTACCGCCACTTTCTTAACCATG-3'	+180 bp kgS	

Tabelle 3: Primer, die zur GFP-Fusionen benutzt wurden.
F, 5'-3' Aufwärts-Primer; R, 3'-5' Abwärts-Primer

Primer Name	Primer Sequenz	Bindestelle des Primer in der cDNA
NAT7-GFP F1	5'-CACCATGGCCGGTGGTGG TGGAGGAGGA-3'	ATG
„ R1	5'-CACAGAGGGAAAATACTTGTGAGAT-3'	+1629
NAT8-GFP F1	5'-CACCATGGCAGGTGATG GCGTAGAAAAT-3'	ATG
„ R1	5'-GTGAGAAGGAAAGTACTTGCTGAGAT-3'	+1617
NAT12-GFP F1	5'- CACCATGTCAAGCTCCGACCCGAAA-3'	ATG
„ R1	5'- CACTAAATCATCATCCATACTCTGAGG-3'	+480
„ R2	5'- AATGCCACCCATTTGACCCA-3'	+2127
Azgl-GFP F1	5'- CACCATGGAGCAACAGCAACAACAACA-3'	ATG
„ R1	5'- ACCGGGTTGAATTTACAGGAA-3'	+347
„ R2	5'- AACGGTAGTAT CAATCTCACTAGC-3'	+1738

Tabelle 4: Auflistung der *AtNAT*-Gene und *AtAzgl* aus *Arabidopsis thaliana* und der untersuchten T-DNA Insertionsmutanten. kgS: kodierende genomische Sequenz in Basenpaaren (bp) von ATG ausgehend bis zum STOPP-Kodon des offenen Leserasters (ORF). Die T-DNA Insertionslinien wurden beim Salk Institut (Salk/Sail), GABI-Kat (GK) und der Arabidopsis Knockout facility, Wisconsin (Ws) bestellt. Zyg.: Zygotomie der untersuchten Insertionsmutante, Homozygot (Ho). Acc. Nr.: Accession Nummer.

Gen	Insertionslinie	Gen Acc. Nr.	At-Nummer	Aminosäuren (Anzahl)	kgS (bp)	Exons	Name der Mutante	Zyg.
<i>AtNAT1</i>	Salk-042362	NM_126592	At2g05760	520	3347	13	nat1.1	Ho
<i>AtNAT2</i>	Salk-001169	AY035127	At2g34190	524	2343	10	nat2.1	Ho
	Salk-023391						nat2.2	Ho
<i>AtNAT3</i>	GK-116C06	AF370518	At2g26510	551	2733	14	nat3.1	Ho
	GK-294B05						nat3.2	Ho
<i>AtNAT4</i>	Salk-063184	AY099842	At1g49960	526	3000	14	nat4.1	Ho
<i>AtNAT5</i>	Salk-143377	AY093137	At5g49990	528	2760	14	nat5.1	Ho
<i>AtNAT6</i>	GK-340A03	AY05003	At5g62890	532	3353	13	nat6.1	Ho
	Salk-065004						nat6.2	Ho
<i>AtNAT7</i>	Salk-142853	NM_104695	At1g60030	543	2656	13	nat7.1	Ho
<i>AtNAT8</i>	Salk-045482	AY096464	At1g10540	539	2733	14	nat8.1	Ho
	Salk-110282						nat8.2	Ho
<i>AtNAT9</i>	Salk-045536	NM_122452	At5g25420	551	3359	14	nat9.1	Ho

Gen	Insertionslinie	Gen Acc. Nr.	At-Nummer	Aminosäuren (Anzahl)	kgS (bp)	Exons	Name der Mutante	Zyg.
<i>AtNAT10</i>	Salk-099492	NM_105229	At1g65550	551	3107	14	nat10.1	Ho
<i>AtNAT11</i>	Ws-3055	NM_119966	At4g38050	711	2933	10	nat11.1	Ho
	Salk-141665						nat11.2	Ho
<i>AtNAT12</i>	SAIL_764_H08	AY099545	At2g27810	709	3651	10	nat12.2	Ho
<i>AtAzgl</i>	SAIL_114E03	NM_111933	At3g10960	580	1740	1	azgl-1	Ho
	GK-681A06						azgl-2	Ho

Tabelle 5: Primerkombinationen für die Charakterisierung der Insertionslinien

Die Primerkombination bestand aus dem Primer, der hinter der Insertionslinie angegeben ist und als 2. Primer wurde jeweils der unten aufgeführte zur Insertionslinie passende LB-Primer gewählt.

Insertionslinie	Primer Name	Primer Sequenz	Insertionsstelle
Salk-042362	AtNAT1-R1	5'-AGATTCTTCCCTCCTACATAG-3'	2214 / 12. Exon
Salk-001169	AtNAT2-R3	5'-TATCTTCACCAATGGTCGCACT-3'	1675 / 9. Exon
Salk-023391	AtNAT2-F3	5'-TGTAAGCCAGAGGAGATAAGT-3'	552-593 / 3. Exon
GK-116C06	AtNAT3-R3	5'-TCCGTTGGTGGCGACCATT-3'	3057 / 13. Intron
GK-294B05	AtNAT3-R4	5'-CTTATGTCATCAGCTCCCTG-3'	1534 / 6. Exon
Salk-063184	AtNAT4-F3	5'-ATGGTGCAGCGGAAGGAATAG-3'	934 / 4. Exon
Salk-143377	AtNAT5-R2	5'-ATTTCAACGAGCACACAGCCA-3'	2038 / 11. Exon
GK-340A03	AtNAT6-F3	5'-ATGGTGCAGCGGAAGGAATAG-3'	1183-1204 / 4. Exon
Salk-065004	AtNAT6-F3	5'-ATGGTGCAGCGGAAGGAATAG-3'	978-1017 / 3. Exon
Salk-142853	AtNAT7-R2	5'-TGGTGGTGGTGGAGGAGGAGGA-3'	1760-1772 / 11. Exon
Salk-045482	AtNAT8-F3	5'-ACATCCGTGTCTGTGTAAGACA-3'	1336 / 7. Exon
Salk-110282	AtNAT8-F3	5'-ACATCCGTGTCTGTGTAAGACA-3'	1259-1394 / 7. Exon
Salk-045536	AtNAT9-F2	5'-GCAAATGGAGCCGGCAATGGT-3'	447-456 / 2. Intron
Salk-099492	AtNAT10-F3	5'-ATAGTGGTGGTGGCAACCAT-3'	275 / 2. Exon
Ws-3055	AtNAT11-F3	5'-ATGGATTCCGGGTCGGGTTTCG-3'	275 / 1. Exon
Salk-141665	AtNAT11-F4	5'-GGCACTTGTGTTGAGATCAGC-3'	750-761 / 2. Exon
SAIL_764_H08	AtNAT12-F1	5'-ATGTCAAGCTCCGACCCGAAA-3'	247 / 1. Exon
SAIL_114E03	AtAzgl-R3	5'-ATTGGGGAGAAGAAGGTTTGGTGAAAT-3'	356 / 1. Exon
GK-681A06	AtAzgl-R3	5'-ATTGGGGAGAAGAAGGTTTGGTGAAAT-3'	293 / 1. Exon
	Salk-LB	5'-GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC-3'	
	GK-LB	5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'	
	Ws-LB	5'-CATTTTATAATAACGCTGCGGACAT-3'	
	SAIL_LB	5'-TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC-3'	

Tabelle 6: Doppelmutanten, Tripelmutante *AtNAT*-Pflanzen

Doppelmutante	Homozygot	Phänotyp
nat1.1 x nat 2.1	ja	keiner
nat2.1 x nat3.2	ja	keiner
nat4.1 x nat9.1	ja	keiner
nat4.1 x nat10.1	ja	keiner
nat5.1 x nat6.1	ja	keiner
nat7.1 x nat8.1	ja	keiner
nat7.1 x nat8.2	ja	keiner

Tripelmutante	Homozygot	Phänotyp
nat1.1 x nat2.1 x nat3.2	ja	keiner

Tabelle 7: Primer, die zur Herstellung der Sonden für die Northern-Hybridisierung benutzt wurden.

Primer Name	Primer Sequenz
Actin1-Sonde F	5'-TGTACGCCAGTGGTCCTACAACC-3'
Actin1-Sonde R	5'-GAAGCAAGAATGGAACCACCG-3'
Azgl-Sonde F	5'-ACCGTAGCTCGGTCACTAATC-3'-
Azgl-Sonde R	5'-CATTCGTCCGTGAATACACATAATATC-3'

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaar
C-terminal	carboxyterminal
da	Dalton
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (N steht für eines der Nukleoside A: Adenin, C: Cytidin, G: Guanosin, T: Thymidin)
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1, 4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -Aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraacetat
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
g/L	Gramm pro Liter
Std.	Stunden
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar
L	Liter
mA	Milliampere
ml	Milliliter
min	Minuten
μ g/ml	Mikrogramm pro Milliliter
μ l/ml	Mikroliter pro Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sek.	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü. N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region eines Gens
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
WT	Wildtyp

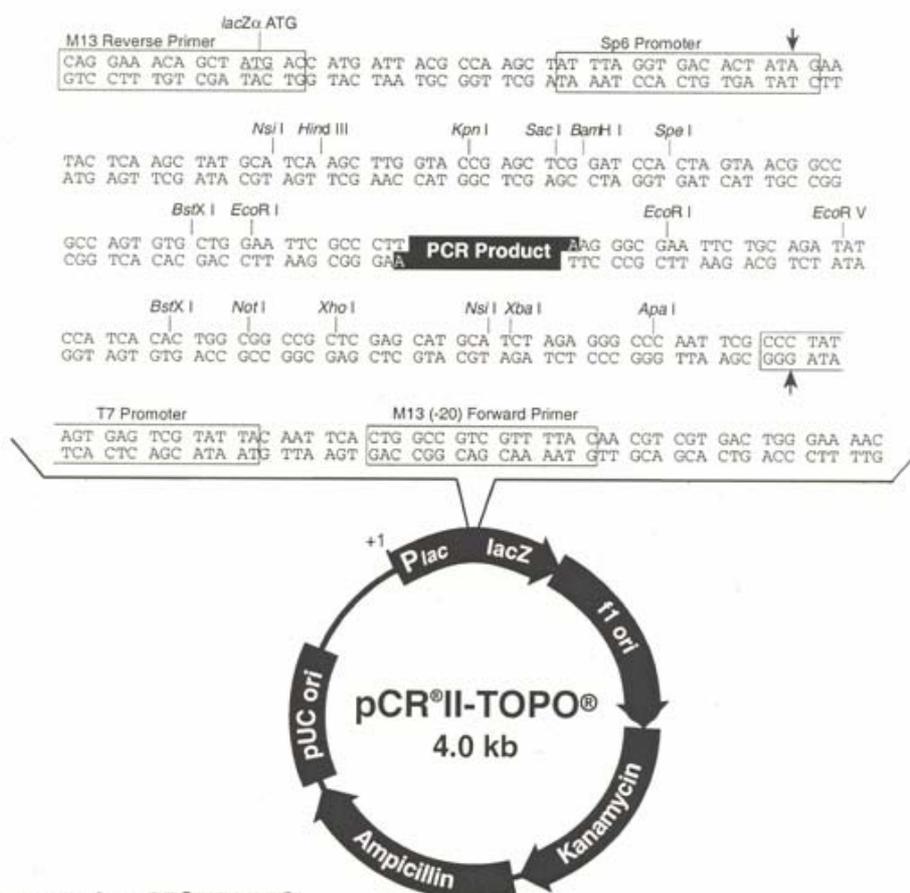
Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I

Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Vektorkarten:

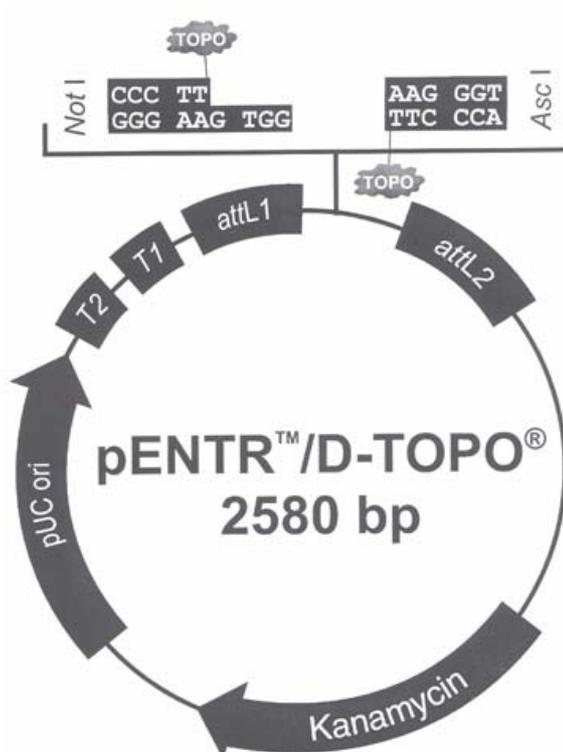
pCR-Blunt II-TOPO



Comments for pCR®II-TOPO® 3973 nucleotides

LacZ gene: bases 1-589
 M13 Reverse priming site: bases 205-221
 Sp6 promoter: bases 239-256
 Multiple Cloning Site: bases 269-383
 T7 promoter: bases 406-425
 M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
 f1 origin: bases 590-1027
 Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
 Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
 pUC origin: bases 3178-3851

pENTR/D-TOPO



501 TAACGCTAGC ATGGATGTTT TCCAGTCAC GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTCTTAAGC TCGGGCCCCA AATAATGATT
M13 forward (-20) priming site

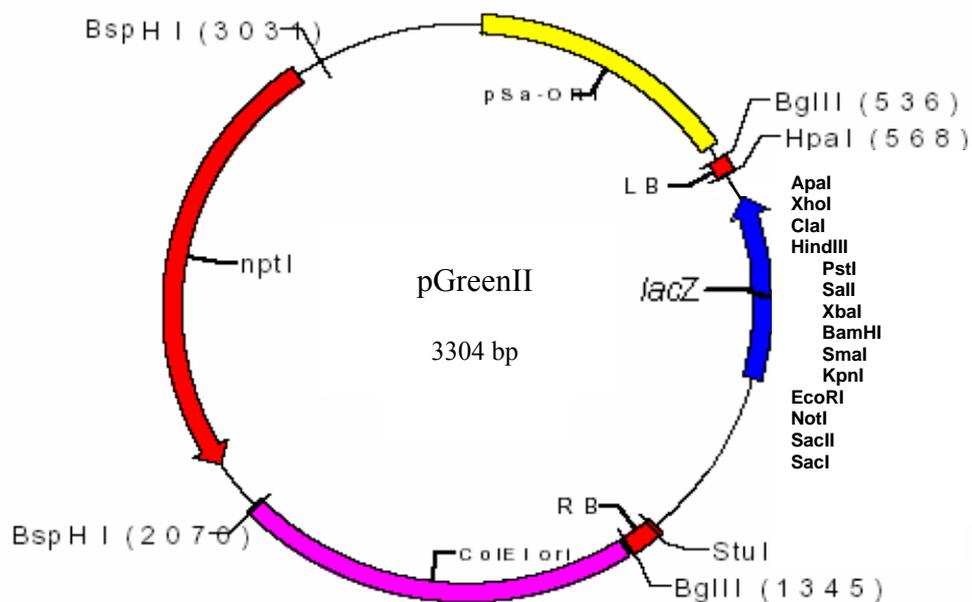
581 TTATTTTGAC TGATAGTGAC CTGTTCTGTTG CAACAAATG ATGAGCAATG CTTTTTTATA ATGCCAACT TTG TAC AAA
AAC ATG TTT
Leu Tyr Lys

659 AAA GCA GGC TCC GCG GCC GCC CCC TTC ACC ATG ... AAG GGT GGG CGC GCC GAC CCA GCT TTC TTG
TTT CGT CCG AGG GCG CGG CGG GGG AAG TGG TAC ... TTC CCA CCC GCG CGG CTG GGT CGA AAG AAC
Lys Ala Gly Ser Ala Ala Ala Pro Phe Thr Lys Gly Gly Arg Ala Asp Pro Ala Phe Leu

719 TAC AAAGTTGGC ATTATAAGAA AGCATTGCTT ATCAATTTGT TGCAACGAAC AGGTCACTAT CAGTCAAAT AAAATCATT
ATG
Tyr

801 TTTGCCATCC AGCTGATAC CCCTATAGTG AGTCGTATTA CATGGTCATA GCTGTTTCCT GGCAGTCTG
M13 reverse priming site

pGreenII-35S-nosBAR



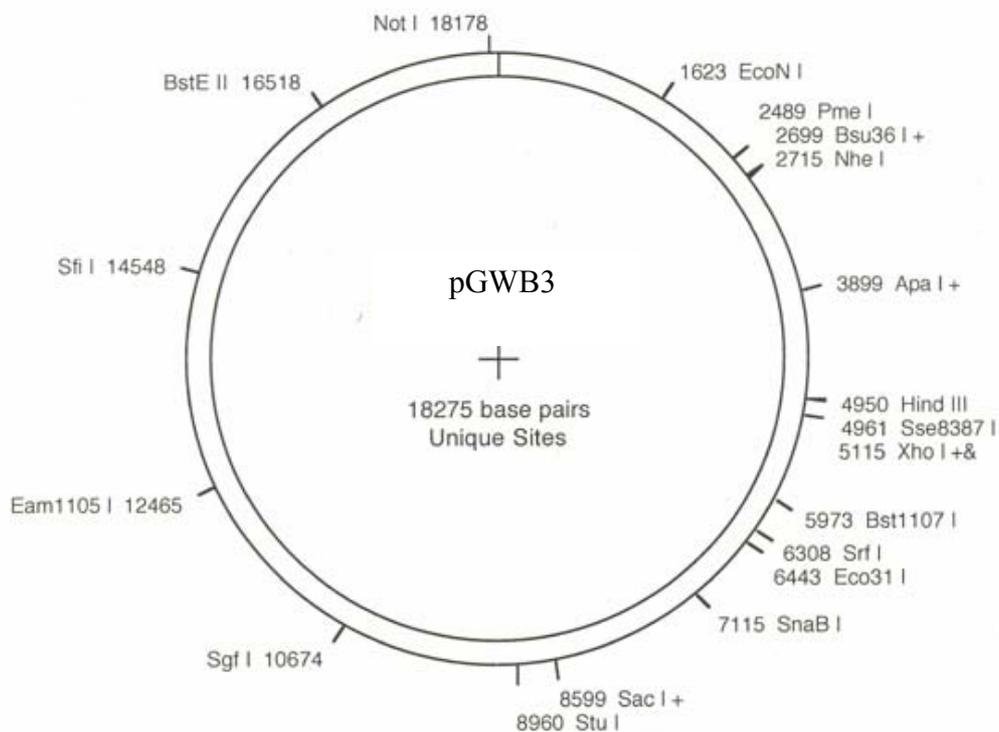
Die nos BAR - Kasette (1,1 kb) wurde in die Schnittstelle Stu I kloniert.

Die CaMV35S – MCS – OCS - Kasette (0,7 kb) aus pBinAR (Bevan, 1984) in EcoRI / Hind III kloniert. Camv35S: Cauliflower Mosaikvirus 35S-Promotor, MCS: Multiple Cloning Site, OCS: Octopin-Synthase-Terminator.

Verschiedene Schnittstellen von pGreenII wurden durch Restriktionsverdau und anschließender Blunt-Ligation entfernt (KpnI, Sall, EcoRV, PstI, SmaI, BamHI, SpeI und XbaI).

Die neue Multiple Cloning Site aus pBinAR enthält die Schnittstellen: KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, Sall, PstI.

pGWB3



pGWB3 : [(no promoter, C-GUS) (--R1-ccdB-R2-GUS--)]

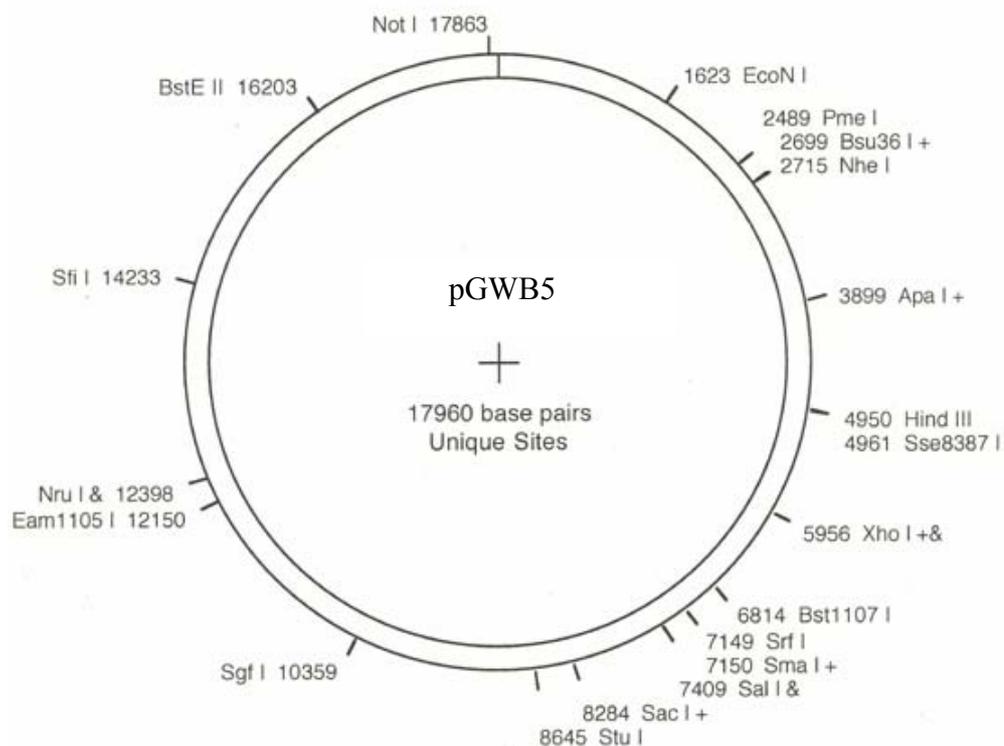
(AAGCTT) --//

(TCTAA)T CAA ACA AGT TTG TAC AAA AAA --(CmR, ccdB)-- TTC TTG TAC AAA GTG

GTT CGA TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG --(GUS sequence)

--(GAGCTC)

pGWB5



pGWB5 : [(35S promoter, C-sGFP) (--35Spromoter-R1-ccdB-R2-sGFP--)]

(AAGCTT) -- 35S promoter --//

(TCT AA)T CAA ACA AGT TTG TAC AAA AAA --(CmR, ccdB)--TTC TTG TAC AAA GTG

GTT CGA TCT AGA GGA TCC ATG --(GFP sequence) --(GAGCTC)

pGPTV

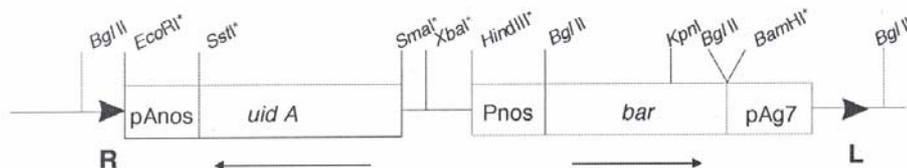
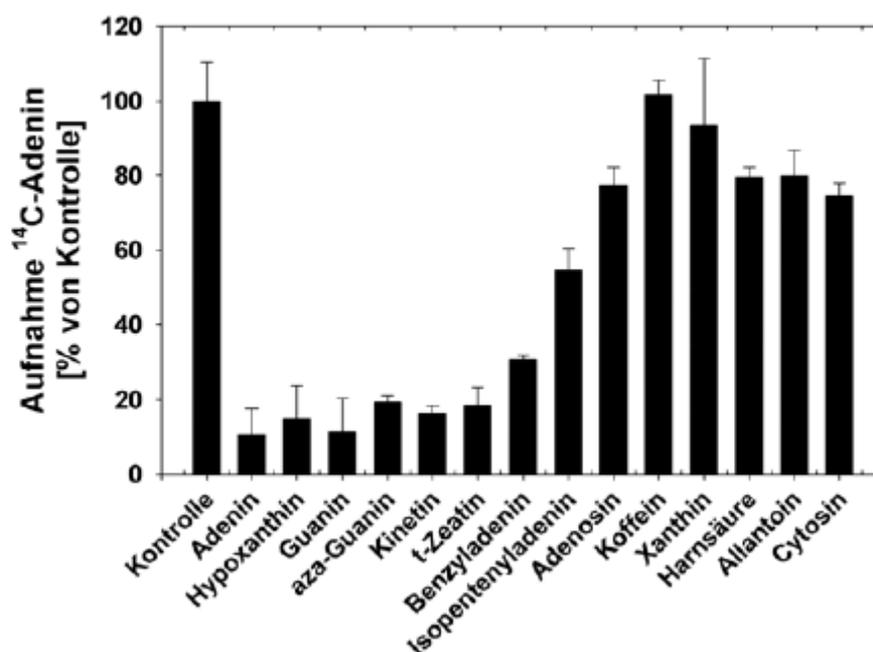


Abbildung 38: Inhibition des ^{14}C -Adenintransports



Dargestellt ist die Aufnahme von ^{14}C -Adenin bei gleichzeitiger Zugabe eines Kompetitors im 10-fachen Überschuß. Die Aufnahme von ^{14}C -Adenin ohne Zugabe eines Kompetitors diente als Kontrolle. Die Aufnahme wurde nach jeweils 3 min gestoppt, sie lag in der Kontrollmessung bei 50,89 pmol ^{14}C -Adenin pro 10^6 Zellen und entspricht 100% , n=3 (Schumacher B., Diplomarbeit 2006).

Danksagung:

Prof. U.I. Flügge für die Überlassung des spannenden Themas und die zur Verfügungstellung des Labors, der Räumlichkeiten und der finanziellen Förderung, für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Prof. M. Hülkamp für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. K. Schnetz für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Verónica Maurino für die Einarbeitung in molekularbiologische und biochemische Arbeitsweisen, für die rundum tolle Betreuung, für ihren nie abreißen den Einfallsreichtum und mitreißen den Enthusiasmus, wenn es um neue Forschungsansätze geht, für Aufmunterungen im richtigen Augenblick, für ihre Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für die hilfreiche Durchsicht der Doktorarbeit.

Markus Gierth für die Mitarbeit am NAT-Projekt, für seine geduldigen Anmerkungen und Korrekturen im letzten Augenblick (...Wochen) und für seine ruhige Art, das war Balsam für die Seele.

Marcelo Desimone für die Zusammenarbeit und spannende Diskussionen rund um NATs und Azgs.

Benjamin Schumacher für die Zusammenarbeit bei den Azgs.

Allen anderen Mitarbeitern am NAT-Projekt: Karsten Fischer, Alexander Schild, Julia Zielinski, Kirsten Bell, Claudia Nothelle, Sonja Hetfeld, Diana Hille, und all den studentischen Hilfskräften und Praktikanten.

Frau Lorbeer und Frau Schwanitz für die unverzichtbare Hilfe in bürokratischen Angelegenheiten.

Der gesamten AG-Flügge (noch anwesende und schon gegangene Mitglieder) für Hilfe im Labor, ob es nun um die Einarbeitung in neue Methoden oder um Austausch von Platten, Lösungen, etc. ging, oder um Bestellung von Verbrauchsmitteln, Computerfragen, Organisation im Laboraltag, und so weiter (ihr wißt schon, alles wofür man immer mal Danke sagen wollte...). Natürlich auch für dafür, daß ich jetzt weiß, daß Kongresse Spaß machen können, für viele schöne Abende und Nächte bei Institutspartys oder woanders, und überhaupt für das schöne Arbeitsklima, ich bin gerne hier gewesen.

Der ebenfalls wechselnden Gewächshausmannschaft für die aufopferungsvolle Pflege (Wochenende, Feiertage!) meiner Pflänzchen.

Siggi Werth für die zahlreichen Fotografien von meinen Pflänzchen.

Nele Horemans für die Ascorbat- und Gluthationmessungen.

Miroslav Strnad für die Cytokininmessungen (auf so schöne Ergebnisse wartet man gerne lang!).

Tanja Löttgert für ihr offenes Ohr am Telefon, stark strapaziert durch mein Gejammere, die Gespräche waren einfach schön.

Meike, Christina und Birgit möchte ich besonders dafür danken, daß sie mich das Leben außerhalb der Uni nicht vergessen lassen!

Meinem Vater für ablenkende Spaziergänge durch Köln, mit niemandem kann man so schön durch die Gegend bummeln wie mit ihm!

Meiner Schwester einfach dafür, daß sie immer für mich da ist.

Meiner Tante für finanzielle und moralische Unterstützung, und für ihre liebe Art.

Meinen Schwiegereltern ebenfalls dafür, daß sie immer für mich da sind.

Meinem Mann dafür, daß er sich viel Mühe gibt mich zu verstehen, und in den letzten Monaten mindestens so viel gelitten hat wie ich.

Teilpublikationen:

Maurino V., Grube E., Zielinski J., Schild A., Fischer K., Flügge U.I. (2006)

Identification and Expression Analysis of Twelve Members of the Nucleobase-Ascorbate Transporter (NAT) Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47 (10): 1381-1393.

Tagungsbeiträge:

Tri-National Arabidopsis Meeting, Neuchatel, 24.-27. August 2005;
“Advancing the Genomic Frontier”

a) Analysis of the Nucleobase-Ascorbate Transporter multigene family in *Arabidopsis thaliana*; Esther Grube, Veronica G. Maurino, Kirsten Bell, Karsten Fischer, Markus Gierth und Ulf-Ingo Flügge (Poster).

b) Two *A. thaliana* members of a novel protein family are potentially involved in nucleobase transport; Veronica G. Maurino, Esther Grube, Benjamin Schumacher, Ulf-Ingo Flügge und Marcelo Desimone (Poster).

Botanikertagung, Braunschweig, 22.-27. September 2004;

Nucleobase-Ascorbate transporters in *Arabidopsis thaliana*: Analysis of the gene expression pattern during the whole life-cycle; Esther Grube, Veronica Maurino, Karsten Fischer und Ulf-Ingo Flügge (Poster).

Botanikertagung, Freiburg, 05.-10. September 2002;

Characterization of *Arabidopsis thaliana* nucleobase and vitamin C transporters; Veronica Maurino, Esther Grube, Karsten Fischer und Ulf-Ingo Flügge (Poster).

Internationaler Botanischer Kongress (IBC), Wien, 18.-22. Juli 2005;

Two *A. thaliana* members of a novel protein family are potentially involved in nucleobases transport. Veronica Maurino, Esther Grube, Benjamin Schumacher, Ulf-Ingo Flügge und Marcelo Desimone (Poster). BERLIN 2005 Arabidopsis

Frühere Veröffentlichungen:

Krause G.H., Grube E., Virgo A., Winter K. (2003) Sudden exposure to solar UV-B radiation reduces net CO₂ uptake and photosystem I efficiency in shade-acclimated tropical tree seedlings. *Plant Physiol.* **131**(2): 745-752.

Krause G.H., Grube E., Koroleva O.Y., Bath C., Winter K. (2004) Do mature shade leaves of tropical tree seedlings acclimate to high sunlight and UV radiation? *Functional Plant Biology* **31**(7): 743-756.

Erklärung:

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig 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 - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge betreut worden.

Lebenslauf

Name	Esther Meißner, geborene Grube
Persönliches	geboren am 12.01.1971 in Köln verheiratet seit dem 24.11.2006
Schulbildung	Abitur 1990 am Andreas-Vesalius Gymnasium in Wesel
Berufsausbildung	
1990-1994	Kommunikationselektronikerin (Fachrichtung Telekommunikation) Bei der TELEKOM in Duisburg, mit Abschluß
Studium	
1995-2001	Biologie im Hauptstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Studienschwerpunkte: Pflanzenphysiologie, Pflanzengenetik, Biophysik, Geologie als Nebenfach Thema der Diplomarbeit: Wirkung von starkem sichtbaren und ultraviolettem Licht auf den Photosyntheseapparat in tropischen Pflanzen
2002-2007	Promotionsstudiengang Biologie an der Universität zu Köln Studienschwerpunkte: Molekularbiologie der Pflanzen, Proteinbiochemie, Genetik Thema der Dissertation: Molekulare Charakterisierung zweier neuer Purin Transporter Familien aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
Berufstätigkeit	
1994-1995	Qualitätssicherung im Bereich Telekommunikation SIEMENS in Bocholt
1995	Endstellenmontage von Telefongeräten MESSKATEL in Berlin
1996	Studentische Hilfskraft an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Anfertigung von Temperatur- und Feuchtigkeitsfühlern zur Anwendung an Flechten
1999-2001	Studentische Hilfskraft an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Betreuung verschiedener Praktika im Bereich Biologie der Pflanzen
2002-2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Prof. U.I. Flüge des Botanischen Institutes II, Universität zu Köln, zur Erlangung des Doktorgrades
Auslands- aufenthalte	2 Monate in Panama am Smithsonian Tropical Research Institute im Rahmen der Diplomarbeit (2000/2001) 4 wöchige Studienfahrt nach Trinidad mit dem Thema Ökologie der Tropen (1999)
Sonstiges	Grundkenntnisse in Statistik, EDV-Kenntnisse (Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint, Adobe Photoshop, DeltaGraph4, Grafit) Gute Englischkenntnisse Führerschein Klasse 3
Hobbies	Zeichnen, Aquaristik, Reiten, Radfahren