

**Analyse der Phosphattranslokator-
Genfamilie in
*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

Silke Knappe

aus Essen

Dr. Hut Verlag, München

2003

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von Februar 1998 bis März 2002 am Botanischen Institut der Universität zu Köln angefertigt. Die vorliegende Dissertation ist von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln angenommen worden.

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. U.-I. Flügge
 2. Priv.-Doz. Dr. S. Waffenschmidt

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 07.05.2002

*Nein, nein, vorstellen kann man sich nichts auf der Welt, nicht das Geringste. Es ist
alles aus so viel einzigen Einzelheiten zusammengesetzt, die sich nicht absehen lassen.
Im Einbilden geht man über sie hinweg und merkt nicht,
dass sie fehlen, schnell wie man ist.
Die Wirklichkeiten aber sind langsam und unbeschreiblich ausführlich.*

Rainer Maria Rilke

1. Einleitung	1
1.1. Plastiden als typisch pflanzliche Organellen	1
1.2. Transportprozesse über die Plastidenhülle	2
1.3. Die plastidären Phosphattranslokatoren.....	2
1.4. Die Bedeutung der Sequenzierung des <i>A. thaliana</i> -Genoms.....	5
1.5. Zielsetzung der Arbeit	8
2. Material und Methoden.....	9
2.1. Chemikalien	9
2.2. Enzyme.....	9
2.3. Bakterien- und Hefestämme	9
2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	9
2.3.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
2.3.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2.4. Vektoren.....	10
2.5. Phagenbibliotheken	11
2.5.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> Genomic Library (Fa. Clontech).....	11
2.5.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> 5'-STRETCH cDNA Library (Fa. Clontech).....	11
2.6. Reinigung und Analyse von DNA / DNA-Techniken.....	11
2.6.1. Agarose-Gelelektrophorese	11
2.6.2. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	12
2.6.3. Fällung von DNA aus wäßrigen Lösungen.....	13
2.6.4. Phenolextraktion.....	13
2.6.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	13
2.6.6. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	14
2.6.7. Dephosphorylierung von Klonierungsvektoren.....	14
2.6.8. Phosphorylierung von DNA.....	14
2.6.9. Herstellung glatter Enden (<i>Fill in</i>).....	15
2.6.10. Ligation von DNA-Fragmenten	15
2.7. Anzucht und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
2.8. Transformation von Bakterien.....	17
2.8.1. Transformation TSS-kompetenter Zellen	17
2.8.1.1. Herstellung TSS-kompetenter Zellen (Chang & Miller, 1993)	17

2.8.1.2. Transformation von TSS-kompetenten Bakterien.....	18
2.8.2. Transformation von Agrobakterien	18
2.8.2.1. Herstellung elektrokompeter Agrobakterien.....	19
2.8.2.2. Transformation elektrokompeter Agrobakterien	19
2.9. Colony-PCR	19
2.10. Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> nach Birnboim & Doly (1979).....	20
2.10.1. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> - Zellen.....	20
2.10.2. Plasmidisolierung aus Agrobakterien.....	21
2.11. Durchmusterung von cDNA- und genomischen Banken	21
2.11.1. Ausplattierung	22
2.11.2. Amplifizierung von λ -Phagen	22
2.11.3. Präparation von λ -Phagen.....	22
2.11.4. Durchmusterung von cDNA- und genomischen Banken	23
2.12. Southern Blot (Southern, 1975).....	24
2.12.1. Alkalischer Southern Blot	24
2.12.2. Southern Blot für genomische DNA	25
2.12.3. Radioaktive Markierung von DNA (<i>Labeling</i>).....	25
2.13. Hybridisierung von Southern Blots und Phagen-DNA Filtern	27
2.14. Anzucht und Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
2.14.1. Pflanzenmaterial	28
2.14.2. Sterilisation des Saatguts.....	28
2.14.2.1. Flüssig-Sterilisation.....	28
2.14.2.2. Sterilisierung mit Chlorgas:	28
2.14.3. Anzucht auf Erde	28
2.14.4. Anzucht auf Platten	30
2.14.5. Anzucht in sterilen Schüttelkulturen	31
2.14.6. Pflanzen-Selektionen	31
2.14.6.1. Selektion auf Agarplatten.....	31
2.14.6.2. BASTA-Selektion.....	32
2.15. Vakuuminfiltration (nach Bechthold et al., 1993).....	32
2.16. Präparation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
2.16.1. Präparation nach Ausubel et al., 1987	33
2.16.2. DNA-Schnellpräparation für PCR-Reaktionen.....	35
2.16.3. Genomische DNA aus <i>A. thaliana</i> für Southern Blot Analysen.....	36
2.17. GUS-Färbung von <i>A. thaliana</i>-Gewebe.....	37
2.18. Paraffineinbettung und Gewebeschnitte von <i>A. thaliana</i>-Material.....	37

2.18.1. Einbettung	37
2.18.2. Anfertigung von Gewebeschnitten	38
2.19. Präparation und Analyse von RNA.....	39
2.19.1. Präparation von RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (nach Eggermont et al., 1996) ..	39
2.19.2. RNA-Gele (nach Ausubel et al., 1987).....	39
2.19.3. <i>Northern</i> Blot Analyse.....	40
2.19.4. Hybridisierung eines <i>Northern</i> Blots.....	41
2.19.4.1. Hybridisierung mit <i>Northern</i> -Hybridisierungspuffer.....	41
2.19.4.2. Church-Puffer (nach Church und Gilbert, 1984).....	41
2.20. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
2.21. Sequenzierungen	43
2.22. RT-PCR.....	44
2.22.1. Reverse Transkription	44
2.22.2. Semiquantitative RT-PCR	45
2.22.3. <i>Real</i> Time PCR.....	45
2.23. Präparation von Schließzellen für nachfolgende RT-PCR	47
2.24. Proteintechniken.....	47
2.24.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970).....	47
2.24.2. Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie- Brilliantblau	49
2.24.3. Proteinfärbung mit Silbernitrat	49
2.24.4. Anfärben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Kupferchlorid.....	50
2.24.5. Aufarbeitung von <i>E. coli</i> Gesamtprotein.....	50
2.24.6. Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Westernblot).....	51
2.24.7. Reinigung exprimierter Fusionsproteine durch Amylose- Affinitätschromatographie.....	51
2.24.7.1. Amylose-Affinitätschromatographie	51
2.24.7.2. Regeneration des Säulenmaterials.....	52
2.25. Transportexperimente	53
2.25.1. Expression rekombinanter Phosphattranslokator-Proteine in Hefe.....	53
2.25.2. Hefetransformation	54
2.25.3. Expression des rekombinanten Proteins.....	54
2.25.4. Mechanischer Aufschluss der Hefezellen.....	55
2.25.5. Reinigung von His-gekoppelten Proteinen über Ni-NTA Affinitätschromatographie.....	55
2.25.6. Reinigung des Phospholipids.....	56

2.25.7. Rekonstitution der Membranproteine	57
2.25.8. Messung der Transportaktivität.....	58
2.25.8.1. Abhängigkeit der Substrataufnahme in die Proteoliposomen von der Reaktionszeit (Kinetik):	58
2.25.8.2. Abstoppen des Transportes durch ein Inhibitorengemisch.....	58
2.25.9. Messung der Transportaktivität in pflanzlichen Geweben.....	59
2.26. Stärkefärbung.....	60
2.27. Bestimmung von Stärke/löslichen Zuckern.....	60
2.28. Mikroskopie und Dokumentation	61
2.29. Internetadressen.....	62
3. Ergebnisse.....	63
3.1. Die NST (Nucleotide Sugar Transporter) - TPT (Triosephosphat/Phosphattranslokator) Genfamilie in <i>A. thaliana</i>	63
3.1.1. Plastidäre Phosphattranslokatoren in <i>A. thaliana</i>	63
3.1.1.1. Die vier plastidären Phosphattranslokator-Klassen	63
3.1.1.2. Die genomische Struktur der Phosphattranslokatorgene	64
3.1.2. Pseudogene der plastidären Phosphattranslokatoren.....	68
3.1.2.1. <i>GPT</i> -Pseudogene.....	69
3.1.2.2. <i>PPT</i> -Pseudogene	71
3.1.2.3. Herkunft der Pseudogene	74
3.1.3. PT-homologe Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
3.1.3.1. PT-homologe Sequenzen mit konservierter Substratbindungsstelle	75
3.1.3.2. Weitere PT-homologe Sequenzen.....	77
3.1.4. Hydrophobizitätsanalyse.....	80
3.2. Expressionsstudien.....	82
3.2.1. Expression der plastidären Phosphattranslokatoren in <i>Arabidopsis thaliana</i> : <i>Northern Blot</i> Analysen und RT-PCR.....	82
3.2.2. Wird <i>AtGPT1</i> in Schließzellen exprimiert?.....	91
3.2.3. Tageszeitliche Variationen der <i>AtTPT</i> -Expression	92
3.2.4. Expression PT-homologer Gene	93
3.2.5. Promotor - Reporterfusionen der plastidären Phosphattranslokatoren....	94
3.2.5.1. Expressionsmuster der <i>AtTPT</i> -Prom::GUS Pflanzen.....	96
3.2.5.2. Expression des <i>AtGPT1</i> -Prom::GUS Konstruktes	97
3.2.5.3. Lokalisation der Expression des <i>AtPPT1</i>	98
3.2.5.4. Expression des <i>AtPPT2</i> -Prom::GUS-Konstruktes	102

3.3. Funktionelle Charakterisierung der PTs	103
3.3.1. Heterologe Expression der plastidären Phosphattranslokatoren in <i>Escherichia coli</i>	103
3.3.1.1. Klonierung der PTs in pMAL-c2 (NEB)	104
3.3.1.2. Gewinnung eines AtXPT-Antikörpers	105
3.3.1.3. Expression eines <i>AtGPT1</i> -PCR-Konstruktes.....	107
3.3.2. Heterologe Expression der <i>AtGPTs</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	109
3.3.2.1. Herstellung der <i>AtGPT</i> -pYES/NT2-Konstrukte und Transportmessungen	109
3.3.3. Messungen der Glk6P-Transportaktivität in Blättern und Blüten	111
3.3.4. Komplementierung einer <i>pgi</i> -Mutante mit <i>EW4</i> , <i>AtGPT1</i> und <i>AtGPT2</i>	112
3.3.5. Mögliche Regulation des GPT1	117
3.3.6. Komplementierung einer <i>AtPPT1</i> -Mutante mit <i>AtPPT1</i> und <i>AtPPT2</i>	119
4. Diskussion	121
4.1. Plastidäre Phosphattranslokatoren in <i>Arabidopsis thaliana</i>	121
4.2. Expressionsanalysen mittels RT-PCR	122
4.3. Sequenzanalyse der plastidären Phosphattranslokatoren	127
4.3.1. Die Exon-Intronstruktur der Phosphattranslokatorgene	127
4.3.2. Die PT-Pseudogene.....	132
4.4. Funktionen der Phosphattranslokatoren.....	135
4.4.1. Die Funktion des GPT in <i>A. thaliana</i>	135
4.4.1.1. Charakterisierung des <i>AtGPT1</i> als Glukose-6-Phosphattransporter.....	135
4.4.1.2. Möglichkeiten der Regulation	137
4.4.1.3. Wird ein GPT im Mesophyll benötigt?	140
4.4.1.4. Wird ein GPT in Wurzeln benötigt?	141
4.4.1.5. GPT-Aktivität in Schließzellen.....	142
4.4.1.6. Die Funktion des GPT in Bündelscheidenzellen.....	142
4.4.2. Phosphattranslokatoren in sich entwickelnden Samen.....	143
4.4.3. Mögliche Funktionen der <i>AtPPTs</i>	147
4.4.3.1. Funktion des PPT1 in der Wurzel	147
4.4.3.2. Funktionen des PPT1 im Blatt und Komplementation einer PPT1 Mutante	147
4.4.3.3. Mögliche Funktion des PPT1 in der Signaltransduktion.....	152
4.5. PT-homologe Sequenzen: Nukleotid-Zuckertransporter?	153
4.6. Ideen zum Ursprung der NST-TPT-Genfamilie	158

5. Zusammenfassung.....	159
6. Abkürzungen	161
7. Literaturverzeichnis	163
8. Anhänge.....	183
8.1. Die komparative CT-Methode (nach User Bulletin#2, Applied Biosystems, 1997)	183
8.2. Verwendete Oligonukleotide	185

1. Einleitung

1.1. Plastiden als typisch pflanzliche Organellen

Flowers are the smile of our earth (Ralph Waldo Emerson) - Pflanzen sind für uns Menschen lebensnotwendig. Ohne sie wäre die Welt nicht nur farbloser, uns fehlte auch die Luft zum Atmen! Nur Pflanzen sind durch die Photosynthese in der Lage, atmosphärisches Kohlendioxid in organische Kohlenstoffverbindungen zu fixieren; dieser Prozess setzt Sauerstoff frei und findet in einem spezifisch pflanzlichen Organell, den grünen Plastiden (Chloroplasten), statt.

Da Plastiden das charakteristische Organell der Pflanzen sind, ist das Verständnis ihres Stoffwechsels von besonderem Interesse. Der Ursprung der Plastiden, die von einer doppelten Hüllmembran umgeben sind, wird durch die sog. Endosymbiontentheorie erklärt, wonach eine cyanobakterienähnliche prokaryotische Zelle von der Urpflanzenzelle aufgenommen wurde. Die heutigen Verwandten der photosynthetisch aktiven prokaryotischen Endosymbionten sind Cyanobakterien wie z.B. *Synechocystis*. Cyanobakterien werden von zwei unabhängigen Membransystemen umgeben, der Plasmamembran und einer äußeren Lipopolysaccharidlage. Diese beiden Membransysteme werden durch eine Peptidoglykanschicht getrennt. Die plastidäre innere Membran entspricht der prokaryotischen Plasmamembran. Der Ursprung der äußeren Membran ist nicht völlig geklärt (Cavalier-Smith, 2000; Keegstra et al., 1984). Die Anwesenheit von Galaktolipiden und Karotinoiden sowohl in der prokaryotischen äußeren Membran als auch in der äußeren Plastidenhülle unterstützt deren prokaryotischen Ursprung. Auch wurde vor kurzem in der äußeren Membran von *Synechocystis* PCC6803 das Protein SynToc75, ein Homolog zum Translokationskanal Toc75 der äußeren Plastidenmembran, identifiziert (Bölter et al., 1998; Reumann et al., 1999). Allerdings wird das typisch eukaryotische Lipid Phosphatidylcholin nur in der äußeren Plastidenmembran gefunden, wo es den Hauptanteil der polaren Lipide bildet (Dorne et al., 1990), was wiederum den eukaryotischen Ursprung favorisiert.

Während der Evolution gingen mehr als 95% der Cyanobakteriengene der Plastiden verloren oder wurden in den Nukleus der Wirtszelle transferiert (Martin und Herrmann, 1998). Diese kernkodierte, plastidären Proteine benötigten nun eine Präsequenz (Transitpeptid), welche sie zu den Plastiden dirigierte. Obwohl es einige Hinweise für die Entstehung der Signalsequenz durch Mutationen gibt, wird auch vorgeschlagen, dass das Transitpeptid nachträglich an den N-Terminus eines in den Nukleus der Wirtszelle transferierten Endosymbiontengens durch den Mechanismus des *exon shuffling* angehängt wurde (Gantt et al., 1991; Wolter et al., 1988).

In den letzten Jahren wurden verschiedene Proteine, die am Im- oder Export von Substraten beteiligt sind, durch biochemische und elektrophysiologische Ansätze charakterisiert, einige wurden auf molekularer Ebene identifiziert.

1.2. Transportprozesse über die Plastidenhülle

Die äußere Plastidenmembran enthält mehrere Porin-ähnliche Proteine, von denen man annahm, sie vermittelten die unspezifische Permeation verschiedener Metabolite. Es stellte sich aber heraus, dass sie eine ausgeprägte Substratspezifität besitzen und reguliert sind. Daher ist der Raum zwischen den beiden Membranen nicht so frei zugänglich, wie bisher angenommen wurde (Flügge, 2000; Soll et al., 2000).

Mehrere Transportproteine der inneren Chloroplastenmembran wurden genauer untersucht. So konnten u.ä. Glukose- und Maltosetransportvorgänge beobachtet werden (Herold et al., 1981; Rost et al., 1997; Schäfer et al., 1977), ein Glukosetransporter wurde mittlerweile kloniert (Weber et al., 2000).

In Plastiden wird ATP aus dem Zytosol gegen stromales ADP getauscht und dient zur Energetisierung anabolischer Reaktionen wie der Stärkesynthese und der Fettsäuresynthese. Der Transport verläuft hier also im Vergleich zu Mitochondrien in umgekehrter Richtung. Während der mitochondriale ADP/ATP-Transporter ein in Eukaryoten hochkonserviertes dimeres Protein mit 2x6 Membranspannen ist, zeichnet sich der plastidäre ADP/ATP Transporter durch zwölf Transmembrandomänen aus und weist interessanterweise eine Aminosäure-Identität von 66% zu dem ADP/ATP Transportprotein des evolutionär weit entfernten Bakteriums *R. prowzekii* auf, welches ein intrazellulärer Parasit in Säugerzellen und Verursacher des epidemischen Typhus ist (Kampfenkel et al., 1995; Williamson et al., 1989).

Der plastidäre 2-Oxoglutarat/Malattransporter, der 2-Oxoglutarat importiert und Malat exportiert, besitzt ebenfalls zwölf Transmembranspannen (Weber et al., 1995) und gehört zu den Dicarboxylattransportern, von denen ein zweiter den Austausch von Glutamat mit zytosolischem Malat vermittelt. Diese Transportvorgänge gewähren zusätzlich einen Einblick in den Prozess der Ammoniumassimilation während der Nitritreduktion und der Photorespiration über den sog. Oxalacetat-Malat-*Shuttle* (Woo et al., 1987).

1.3. Die plastidären Phosphattranslokatoren

In Plastiden ist der kontrollierte Austausch von anorganischem Phosphat gegen verschiedene phosphorylierte Metabolite entscheidend für die Funktion des Stoffwechsels. Dafür verantwortlich sind die Phosphattranslokatoren der inneren Chloroplastenmembran. Diese Proteingruppe wird in vier Klassen mit unterschiedlichen, teilweise überlappenden Substratspezifitäten eingeteilt. Die Transporter besitzen innerhalb einer Klasse eine Aminosäure-Identität von 75-85%; zwischen den einzelnen Klassen beträgt die Homologie 30-45%, wobei es mehrere zwischen den Klassen höher konservierte Bereiche gibt (Kammerer et al., 1998).

Ebenfalls konserviert sind zwei Aminosäuren der vorausgesagten Substratbindestelle (Fischer et al. 1994a). Die Anzahl der vorhergesagten Membranspannen der Phosphattranslokatoren (PTs) liegt zwischen sechs und acht. Alle Phosphattranslokatoren sind kernkodierte Proteine mit einer N-terminalen Transitsequenz (Flügge, 1999).

Nachfolgend sollen die Funktionen der verschiedenen Phosphattranslokatoren kurz beschrieben werden (Abb. 1.1):

Der TPT (Triosephosphat/Phosphattranslokator) macht 10% des Proteingehaltes der inneren Chloroplastenmembran aus. Das Molekulargewicht des prozessierten Proteins beträgt ca. 29 kD, die funktionelle Form ist wahrscheinlich ein Dimer (Flügge, 1985).

Die Fixierung von CO₂ während der Photosynthese führt zur Bildung von Triosephosphaten im Plastidenstroma. Diese werden über den TPT im strikten Gegentausch mit Phosphat ins Zytosol transportiert, wo sie in die Biosynthese von Saccharose und anderen Metaboliten einfließen. Das über den TPT in die Chloroplasten importierte P_i dient der Bildung von ATP. Durch Kopplung des Exports von Triosephosphaten an den Import von 3-PGA kann der TPT außerdem eine Funktion in einem *Shuttle*-System übernehmen, welches den indirekten Export von ATP, NADH und/oder NADPH ins Zytosol erlaubt (Flügge, 1999).

Nach bisherigen Ergebnissen ist die Expression des TPT-Gens auf grüne Gewebe beschränkt (Fischer et al., 1997; Schulz et al., 1993).

Den meisten Chloroplasten und einigen Typen von nichtgrünen Plastiden fehlt die enzymatische Ausstattung für die Umwandlung von 3-Phosphoglyzerat in Phosphoenolpyruvat (PEP). Das Vorhandensein von PEP im Stroma ist jedoch notwendig für verschiedene Stoffwechselforgänge wie den Shikimatweg, der Synthese von Fettsäuren und einigen Aminosäuren. PEP wird daher über den PPT (Phosphoenolpyruvat/Phosphattranslokator) in die Plastiden importiert. Der PPT weist nur ca. 30% Identität auf Aminosäureebene mit dem TPT auf und besitzt im Vergleich zum TPT eine elffach höhere Affinität für PEP (Fischer et al., 1997). Der Shikimatweg führt zur Synthese von aromatischen Aminosäuren und einer großen Anzahl von Sekundärmetaboliten. Daher stellt der PPT eine wichtige Verbindung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel der Pflanze dar. Die *A. thaliana cue1*-Mutante besitzt keinen funktionellen PPT, sie zeigt einen retikulierten Blattphänotyp und ist nicht in der Lage, Anthozyane als Produkte des Sekundärmetabolismus zu synthetisieren (Streatfield et al., 1999).

Expressionsanalysen mit verschiedenen Geweben von Blumenkohl und Mais ergaben, dass Transkripte des PPT-Gens sowohl in photosynthetisch aktiven, als auch in heterotrophen Geweben zu finden sind; in letzteren war die beobachtete Expression stärker (Fischer et al., 1997). Aus der C₄-Pflanze Mais wurde die cDNA eines weiteren PPT-Typs isoliert; dieser C₄-PPT zeigt starke Expression in

Mesophyllzellen und exportiert PEP ins Zytosol, wo es als Substrat der PEP-Carboxylase dient (Fischer und Flügge, unveröffentlichte Ergebnisse).

In nichtgrünen Plastiden ist mit wenigen Ausnahmen keine Fruktose-1,6-bisphosphat-Phosphatase vorhanden. Daher können Triosephosphate nicht in Hexosephosphate umgewandelt werden. Hexosephosphate dienen in Plastiden als Substrate für die Stärke- und Fettsäuresynthese und können in den oxidativen Pentosephosphatweg eingehen (Borchert et al., 1993; Bowsher et al., 1992; Flügge, 1995; Thom et al., 1998). Während in Amyloplasten von Weizenendosperm anscheinend Glk1P für die Stärkebiosynthese importiert wird (Tyson und ap Rees, 1988), konnte bei isolierten Plastiden aus Erbsenembryonen und Blumenkohlinfloreszenzen eine Aufnahme von Glk6P beobachtet werden (Hill und Smith., 1991; Neuhaus et al., 1993). 1998 wurde von Kammerer et al. mit dem **GPT** (Glukose-6-phosphat/Phosphattranslokator) ein weiteres Mitglied der Phosphattranslokator-Genfamilie identifiziert. Mit dem heterolog exprimierten Protein durchgeführte Transportstudien zeigen, dass dieser Transporter ein breites Substratspektrum besitzt. Es werden C3- (Triosephosphat, 3-PGA), C5- (Xylulose-5-phosphate, Xyl5P) und C6-Komponenten wie Glk6P (Kammerer et al., 1998, Eicks et al., 2002) als Substrate akzeptiert, nicht jedoch Glk1P.

Die Analyse von stärkefreien Mutanten unterschiedlicher Pflanzen, denen die plastidäre Phosphoglukomutase fehlt, welche die Umwandlung von Glk6P zu Glk1P katalysiert, lässt den Schluss zu, dass in den meisten Pflanzen Glk6P der einzige Vorläufer der Stärkesynthese ist (Caspar et al., 1985; Harrison et al., 1998; Kofler et al., 2001).

Eine in den Blättern nahezu stärkefreie Mutante (Yu et al., 2000) mit Defekt in der plastidären Phosphoglukoseisomerase (PGI), die Frk6P in Glk6P umwandelt, weist außerdem darauf hin, dass in photosynthetisch aktivem Gewebe kein funktioneller GPT vorhanden ist, welcher Glk6P in die Plastiden importieren könnte. Expression des GPTs wurde in heterotrophen Geweben wie z.B. Erbsenwurzeln detektiert (Kammerer et al., 1998).

Der kürzlich entdeckte **XPT** (Xylulose-5-phosphat/Phosphattranslokator) bildet die vierte Klasse der plastidären Phosphattranslokator-Genfamilie (Eicks et al., 2002). Der XPT besitzt eine dem GPT ähnliche Substratspezifität, transportiert jedoch kein Glk6P. Die physiologische Funktion des XPT besteht darin, die plastidären Pentosephosphatwege mit zytosolischen Kohlenstoffgerüsten in Form von Xyl5P aufzufüllen, wenn ein hoher Bedarf an Intermediaten besteht. Daten zur Expression des XPT-Gens lagen zu Beginn dieser Arbeit noch nicht vor.

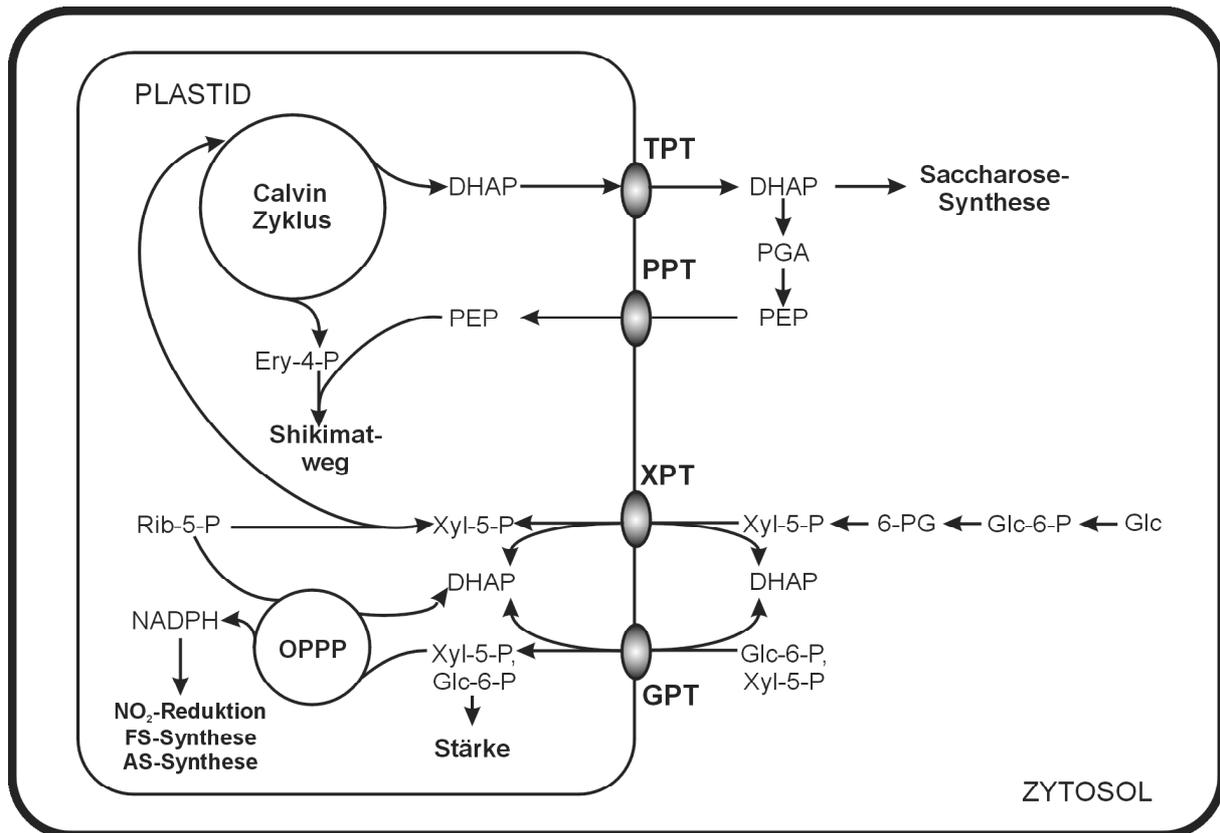


Abb. 1.1: Schematische Darstellung einer (hypothetischen) Zelle, die alle Phosphattranslokator-Klassen exprimiert. DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, Ery-4-P: Erythrose-4-phosphat, Glc: Glukose, Glc-6-P: Glukose-6-phosphat, PEP: Phosphoenolpyruvat, 6-PG: 6-Phosphogluconat, PGA: 3-Phosphoglycerat, Rib-5-P: Ribose-5-phosphat, Xyl-5-P: Xylulose-5-P. FS-Synthese: Fettsäuresynthese, AS-Synthese: Aminosäuresynthese.

1.4. Die Bedeutung der Sequenzierung des *A. thaliana*-Genoms

Zusätzlich zu ursprünglichen Merkmalen, die zwischen Pflanzen und Tieren konserviert sind, besitzen Blütenpflanzen einzigartige organisatorische und physiologische Eigenschaften. Dazu zählt neben der Photosynthese beispielsweise die Enzymologie der Zellwandbiosynthese (Hatfield und Vermerris, 2000; Read und Bacic, 2002; Williamson et al., 2001) oder die Tatsache, dass Pflanzen ihr eigenes Signaltransduktionssystem entwickelt haben (McCarty und Chory, 2000).

Die Entschlüsselung des Genoms der Modellpflanze *A. thaliana* (AGI, 2000) ist daher ein wichtiger Schritt auf dem Weg zum Verständnis der Stoffwechselfvorgänge in Pflanzen, der Evolution der Eukaryoten sowie der Unterschiede zwischen Pflanzen und Tieren.

Während der letzten Jahre wurden die Genome von vier verschiedenen eukaryotischen Organismen komplett sequenziert: *Saccharomyces cerevisiae* als einzelliger Eukaryot (Goffeau et al., 1997; Wood et al., 2002), *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) und *Drosophila* (Adams, 2000) als vielzellige Organismen. Das Genom von *A. thaliana* war das erste vollständig sequenzierte

Pflanzengenom (AGI, 2000). Die Sequenzierung dieser Organismen als Vertretern von Organismengruppen erlaubt nun eine komparative Analyse der Gene, Genfamilien und Genome zwischen den phylogenetischen Reichen.

Der Nutzen einer Modellpflanze basiert auf der Annahme, dass sie viele ihrer Eigenschaften mit einer Reihe von verwandten Arten teilt. Daher hofft man, dass Gene, die mit wichtigen Stoffwechselwegen in Nutzpflanzen assoziiert sind, durch ihren Gegenpart in *A. thaliana* identifiziert werden können. Die komparative Genomanalyse hat ergeben, dass zusätzlich zu einer Konservierung von einzelnen Gensequenzen ein hoher Grad der Genomstrukturkonservierung zwischen nahe verwandten Arten besteht (Syntenie oder Ko-Linearität). Das bedeutet eine Konservierung von Gen-Gehalt, -Reihenfolge und -Orientierung zwischen Chromosomen verschiedener Spezies oder zwischen nichthomologen Chromosomen einer einzigen Art. Zwischen *A. thaliana* und nahe verwandten Arten wie *Brassica* (O'Neill und Bancroft, 2000) oder *Capsella* (Acarkan et al., 2000), die wie *A. thaliana* zur Familie der Brassicaceen gehören, besteht eine ausgeprägte Ko-Linearität. Auch in weiter entfernten Arten wie der Sojabohne wurde eine signifikante Syntenie z. B. zwischen dem *A. thaliana*-Chromosom 1 und der *linkage group* A2 der Sojabohne festgestellt (Grant et al., 2000). Sojabohne und *A. thaliana* sollen sich vor ca. 92 Millionen Jahren getrennt haben, *Capsella* und *A. thaliana* dagegen erst vor 6-10 Millionen Jahren. Beim Vergleich mit Sequenzen von Reis entdeckte man ebenfalls eine Mikro-Syntenie (Paterson et al., 1996); die Strukturähnlichkeit überschreitet also die Grenze zwischen Mono- und Dikotylen. Auch die Exon-Intronstruktur der Gene in *A. thaliana* und Reis gleicht sich häufig (Liu et al., 2001). Insgesamt ist das *A. thaliana*-Genom aber von limitiertem Nutzen für eine kartierende Genvorhersage und -isolierung in Gräsern (Devos et al., 1999). Aufgrund seines vergleichsweise kleinen Genoms (430 Mbp, Weizen besitzt ca. 16.000 Mbp) eignet sich Reis daher als eine Modellpflanze für Gräser (Chen et al., 1997; Devos und Gale, 2000).

Das *A. thaliana*-Genom besitzt eine Größe von ca. 125 Mb und enthält ca. 25.500 Gene (AGI, 2000). Dies sind wesentlich mehr als die 6.000 Gene, die in Hefe gefunden wurden und beruht hauptsächlich darauf, dass die Gene in *A. thaliana* in mehr als einer Kopie vorhanden sind. Insgesamt liegen ca. 60% des Genoms dupliziert vor, wobei 17% der Gene in Tandemanordnung arrangiert sind (AGI, 2000). Da das *A. thaliana*-Genom hauptsächlich aus verdoppelten und nicht etwa verdreifachten Regionen besteht, ist es wahrscheinlich, dass *A. thaliana* wie Mais einen tetraploiden Vorfahren besitzt. Der Zeitpunkt dieses Duplikationsvorgangs liegt wohl mindestens 112 Millionen Jahre zurück (Ku et al., 2000).

Genduplikation ist ein wichtiger Mechanismus für die Auseinanderentwicklung von Genen und den Erwerb von neuen Genfunktionen. Die genetische Redundanz führt zu einer Lockerung des Selektionsdrucks auf die Genkopie, welche nun Mutationen ansammeln kann (Pickett und Meeks-Wagneer, 1995). Ein Extrembeispiel hierfür ist die Duplikation eines ganzen Genoms, welche einen gewaltigen Zuwachs an genetischem Material, auf welches der Selektionsdruck wirken kann, liefert.

Polyploidie ist in Pflanzen weit verbreitet und ein Schlüsselfaktor in der Pflanzenevolution (Wendel, 2000). Die heutige biochemische Komplexität in höheren Pflanzen, Tieren und Pilzen ist möglicherweise z. T. das Resultat des Erwerbs neuer Gene und Genfunktionen nach Genomduplikation (Spring, 1997; Nowak et al., 1997; Larhammer und Risinger, 1994).

Von den mehr als 25 000 identifizierten Genen in *A. thaliana* ist die Funktion nur von einigen tausend Genen mit Sicherheit bekannt (Bouché und Bouchez, 2001). Ziel ist jetzt, die genaue Rolle jedes einzelnen Gens in Stoffwechsel und Entwicklung herauszufinden. Einen Ansatz hierfür bildet die reverse Genetik. Dabei werden Gene durch eine Transposon- oder T-DNA-Insertion unterbrochen und entsprechende Populationen über PCR analysiert. Bisher sind allerdings nur wenige informative *Knockout*-Mutanten in der Literatur beschrieben worden, weil die meisten Mutanten keinen sichtbaren Phänotyp besitzen (Thornycroft et al., 2001). Der Grund dafür kann in der Redundanz des *A. thaliana*-Genoms liegen. Nur 35% aller vorhergesagten Proteine in *A. thaliana* sind Einzelsequenzen und der Anteil an Genfamilien mit mehr als zwei Mitgliedern liegt in *A. thaliana* höher als in anderen Eukaryoten; so gehören 37.4% der Proteine zu Genfamilien mit mehr als fünf Mitgliedern, in *Drosophila* sind dies nur 12.1% (AGI, 2000). Seit Beginn des Sequenzierungsprojektes wurde eine Vielzahl von Studien über Multigenfamilien veröffentlicht (u.a. Axelsen und Palmgren, 2001; Bakarat et al., 2001; Diener et al., 2001; Mäser et al., 2001; Tavares et al., 2000), einige davon sind spezifisch für Pflanzen, manche kommen auch in anderen Eukaryoten vor (Riechmann et al., 2000; Shiu und Bleeker, 2001).

Die Analyse des *A. thaliana*-Genoms zeigte, dass zwar eine Vielzahl von Proteinen Ähnlichkeiten mit Proteinen aus *Synechocystis* aufweisen; aber nur 25% dieser vermutlich aus den Plastiden stammenden Proteine besitzen ein mögliches Transitpeptid, d.h. die meisten dieser Proteine erfüllen nun Aufgaben im Zytosol der Pflanzenzelle (AGI, 2000). Dagegen ist eine große Anzahl der Proteine mit Transitpeptid eukaryotischen Ursprungs bekannt. Dazu zählen Komponenten des Proteinimportapparates und Transporter, welche den Stoffaustausch wie den Export von Photoassimilaten zwischen Zytosol und Plastid erleichtern (Cavalier-Smith, 2000). Proteine mit diesen Funktionen wurden von den freilebenden Vorläufern der Endosymbionten nicht benötigt.

Die ersten isolierten cDNAs von pflanzlichen Transportern waren der TPT aus Spinatchloroplasten (Flügge et al., 1989), ein Hexosetransporter aus *Chlorella kessleri* (Sauer und Tanner, 1989) und drei H⁺ - ATPasen (Boutry et al., 1989; Harper et al., 1989; Pardo und Serrano, 1989). Das *A. thaliana* Genom eröffnet die Möglichkeit, erstmals alle Membranproteine einer Pflanze zu analysieren. Es stellte sich heraus, dass 18% der *A. thaliana*-Proteine zwei oder mehr Membranspannen besitzen (AGI, 2000). Nur 30% der Membranproteine liegen als Einzelsequenzen vor. 4111 Membranprotein-Gene lassen sich in Cluster von 411 Genfamilien zusammenfassen, die größte besitzt 50 Mitglieder. Nur 38% der Familien enthalten entweder Proteine

mit bekannter Funktion oder weisen Homologien zu charakterisierten Proteinen in anderen Spezies auf. Von Ward (2001) wurden allein zwölf Familien von Transportern beschrieben, die in Plastiden lokalisiert sind, bestehend aus 46 Mitgliedern von Genfamilien (hierzu zählt auch die Genfamilie der Phosphattranslokatoren) und vier Einzelsequenzen.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Über die Genfamilie der Phosphattranslokatoren existieren bisher nun lückenhafte Daten. Die Exon-Intronstruktur der einzelnen Gene ist ebenso unbekannt wie die Anzahl der Gene innerhalb einer Klasse. Außerdem stellt sich die Frage nach der Herkunft dieser Transporter und möglicher homologer Gene innerhalb eines eukaryotischen Genoms. Die verschiedenen physiologischen Funktionen der vier Phosphattranslokatorklassen äußern sich, wie dargestellt, in ihrem differentiellen Expressionsmuster. Expressionsanalysen wurden bisher aber stets nur für einzelne Gene und in unterschiedlichsten Pflanzen durchgeführt. Durch die vollständige Sequenzierung des *A. thaliana*-Genoms wird eine komparative Analyse der Expressionsprofile der unterschiedlichen Phosphattranslokatoren erleichtert. Ist die Anzahl der Phosphattranslokatorgene bekannt, kann man über Expressionsstudien und Promotor-Reportergenfusionen Rückschlüsse auf die Funktion der Proteine in den unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien einer Pflanze ziehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung aller Mitglieder der Phosphattranslokator-Genfamilie in *A. thaliana*. Die Exon-/Intronstrukturen der Gene sollen anhand der gegebenenfalls zu isolierenden cDNAs ermittelt und untereinander verglichen werden. Zusätzlich sollen Phosphattranslokator-homologe Sequenzen im *A. thaliana*-Genom analysiert werden.

Das Expressionsmuster der Phosphattranslokatorgene soll mit Hilfe von *Northern Blot* Analysen und/oder RT-PCR-Experimenten untersucht werden. Außerdem soll durch Promotor-GUS-Fusionen die Expression der *PT*-Gene in den verschiedenen Geweben von *A. thaliana* lokalisiert werden.

Durch Überexpression der Phosphattranslokatoren in jeweils geeigneten Mutanten sollen die *PT*-Proteine funktionell charakterisiert werden. Im einzelnen soll versucht werden, die *pgi1-1* Mutante durch die Expression des *GPT*-Gens und die *cue1-6*-Mutante durch die Expression des *PPT*-Gens zu komplementieren.

Ein weiteres Ziel ist die Expression der *PT*-Proteine in heterologen Systemen. Durch Transportmessungen mit den in Liposomen rekonstituierten *PT*-Proteinen kann die Substratspezifität der Transporter ermittelt werden. Außerdem soll ein Expressionssystem gefunden werden, durch welches rekombinantes Protein in größeren Mengen erhalten werden kann; dies könnte dann zur Gewinnung von Antikörpern durch Immunisierung von Kaninchen eingesetzt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

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

2.2. Enzyme

Enzyme für die Metabolitbestimmungen (α -Amylase, Amyloglukosidase, Glukose 6-P-Dehydrogenase, Hexokinase) wurden von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) bezogen.

2.3. Bakterien- und Hefestämme

2.3.1. *Escherichia coli*

Folgende *E. coli*-Stämme wurden verwendet:

C600HflA zur Phagendurchmusterung
supE44, hsdR, thi-1, leuB96, lacY1, tonA21, hflA150, [chr::Tn10(tet^r)]

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

ER2508 zur Proteinexpression
lon::Tn10D16D17D(malB)zkb::Tn5D(arg F-lac)U169, D(mcrC-mrr)20, ara-14, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl1, supE44, leuB6 fhuA2
 (Fa. NEB)

K802 zur Phagendurchmusterung
supE, hsdR, gal, metB

TG1 zur Proteinexpression
supE, hsd Δ 5, thi, (Δ lac-proAB), F[traD36, proAB+, lacIq, lacZ Δ M15]
(Brown, 1991)

XL1-Blue zur Plasmidamplifikation
supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac, F'[proAB+, lacI^q, lacZ Δ M15, Tn10(tet^r)]

2.3.2. *Agrobacterium tumefaciens*

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

2.3.3. *Saccharomyces cerevisiae*

InvSc1 zur Proteinexpression
his3 Δ 1 leu2 trp1-289 ura3-52

2.4. Vektoren

Folgende Vektoren wurden in dieser Arbeit verwendet

pBluescript KS (Stratagene)
pGEM-Teasy (Promega)
pGPTV-bar (Becker et al., 1992)
pET16 (Novagen)
pBinAR-KAN (Bevan, 1984, Höfgen und Willmitzer, 1990)
pBIN m-gfp5-ER (Haseloff et al., 1997)
pQE Serie (Qiagen)
pYES-2 NT (Invitrogen)

2.5. Phagenbibliotheken

Es wurden zwei verschiedene Phagenbibliotheken verwendet:

2.5.1. *Arabidopsis thaliana* Genomic Library (Fa. Clontech)

Vektor	EMBL3 SP6/T7
Zellen	K802

Es handelt sich um eine genomische Phagenbibliothek aus Rosettenblättern und Blütenstielen viereinhalb Wochen alter, im Licht angezogener Pflanzen von *A. thaliana* (Ökotyp Columbia). Die Insertlänge variiert zwischen 8 und 22 kb.

2.5.2. *Arabidopsis thaliana* 5'-STRETCH cDNA Library (Fa. Clontech)

Vektor	λgt10
Zellen	C600 <i>Hfl</i>

Diese cDNA-Bibliothek ist eine 5'-cDNA stretch-Phagenbank aus Rosettenblättern und Blütenstielen viereinhalb Wochen alter, im Licht angezogener Pflanzen von *A. thaliana* (Ökotyp Columbia). Die Insertlänge variiert zwischen 0.7 und 4.5 kb.

2.6. Reinigung und Analyse von DNA / DNA-Techniken

2.6.1. Agarose-Gelelektrophorese

10x Stoppuffer

20% (w/v)	Ficoll 400
100 mM	EDTA
1.0 % (w/v)	SDS
0.05% (w/v)	Bromphenolblau
0.05% (w/v)	Xylenblau
40 mM	Tris/Essigsäure pH7.5

50x TAE-Puffer

2 M	Tris/HAc pH 7.5
50 mM	EDTA

Ethidiumbromidlösung

5% (w/v) Ethidiumbromid in Methanol

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zu präparativen und analytischen Zwecken diente die Agarose-Gelelektrophorese. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit dem entsprechenden Volumen des zehnfach konzentrierten Stoppuffers versetzt. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0.5%ige (w/v) bis 2.5%ige (w/v) Gele hergestellt. Das Lösen der Agarose in 1x TAE-Puffer erfolgte durch Aufkochen in der Mikrowelle. Vor dem Gießen in eine Flachbettkammer wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0.5 mg/ml), um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Als Standard zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein 1 kb- bzw. 5 kb-Längenmarker der Firma Invitrogen (Eggenstein) verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 1x TAE als Laufpuffer durchgeführt. Die Dokumentation der Gele erfolgte durch eine Kamera mit PC-Anschluss (Video-Bildverarbeitungsgerät, Fa. Intas, Göttingen), die oberhalb einer UV-Durchlichtapparatur angebracht war.

2.6.2. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Elutionspuffer

50 mM Arginin
1 M NaCl

Vor und hinter der entsprechenden DNA-Bande wurde ein Schnitt in das Agarosegel gemacht, in den je ein Stück einer DEAE-Ionenaustauschmembran (Schleicher und Schuell, NA45) eingesetzt wurde. Nachdem die DNA bei 75 mA auf die vordere Membran gelaufen war, wurde diese in 400 µl Elutionspuffer überführt. Nach einer Stunde Inkubation bei 65°C wurde die Probe phenolisiert und die DNA durch Zugabe von 1 ml Ethanol gefällt.

Vorbehandlung der DEAE-Membranen:

Die NA45-Membran wurde in ca. 1 cm breite Streifen geschnitten, für zehn Minuten in 0.5 M NaOH gelegt und dann mehrmals gut mit dest. Wasser gespült. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in 10 mM EDTA pH 8.0.

Alternativ wurde ein Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

2.6.3. Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Die Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Na-Ac. pH 6.0 (oder 1/2 Vol. 7.5 M NH_4 -Ac.) und 2.5-3 Vol. Ethanol (oder 0.8 Vol. Isopropanol). Die Reaktion fand bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde die DNA für 30 Minuten bei $14\,000 \text{ min}^{-1}$ abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417), das Sediment zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in Wasser (bidest) aufgenommen.

2.6.4. Phenolextraktion

neutralisiertes Phenol

wassergesättigtes Phenol

1/50 Vol. 2.5 M Tris/HCl pH 8.2

Die Phenolextraktion dient der Entfernung von Proteinresten aus wässrigen DNA-Lösungen. Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen neutralisiertem Phenol sowie einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und kräftig geschüttelt. Nach fünf Minuten Zentrifugation bei $12\,000 \text{ min}^{-1}$ (Eppendorf Centrifuge 5417) wurde der wässrige Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Phenolextraktion gegebenenfalls wiederholt. Mit der DNA-haltigen Phase wurde dann eine Ethanol-fällung durchgeführt. In einigen Fällen, wenn besonders reine DNA benötigt wurde (für Sequenzierungen), wurde der Überstand vor der Fällung einmal mit Chloroform (Cl) extrahiert.

2.6.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen gilt: 1 OD_{260} entspricht einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ Doppelstrang-DNA und $40 \mu\text{g/ml}$ RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurepräparation kann man durch den Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren, gibt Verunreinigung durch Proteine an) abschätzen, der für eine proteinfreie Lösung 1.8-2.0 betragen sollte.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte außerdem durch Abschätzung der DNA-Menge im Agarosegel.

2.6.6. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von Doppelstrang-DNA mit Restriktionsenzymen fand normalerweise in einem Endvolumen von 20 μ l statt. Dabei wurden 0.5-3 U Enzym pro μ g DNA eingesetzt, 2 μ l des vom Hersteller mitgelieferten 10x Inkubationspuffers und die entsprechende Menge Wasser (bidest). Bei der Spaltung von DNA aus Plasmid-Minipräparationen wurden 5-10 μ g RNase *boiled* (DNase-frei) in den Ansatz gegeben. Die Probe wurde bei der für das entsprechende Enzym angegebenen Temperatur für 1-4 Stunden inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte entweder durch Zugabe von 5x Stoppuffer oder durch Phenolextraktion.

Spaltungen größerer Mengen DNA (10-20 μ g) für eine spätere Elution aus einem Agarosegel wurden in einem Endvolumen von 100 μ l durchgeführt.

2.6.7. Dephosphorylierung von Klonierungsvektoren

Die Dephosphorylierung von Klonierungsvektoren dient der Minimierung von Religationen in Ligationsansätzen von Vektoren mit glatten oder kompatiblen Enden.

Die linearisierte DNA wurde für 30-60 Minuten mit 1 U CIP (Calf Intestine Phosphatase, Roche) bei 37°C inkubiert. Der Ansatz besaß ein Endvolumen von 100 μ l und enthielt außer DNA und Enzym noch 10 μ l des mitgelieferten CIP-Puffers (10x) und Wasser (bidest). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μ l 0.5 M EDTA und zehn Minuten Inkubation bei 70°C gestoppt. Zur Entfernung des Enzyms wurde der Ansatz mit Phenol extrahiert. Anschließend wurde die DNA gefällt oder über eine Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

2.6.8. Phosphorylierung von DNA

Durch die T4 DNA Polynukleotid-Kinase (Fermentas, MBI) werden Phosphatgruppen von ATP auf die 5'OH-Gruppen von einzel- bzw. doppelsträngiger DNA übertragen (Ausubel et al., 1987). Diese Reaktion wurde vor einer Ligation durchgeführt, wenn ein PCR-Fragment ohne „A-Überhang“, also aus einer Reaktion mit der Pfu-Polymerase, in einen Vektor, der dephosphoryliert war, kloniert werden sollte. PCR-Produkte besitzen keine 5'-Phosphatgruppen.

2.6.9. Herstellung glatter Enden (*Fill in*)

5x *Fill in*-Puffer

50 mM	Tris/HCl pH 8.0
5 mM	MgCl ₂
5 mM	DTT

Mit Restriktionsenzymen behandelte DNA kann glatte oder 3'-bzw. 5'-überhängende Enden aufweisen. Durch die T4-DNA-Polymerase können überhängende Enden in glatte überführt werden. Das Enzym besitzt eine 5' → 3'-Polymeraseaktivität, die 5'-überhängende Enden auffüllt und eine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität, die 3'-überhängende Enden entfernt. Die Reaktion wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 1x-Puffer mit 1-2 U T4-DNA-Polymerase (Roche), 50 µg/ml BSA und je 100 µM der vier Desoxynucleotide durchgeführt und wurde durch Zugabe von 1 µl 0.5 M EDTA abgestoppt. Anschließend wurde der Ansatz phenolisiert und die DNA gefällt.

Herstellung glatter Enden mit Klenow

In einigen Fällen wurden 5'-überhängende Enden mit dem „Klenow-Fragment“ - der großen Untereinheit der DNA-Polymerase III aus *E. coli* - aufgefüllt.

2.6.10. Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase verbindet DNA-Fragmente, die endständige 3'-OH-Gruppen tragen, mit solchen, die 5'-Phosphatgruppen besitzen. Die Reaktion findet unter ATP-Hydrolyse statt. Dabei können sowohl zueinander komplementäre als auch glatte Enden miteinander verknüpft werden. Für Ligationen in linearisierten, dephosphorylierten pBSC-Vektor wurden stets ca. 200 ng Vektor verwendet. DNA-Fragment und Vektor wurden im molaren Verhältnis 1:1 bis 4:1 gemischt; der 20 µl-Ansatz enthielt zusätzlich 2 µl 10x-Ligase-Puffer und 1-2 U T4-DNA-Ligase (Promega). Die Reaktion wurde bei Ligationen mit glatten Enden für zwei Stunden bei Raumtemperatur, ansonsten über Nacht bei 14 °C durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz direkt für die Transformation verwendet.

2.7. Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Glyzerin für Stammkulturen

65 %	Glyzerin
0.1 M	MgSO ₄
25 mM	Tris/HCl pH 8.0

LB-Medium

10 g	Trypton	
5 g	Hefeextrakt	
10 g	NaCl	ad 1 l mit dest. Wasser

LBM-Medium

10 g	Trypton	
5 g	Hefeextrakt	
10 g	NaCl	
4 g	Maltose	ad 1 l mit dest. Wasser

YEB-Medium

5 g	Bacto Peptone	
5 g	Beef-Extract	
1 g	Hefeextrakt	
5 g	Saccharose	
0.5 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	ad 1 l mit dest. Wasser
Platten:	1.5% Agar	

Indikatorplatten

2 g	Trypton	
1 g	Hefeextrakt	
0.2 g	NaCl	
0.5 g	MgCl ₂	
3 g	Agar	
400 µl	Ampicillin (50mg/ml in 1 M Tris-Cl pH 8.0)	
1 ml	2% (w/v) X-Gal in Dimethylformamid	
40 mg	IPTG	ad 200 ml mit dest. Wasser

Antibiotikum	Endkonzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Stocklösung (mg/ml)	Lösungsmittel
Ampicillin	100	50	1 M Tris/HCl pH 8.0
Gentamycin	25	25	Wasser
Kanamycin (<i>E. coli</i>)	25	25	Wasser
Kanamycin (<i>A. tumefaciens</i>)	100	100	Wasser
Rifampicin	150	30	DMSO
Tetracyclin	12	12	80 % Ethanol

Tab. 2.1: Antibiotikakonzentrationen für *E. coli*- und *Agrobacterium*-Selektionsmedien.

E. coli-Stämme wurden in LB bzw. LBM-Medium bei 37°C angezogen, Agrobakterien in YEB-Medium bei 28°C. Für das Wachstum unter Selektionsbedingungen wurden den Medien die entsprechenden Antibiotika zugesetzt (Tab. 2.1). Für Blau/Weiß-Selektion von Bakterienkolonien auf Indikatorplatten wurden zu dem Medium 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-Gal (in DMSO) und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IPTG gegeben.

Stammkulturen wurden angelegt, indem 500 μl der entsprechenden Bakterienkultur mit 500 μl gepuffertem Glycerin für Stammkulturen (s.o.) versetzt, gut gemischt und entweder bei -20°C gelagert oder in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt wurden.

2.8. Transformation von Bakterien

2.8.1. Transformation TSS-kompetenter Zellen

2.8.1.1. Herstellung TSS-kompetenter Zellen (Chang & Miller, 1993)

TSS

3 g	PEG 8 000	
1.2 ml	1 M MgCl_2	
1.5 ml	DMSO	ad 30 ml mit LB pH 6.5-6.8

Bei der Herstellung von TSS wurden PEG und $MgCl_2$ zunächst in 25 ml LB gelöst. Nach Einstellung des pH-Wertes und Auffüllen auf 28.5 ml wurde die Lösung steril filtriert (Porengröße 0.45 μm). Anschließend wurde DMSO hinzugegeben.

100 ml LB wurden mit 600 μl einer über Nacht gewachsenen Vorkultur (DH5 α -Zellen) angeimpft. Wenn die Bakterien bis zu einer OD_{600} von 0.3-0.4 gewachsen waren, wurde der Ansatz auf zwei eisgekühlte Greinerröhrchen (50 ml) verteilt. Die Zellen wurden dann in einer vorgekühlten Zentrifuge (4°C) bei 2500 g für fünf Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wurde auf Eis gestellt und in 3-5 ml eisgekühltem TSS vorsichtig resuspendiert. 100 μl Aliquots wurden kurz in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.8.1.2. Transformation von TSS-kompetenten Bakterien

Zu 100 μl aufgetauten kompetenten Zellen wurden 10 μl Ligationsansatz oder 200 ng Plasmid-DNA gegeben. Nach einer halben Stunde auf Eis wurden die Zellen für 90 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend sofort wieder auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 900 μl LB-Medium wurden die Bakterien bei 37°C eine Stunde leicht geschüttelt.

200 μl bis 1 ml des Transformationsansatzes wurden dann auf einer Indikatorplatte bzw. einer LB-Platte mit einem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.8.2. Transformation von Agrobakterien

MGL-Medium

5 g	Bacto Peptone	
2.5 g	Hefeextrakt	
5 g	NaCl	
5 g	Mannit	
1.16 g	Na-Glutamat	
0.25 g	KH_2PO_4	
0.1 g	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	
1 mg	Biotin	ad 1 l mit dest. Wasser

2.8.2.1. Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien

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 OD_{600} ca. 0.04-0.08 betrug. Die Agrobakterien wuchsen ca. vier Stunden bis zu einer OD_{600} von ca. 0.5. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (fünf Minuten, 4°C, 2500 g) und in 40 ml eisgekühltem 1 mM HEPES (pH 7.0) resuspendiert, wieder abzentrifugiert 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 Eppendorfgläser verteilt, für 30 Sekunden sedimentiert und in 200-400 µl HEPES/Glycerin resuspendiert. 50 µl-Aliquots der kompetenten Agrobakterien wurden bei -80°C gelagert oder direkt verwendet.

2.8.2.2. Transformation elektrokompetenter Agrobakterien

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 1 ml YEB hinzugegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei 28°C unter leichtem Schütteln wurden die Zellen abzentrifugiert und in 200 µl YEB aufgenommen. 50 µl wurden ausplattiert.

2.9. Colony-PCR

Wenn positive Bakterienkolonien nicht durch Blau/Weiß-Selektion identifiziert werden konnten, wurde teilweise eine sog. Colony-PCR gemacht, um die Anzahl der durchzuführenden DNA-Minipräparation zur Gewinnung eines Plasmids mit dem gewünschten Insert zu reduzieren.

Dazu wurden Bakterienkolonien von über Nacht bei 37°C (für *E. coli*) oder 28°C (für *A. tumefaciens*) gewachsenen Kolonien zur Hälfte mit einer gelben Plastik-Pippettenspitze abgenommen und in ein PCR-Reaktionsgefäß mit vorgelegtem Reaktionsgemisch (einschließlich Taq-Polymerase und spezifischen Oligonukleotiden) überführt. Die Kolonien auf der Agarplatte wurden zuvor nummeriert, 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 Ansätzen, die auf dem Agarosegel ein Fragment der erwarteten Länge zeigten, wurden anschließend ü.N. in Schüttelkulturen für DNA-Minipräparationen angezogen.

2.10. Plasmidisolierung aus *E. coli* nach Birnboim & Doly (1979)

Lösung I

25 mM	Tris/HCl pH 8.0
50 mM	Glukose
10 mM	EDTA

Lösung II

0.2 M	NaOH
1% (w/v)	SDS

Lösung III

7.5 M	NH ₄ -Acetat pH 7.5
-------	--------------------------------

2.10.1. Plasmidisolierung aus *E. coli* - Zellen

Am Vorabend wurden von einer Platte Klone gepickt oder 10 μ l Bakterien aus Stammkulturen angeimpft. Die Anzucht der Zellen erfolgte über Nacht in 5 ml LB, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, bei 37°C in einem Schüttler (Fa. New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen). Agrobakterien wurden ca. zwei Tage bei 28°C angezogen. 500 μ l der Kultur wurden am nächsten Tag abgenommen und als Stammkultur bei -20°C gelagert, nachdem 500 Glyzerin für Stammkulturen hinzugegeben wurden (2.7.). Die restlichen Zellen wurden bei 3000 min^{-1} (Heraeus Medifuge) für 15 Minuten abzentrifugiert und mit 50 mM Tris/HCl pH 8.0 einmal gewaschen. Die Sedimente wurden in 100 μ l Lösung I aufgenommen und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 μ l Lösung II - zur alkalischen Lyse der Zellen - hinzugegeben. Nach kräftigem Mischen wurde für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 150 μ l eisgekühlter Lösung III wurde das Gemisch neutralisiert. Dabei fielen SDS, Proteine und die chromosomale DNA aus, die Plasmid-DNA bleibt in Lösung. Die Proben wurden zehn Minuten auf Eis inkubiert und dann zehn Minuten bei 14000 min^{-1} (Eppendorf Centrifuge 5417) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Phenol extrahiert. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 1.0 ml Ethanol gefällt und direkt für 30 Minuten abzentrifugiert (14000 min^{-1} , Eppendorf Centrifuge 5417). Nach zweimaligem Waschen mit 75%igem Ethanol wurde das im Exsikkator getrocknete Sediment in 40 μ l Wasser (bidest) aufgenommen.

2.10.2. Plasmidisolierung aus Agrobakterien

Für die Plasmidisolierung aus Agrobakterien wurde das beschriebene Protokoll leicht abgeändert:

Nach Aufnahme des Zellsedimentes in Puffer I, dem eine Spatelspitze Lysozym zugefügt wurde, erfolgte eine halbstündige Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe von Puffer II und Puffer III (s.o.) wurde der Überstand sofort mit 100 % Ethanol gefällt (30 min 14000 min⁻¹, Eppendorf Centrifuge 5417), das Sediment zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl H₂O bidest mit 10 µg RNase *boiled* aufgenommen. Nach dem RNase-Verdau (30 min 37°C) wurde der Ansatz phenolisiert, gefällt und das Sediment in 25 µl H₂O bidest aufgenommen. Davon wurden 5-10 µl für einen Testverdau eingesetzt.

2.11. Durchmusterung von cDNA- und genomischen Banken

BBL-Platten

10 g	Trypton	
2.5 g	NaCl	
12 g	Agar	ad 1 l mit dest. Wasser

SM-Puffer

50 mM	Tris/HCl pH 7.5
100 mM	NaCl
8 mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O

Topagarose

10 g	Trypton	
2.5 g	NaCl	
2.0 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	
6.5 g	Agarose	ad 1 l mit dest. Wasser

PS-Medium

10 g	Trypton	
5 g	Hefeextrakt	
5 g	NaCl	
2 g	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	ad 1 l mit dest. Wasser

2.11.1. Ausplattierung

Die Bakterien wurden in LBM-Medium über Nacht bei 37°C angezogen, abzentrifugiert und in 1/10 Volumen SM aufgenommen.

Es wurden entweder kleine (Durchmesser 4.2 cm) oder große (12 cm x 12 cm) BBL-Agarplatten verwendet. 1 µl Phagensuspension der gewünschten Konzentration (mit SM eingestellt) wurde auf 50 µl oder 75 µl Zellen pipettiert. Für 30 Minuten wurde der Ansatz bei Raumtemperatur inkubiert, dann in 1.5 ml bzw. 5 ml Topagarose (45°C) überführt und nach gutem Mischen auf vorgewärmte (45°C) BBL-Platten gegossen. Nach Festwerden der Agarose wurden die Platten für zwölf Stunden bei 37°C inkubiert.

2.11.2. Amplifizierung von λ -Phagen

Die Phagen wurden in einer Dichte von ca. 10¹⁰ pro Platte ausplattiert und über Nacht angezogen, dann mit 3 ml SM überschichtet und für zwölf Stunden bei 4°C gelagert. Das SM-Medium mit den Phagen wurde abgenommen, mit 40 µl Chloroform versetzt und für 30 Sekunden kräftig gemischt. Die Lagerung der amplifizierten Phagen fand bei 4°C statt.

2.11.3. Präparation von λ -Phagen

Auf 50 µl Zellen wurden 125 µl amplifizierte Phagen gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann in einen Kolben mit 40 ml PS-Medium überführt. Für zwölf Stunden wurden die Kolben bei 37°C leicht geschüttelt. Dann wurden zum Abtöten der Zellen zu jedem Ansatz 200 µl Chloroform gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 6-8°C abzentrifugiert (zehn Minuten, 10⁴ min⁻¹, Sorvall, Rotor SS-34). Der phagenhaltige Überstand wurde in 50 ml-Greinerröhrchen überführt und zur Entfernung bakterieller Nukleinsäuren mit 60 µl RNase (10 mg/ml) sowie 90 µl DNase (10 mg/ml) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von NaCl ad 2% (w/v) und PEG 8000 ad 8% (w/v) wurden die Phagen gefällt (zwei Stunden auf Eis) und später sedimentiert (zehn Minuten, 10⁴ min⁻¹, Sorvall, Rotor SS-34). Die Proteinhülle der in 0.5 ml SM resuspendierten Phagen wurde durch Zugabe von 50 µl 0.5 M EDTA, 31 µl SDS (20%) und 5 µl Proteinkinase K (10 mg/ml) und einstündige Inkubation bei 65°C zerstört. Die freigesetzte DNA wurde zweimal phenolisiert und dann mit 1 Volumen NH₄-Ac. und einem Volumen Isopropanol gefällt. Die ausgefallene DNA wurde in 1 ml 75%igen Ethanol überführt, zweimal gewaschen und in 100 µl Wasser (bidest) aufgenommen.

Für Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen wurden 10 μ l DNA eingesetzt. Der Ansatz enthielt zusätzlich 1 mM Spermidin und wurde für mindestens zehn Stunden bei 37°C durchgeführt. Nach Auftrennung der Fragmente auf einem Agarosegel wurde entweder ein *Southern Blot* (2.12) durchgeführt oder das cDNA- bzw. genomische DNA-Fragment wurde aus dem Gel eluiert und in den pBSC-Vektor kloniert.

2.11.4. Durchmusterung von cDNA- und genomischen Banken

Denaturierungslösung

0.5 M	NaOH
1.5 M	NaCl

Neutralisierungslösung

0.5 M	Tris/HCl pH 7.5
2 M	NaCl

20x SSPE

0.2 M	NaH ₂ PO ₄ pH 7.5
3 M	NaCl
20 mM	EDTA

Zur Durchmusterung der Banken wurden 200-500 $\times 10^3$ Phagen aus der entsprechenden Genbank ausplattiert und über Nacht angezogen. Vor der Überführung der Phagenplaques auf eine Nylonmembran (Hybond-N) wurden die Platten zum Härten für mehrere Stunden bei 4°C gelagert und dann für 30 Minuten unter der Sterilbank getrocknet.

Die trockenen Filter wurden vorsichtig auf die Oberfläche der Topagarose aufgelegt. Durch Ansaugen der Feuchtigkeit wurden die Phagen so aus dem Medium auf die Filter übertragen, welche durch Einstiche mit einer in Tinte getränkten Nadel mit einer eindeutigen (asymmetrischen) Markierung versehen wurden. Es wurden von jeder Platte zwei Filterabzüge angefertigt. Der erste Filter lag eine Minute, der zweite drei Minuten auf der Topagarose. Weiter wurden die Filter nacheinander mit folgenden Lösungen behandelt: der Denaturierungslösung (vier Minuten), der Neutralisierungslösung (zehn Minuten) und 2xSSPE (zehn Minuten). Dabei wurden die Filter mit der Phagenseite nach oben auf mit der entsprechenden Lösung getränktes 3MM-Papier (Whatman) gelegt.

Die Filter wurden anschließend getrocknet und für drei Stunden bei 80°C gebacken. Sie konnten dann für die Hybridisierung (s. 2.12.2) mit der entsprechenden DNA-Sonde verwendet werden. Bei Verwendung einer heterologen Sonde wurde die Hybridisierungstemperatur auf 62°C gesenkt.

Positive Signale wurden entsprechenden Phagenplaques zugeordnet. Diese wurden mit einer abgeflammtten Spatelspitze ausgestochen und in 100 μ l SM-Medium überführt. Nach Zugabe von 10 μ l Chloroform und kurzem Mischen wurden die Phagen bei 4°C aufbewahrt. Wenn es nicht möglich war, einzelne Plaques zu picken, z.B. beim erstmaligen Durchmustern einer Bank, wurde das Protokoll zur Sichtung der Phagen bis zur Homogenität der positiven Signale wiederholt (*Rescreening*).

2.12. Southern Blot (Southern, 1975)

2.12.1. Alkalischer Southern Blot

Membran

Hybond N⁺ (Amersham)

Denaturierungs- und Transferlösung

0.4 M NaOH

20x SSC

0.3 M Na-Citrat

3 M NaCl

Im *Southern*-Blotverfahren wird die DNA aus einem Agarosegel auf ein Nitrocellulosefilter oder eine Nylonmembran (Hybond N⁺) übertragen. Die Membran, die für Standard-Blots verwendet wurde, ermöglicht ein effizientes Binden der DNA bei basischem pH, weswegen ein Neutralisieren des Gels entfiel.

Aufbau des Blots (*downward transfer*): auf einen Stapel Papierhandtücher wurden vier Lagen auf Gelgröße zurechtgeschnittenes 3MM-Papier gelegt, von denen die beiden obersten mit der Transferlösung getränkt wurden. Darauf folgte die kurz in 0.4M NaOH getauchte Membran. Nun wurde das zuvor für zehn Minuten in 0.4M NaOH inkubierte Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Die nächste Schicht bildeten zwei Lagen mit 0.4M NaOH angefeuchtetes 3MM-Papier. Die Oberseite des Blots wurde durch eine Brücke aus 3MM-Papier mit einem Vorratsgefäß für die Transferlösung verbunden. Um einen möglichen „Diffusionsstrom“ neben dem Gel zu vermeiden, wurde das Agarosegel mit Frischhaltefolie umrandet. Zur Beschwerung wurde eine Glasplatte auf den Blot aufgelegt.

Nach 2.5 Stunden sollte die DNA quantitativ auf die Membran transferiert sein. Nach dem Blotten wurde die Membran neutralisiert, indem sie für fünf Minuten in 2xSSC

gelegt wurde. Die verwendete Membran ermöglichte durch einfaches Trocknen eine kovalente Quervernetzung der DNA.

2.12.2. Southern Blot für genomische DNA

Denaturierungslösung

1.5 M	NaCl
0.5 M	NaOH

Neutralisierungslösung

1 M	NH ₄ Ac.
10 mM	NaOH

Für ein effizientes Blotten von Gelen mit einem Restriktionsverdau genomischer DNA erfolgte der Transfer der Nukleinsäuren über Nacht im *upward*-Verfahren. Dazu wurde die DNA zunächst denaturiert, indem man das Gel für 30 min unter leichtem Schwenken in Denaturierungslösung inkubierte. Nach Neutralisierung (30 min in Neutralisierungslösung) wurde mit einer hochkonzentrierten Salzlösung (20xSSC) geblottet. Der Blotaufbau war dabei umgekehrt wie der oben beschriebene, d.h. zunächst wurde 20xSSC in eine Wanne gefüllt und mit einer Glasplatte abgedeckt; Whatman Papier wurde über die Glasplatte gelegt, so dass es auf beiden Seiten in den Puffer eintauchte. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf das mit 20xSSC getränkte Whatman Papier gelegt, darauf wurde dann eine mit SSC getränkte Membran (Hybond N oder Hybond N⁺, Amersham) gelegt. Das Gel wurde abgedichtet und auf die Membran wurden vier Lagen mit SSC getränktes Whatman Papier gelegt, darüber wurde ein ca. 5 cm hoher Stapel Küchenpapier positioniert. Zur Beschwerung des Blots wurde eine Glasplatte und ein Gewicht von ca. 1 kg aufgelegt. Nach 12-16 h wurde der Blot abgebaut, die Membran kurz in 2xSSC geschwenkt und dann für 2 h (Hybond N) oder 30 min (Hybond N⁺) bei 80°C gebacken.

2.12.3. Radioaktive Markierung von DNA (*Labeling*)

Lösung A = OLB A

1.25 M	Tris/HCl pH 8.2
0.125 M	MgCl ₂
2 % (w/v)	β-Mercaptoethanol
je 0.5 M	dCTP, dGTP, dTTP

Lösung B = OLB B

2 M HEPES/NaOH pH 6.6

Lösung C = OLB C

3.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Hexadesoxynukleotide (dN₆)

OLB-Puffer (5 x)

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

Die zu markierende DNA wird zunächst denaturiert (95°C), der komplementäre DNA-Strang wird anschließend durch eine DNA-Polymerase neu synthetisiert. Da der Reaktion ein radioaktives Desoxynukleotid zugesetzt wird, kann der neu synthetisierte Strang mit einer hohen spezifischen Aktivität markiert werden. Als Primer für die Neusynthese dienen Hexadesoxynukleotide mit zufälliger Sequenz, die an beliebige Stellen eines DNA-Einzelstranges binden können.

30 μl DNA-Lösung (200-500 ng) wurden zusammen mit 10 μl OLB-Puffer zum Denaturieren der DNA für zehn Minuten auf 95°C erhitzt. Zu dem Ansatz wurden 2 μl BSA (1 mg/ml), 20-30 μCi (^{32}P)-dATP sowie 3 U „Klenow-Fragment“ hinzugegeben. Der Ansatz wurde für vier Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 30°C inkubiert. Der Einbau der Radioaktivität wurde durch eine TCA (Trichloressigsäure)-Fällung (Ansatz s. u.) mit anschließender Zentrifugation (14000 min^{-1} , sieben Minuten, Eppendorf Centrifuge 5417) und Vergleich der Aktivitäten in Sediment und Überstand kontrolliert:

Ansatz:	100 μl	H ₂ O
	5 μl	Heringssperm-DNA (10 mg/ml), denaturiert
	1.5 μl	Labeling-Ansatz
	135 μl	TCA (20%)

Der Einbau des (^{32}P)-dATP erfolgte normalerweise mit einer Effizienz von über 80%.

Die Trennung der Sonde von nicht eingebauten Nukleotiden fand über eine Säule (MicroSpin S-200 HR Colum, Pharmacia) statt.

2.13. Hybridisierung von *Southern Blots* und Phagen-DNA Filtern

100x Denhardt

2 % (w/v)	Ficoll 400
2 % (w/v)	PVP 40
2 % (w/v)	BSA

Hybridisierungslösung

4-6 x	SSC
3-4 x	Denhardt
0.5 % (w/v)	SDS

Waschlösung

0.5-2x	SSC
0.5 % (w/v)	SDS

Heringssperm-DNA

0.01 % (w/v) Heringssperm-DNA, sonifiziert

Die Nylonmembran mit der fixierten DNA wurde bei 65°C für 1-3 Stunden vorhybridisiert (in Hybridisierungslösung, der 0.5 ml denaturierte Heringssperm-DNA zugesetzt wurde). Die Hybridisierung erfolgte in möglichst kleinem Volumen für 4-18 Stunden. Dabei wurde entweder neu markierte DNA (10-20 µCi, zehn Minuten bei 95°C denaturiert) zu der Vorhybridisierungslösung gegeben, oder letztere wurde gegen eine schon früher verwendete und nun für 20 Minuten auf 95°C erhitzte Sonde ausgetauscht. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zur Entfernung der unspezifisch gebundenen Radioaktivität mehrmals mit zunehmender Stringenz, also abnehmender Salzkonzentration, für jeweils 20 Minuten bei 65°C gewaschen. Auf die getrockneten Filter wurde für acht (bei *Southern Blots*) bis 20 (bei Filtern von Phagenplatten) Stunden ein Screen aufgelegt.

2.14. Anzucht und Transformation von *Arabidopsis thaliana*

2.14.1. Pflanzenmaterial

Es wurde mit *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. cv. Columbia gearbeitet.

2.14.2. Sterilisation des Saatguts

2.14.2.1. Flüssig-Sterilisation

70% Ethanol (steril)

Sterilisierungslösung

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

Ungefähr 50 Samen wurden in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben, mit 1 ml 70%igem Ethanol versetzt und kurz geschüttelt. Nachdem die Samen sich abgesetzt hatten, wurde der Überstand abgenommen und 1 ml der Sterilisierungslösung hinzugegeben. Nach 20 Minuten auf einem Schüttler wurden die Samen fünfmal mit sterilem Leitungswasser gewaschen.

2.14.2.2. Sterilisierung mit Chlorgas:

Zu 100 ml Na-Hypochlorit wurden in einem Becherglas, das in einem geschlossenen Glasbehälter stand, 3 ml HCl gegeben. Die Samen in den geöffneten Reaktionsgefäßen wurden für ca. 3 h durch das sich entwickelnde Chlorgas sterilisiert. Anschließend wurden die Gefäße mit den Samen noch für ca. 2 h unter die Sterilbank zum Abdampfen gestellt.

2.14.3. Anzucht auf Erde

Material

Einheitserde Typ Minitray	Einheitserde Werksverband e.V. Gebr. Patzer KG (Sinntal-Jossa)
Europa-Pflanzschale Typ PS (60x40x6 cm)	Manna
Gelbtafel	Neudorff

Kunststoffhaube für Pikierkisten	Romberg
Kunststofftöpfe 7x7x8 cm	Meyer, Rellingen
Pikierkiste mit gelochtem Boden (50x32x6 cm)	Manna

Hoagland-Medium, modifiziert für *Arabidopsis thaliana*

59.0 mM	KH_2PO_4	
5.0 mM	KNO_3	
4.7 mM	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	
3.0 mM	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	
1.5 mM	NH_4NO_3	
34.0 μM	H_3BO_3	
7.0 μM	$\text{MnCl}_2 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	
0.57 μM	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	
0.38 μM	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	
0.38 μM	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	
15 mg/l	Sequestrin 138-Fe	pH 5.5

Die Pflanzen wurden auf einem Gemisch aus drei Teilen Erde und einem Teil Vermiculit (Basalt Feuerfest, Linz) angezogen. Etwa zehn Samen pro Quadratcentimeter wurden auf das mit Leitungswasser durchfeuchtete Erdgemisch gestreut. Einzelne Töpfe wurden mit Frischhaltefolie, Schalen dagegen mit Pikierhauben abgedeckt, um Kontaminationen mit Fremdsamen zu vermeiden und um - sobald die Brechung der Samenruhe erfolgt war - für feucht-warme Bedingungen zu sorgen. Zur Stratifizierung kamen die Saattöpfe zunächst für zwei Tage in den Kühlraum (4°C). Später wurden die Pflanzschalen bzw. Töpfe in die Klimakammer bzw. unter die Lichtbank gestellt (Photonenflußdichte 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, Licht-Dunkel-Wechsel 10:14 Stunden, ca. 20°C). Nachdem die Keimblätter vollständig entfaltet waren, wurde die Pikierhaube/Frischhaltefolie 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* (Konsz et al., 1992). 10-14 Tage nach der Aussaat wurden die Pflanzen vorsichtig pikiert. Je vier *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in einen runden Topf (Durchmesser 9 cm) gesetzt und sofort mit Leitungswasser angestaut. Sollten die Pflanzen für eine Vakuumfiltration mit Agrobakterien verwendet werden, wurden die Stängel bei Beginn der Blüte zurückgeschnitten. Die Blüten der neu aus der Blattrosette herausgewachsenen Stängel wurden dann für die Transformation benutzt.

Schädlingsbekämpfung erfolgte mit Gelbtafeln (gegen schwarze Fliegen), bei Blattlausbefall wurde das Insektizid Demeton-S-methyl (Metasoystox[®]) als 25%ige Emulsionsspritzlösung eingesetzt.

Pflanzenmaterial für die Gewinnung von RNA wurde nach der Ernte sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für DNA-Präparationen wurde Blattmaterial geerntet, gewogen, in flüssigen Stickstoff getaucht und bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Zur Samengewinnung von infiltrierten Pflanzen nach Abschluss der Blütezeit wurden diese, nachdem die ersten Schoten sich gelb gefärbt hatten, mit Papiertüten überstülpt, und die Bewässerung wurde 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 $450\ \mu\text{m}$) abgetrennt wurden. Die in $1.5\ \text{ml}$ -Eppendorfgefäßen gesammelten Samen wurden zur vollständigen Trocknung für zwei Tage unter einen Abzug gestellt. Reste transformierter Pflanzen wurden autoklaviert, Reste nicht transgener Pflanzen kompostiert.

2.14.4. Anzucht auf Platten

MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962)

2.99 mM	CaCl_2
0.11 μM	CoCl_2
0.10 μM	CuSO_4
0.10 mM	FeNaEDTA
0.10 mM	H_3BO_4
1.25 mM	KH_2PO_4
5.00 μM	KJ
18.79 mM	KNO_3
1.50 mM	MgSO_4
0.10 mM	MnSO_4
1.03 μM	Na_2MoO_4
20.61 mM	NH_4NO_3
29.91 μM	ZnSO_4
26.64 μM	Glyzin
0.56 mM	myo-Inositol
4.06 μM	Nicotinsäure
2.43 μM	Pyridoxin-HCl
0.30 μM	Thiamine-HCl

pH mit KOH auf 5.7 einstellen

Platten: 0.6 % (w/v) Bitec-Agar

Das Medium wurde in vorgemischter, trockener Form bezogen (Duchefa Biochemie BV, Haarlem, Niederlande).

Sterilisierte Samen wurden auf MS-Platten mit 1% Saccharose ausgelegt, für zwei Tage stratifiziert und anschließend in einem Klimaschrank (Bertold LB 122) bei 20°C, $36\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Photonenfluß und einem Licht-Dunkel-Wechsel von 10:14 Stunden inkubiert. Wurzelmaterial wurde nach ca. zwei Wochen geerntet.

2.14.5. Anzucht in sterilen Schüttelkulturen

MS+Vitamin-Medium für Sterilkulturen

4.6 g	MS-Medium mit modifizierten Vitaminen
3 %	Saccharose
	pH mit KOH auf 5.6 einstellen

In autoklavierte 300 ml Erlenmeyerkolben wurden 100-150 ml autoklaviertes MS+Vitamin-Medium gegeben. In das Medium wurden ca. 15 sterilisierte Samen eingespritzt. Die Kolben wurden mit autoklavierten Wattestopfen versehen und für zwei Tage in den Kühlschrank gestellt (4°C). Anschließend wurden die Kolben auf einem Schüttler (Infors AG, Basel) bei 27°C inkubiert. Nach zwei bis drei Wochen konnte das Pflanzenmaterial geerntet werden. Dazu wurden die Pflanzen mehrmals gründlich mit Leitungswasser gespült, auf Küchenkrepppapier kurz angetrocknet, gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.14.6. Pflanzen-Selektionen

2.14.6.1. Selektion auf Agarplatten

Für Selektionen auf Agarplatten wurden Antibiotikastammlösungen zum handwarmen Medium hinzugefügt (Tab. 2.2). Platten, die für Samen von vakuumfiltrierten Pflanzen bestimmt waren, enthielten Cefotaxim, welches das Wachstum eventuell noch in den Samen vorhandener Agrobakterien verhindert.

Antibiotikum	Endkonzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Stocklösung (mg/ml)	Lösungsmittel
Cefotaxim	500	-	Wasser
Hygromycin	30	-	-
Kanamycin	50	50	Wasser

Tab. 2.2: Antibiotikakonzentrationen für Pflanzen-Selektionsmedien. Alle Antibiotika wurden von der Firma Duchefa Biochemie B.V. in Haarlem, Niederlande, bezogen. Kanamycin wurde als Feststoff eingewogen, als konzentrierte Stammlösung in Wasser gelöst und steril filtriert. Aliquots wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Hygromycin war als sterile Flüssigkeit ($418.6\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) mit einer spezifischen Dichte von $1.13\ \text{g/ml}$ erhältlich und wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Cefotaxim wurde als Feststoff in der benötigten Menge unmittelbar vor dem Gießen der Platten eingewogen, in Wasser gelöst, steril filtriert und dem Medium hinzugefügt.

2.14.6.2. BASTA-Selektion

BASTA-Gebrauchslösung:

250 mg/l BASTA[®]
0.1% Tween-20

Transgene Pflanzen, die das *bar*-Gen enthielten, welches die Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin (BASTA) vermittelt, wurden auf Erde angezogen. Die Selektion erfolgte sobald nach den Keimblättern die ersten Folgeblätter erschienen (Vierblatt-Stadium). Die Pflanzen wurden mit der Herbizidlösung aus einem Abstand von ca. 30 cm besprüht. Wenn die Pflanzen sehr dicht standen, wurde dieser Vorgang nach ca. einer Woche wiederholt.

2.15. Vakuuminfiltration (nach Bechthold et al., 1993)

Infiltrationsmedium

1/2 MS-Medium mit Vitaminen
0.01 mg/ml BA (6-Benzylaminopurin) (Stamm: 10 mg/ml in 1 M NaOH)
50 g/l Saccharose

pH auf 5.8 einstellen
einen Tropfen Sapogenat T-110 (Hoechst) hinzufügen

Agrobakterien wurden bei 28°C bis zu einer OD_{600} von 0.8-1.0 angezogen, dann für 15 Minuten bei $2500\ \text{g}$ abzentrifugiert. Die Zellen wurden in Infiltrationsmedium aufgenommen (in einem Drittel des ursprünglichen Volumens).

Auf Erde gewachsene *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen mit Infloreszenzen in 10-15 cm Höhe wurden in einem Vakuumexsikkator kopfüber in die Agrobakterienlösung getaucht, so dass Blüten und Knospen gut bedeckt waren. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde für 20 Minuten ein Vakuum angelegt. Anschließend wurden die Pflanzen gewässert und für die nächsten zwei Tage mit einer durchsichtigen Plastikhaube abgedeckt, die zur Aufrechterhaltung einer hohen Luftfeuchtigkeit mehrmals täglich von innen mit Leitungswasser besprüht wurde.

2.16. Präparation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

2.16.1. Präparation nach Ausubel et al., 1987

2x CTAB-Puffer

2% (w/v)	CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	
1.4 M	NaCl	
0.2%	Mercaptoethanol	
20 mM	EDTA	wird steril filtriert
100 mM	Tris/HCl (pH 8.0)	
1%	PVP (M _r 40.000)	

10% CTAB-Lösung

10%	CTAB
0.7 M	NaCl

CTAB Fällungspuffer

1%	CTAB
50 mM	Tris/HCl (pH 8.0)
10 mM	EDTA

Hochsalz-TE

10 mM	Tris/HCl (pH 8.0)
1 mM	EDTA
1 M	NaCl

0,1x TE

1 mM	Tris/HCl (pH 8.0)
0.1 mM	EDTA

CI

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

TE

10 mM Tris/HCl (pH8)

1 mM EDTA

Polyclar (Serva, Heidelberg)

1g gemörstertes Blattmaterial (Frischgewicht) von *Arabidopsis thaliana* bzw. 1g Material aus *Arabidopsis*-Flüssig-Sterilkulturen wurde in gefrorenem Zustand in ein 2ml-Eppendorfgefäß überführt, das 1ml CTAB, 10µl ME (Mercaptoethanol) und eine Spatelspitze Polyclar enthielt (vorgewärmt auf 65°C). Nach 25 Minuten Inkubation bei 65°C (Wasserbad) wurde 1 Volumen CI zu der Lösung gegeben und vorsichtig gemischt. Nach Zentrifugation (13000min⁻¹, fünf Minuten, Eppendorf Centrifuge 5417) wurde die Oberphase abgenommen und mit einem Volumen CTAB-Fällungspuffer versetzt. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde für fünf Minuten bei 4600min⁻¹ (Eppendorf Centrifuge 5417) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 400µl Hochsalz-TE aufgenommen, dann wurden 800µl Ethanol hinzugegeben. Nach zehn Minuten fand ein weiterer Zentrifugationsschritt statt (fünf Minuten, 4600 min⁻¹, Eppendorf Centrifuge 5417). Es wurde zweimal mit 80%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurden je fünf Sedimente in insgesamt 500µl Wasser (bidest) vereinigt. Nach Zugabe von 10µl RNase *boiled* (10mg/ml) und 45 Minuten Inkubation bei 37°C wurden 500µl puffergesättigtes Phenol (P) zu dem Ansatz gegeben. Es wurde kurz gemischt, bevor 500µl CI hinzugefügt wurden. Danach wurde für fünf Minuten bei 11200 min⁻¹ (Eppendorf Centrifuge 5417) zentrifugiert, die DNA-enhaltende Oberphase abgenommen und erneut phenolisiert. Die Fällung der DNA fand durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Na-Ac. pH6 und 2 Vol. Ethanol statt. Nach Zentrifugation (fünf Minuten 4600 min⁻¹, Eppendorf Centrifuge 5417) wurde das Sediment zweimal mit 80%igem Ethanol gewaschen und in 100µl TE oder Wasser (bidest) aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei 260nm. Für Restriktionsanalysen wurden ca. 10µg DNA eingesetzt.

2.16.2. DNA-Schnellpräparation für PCR-Reaktionen

Extraktionspuffer

200 mM	Tris/HCl (pH 7.5)
250 mM	NaCl
25 mM	EDTA
0,5% (w/v)	SDS
autoklaviert	

3M K-Acetat (pH6.0) autoklaviert

Isopropanol

1x TE-Puffer

10 mM	Tris/HCl (pH8.0)	
1 mM	EDTA	autoklaviert

Die Präparation genomischer Pflanzen-DNA für PCR-Analysen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Edwards et al. (1991).

Hierfür wurden 1-2 *Arabidopsis*-Rosettenblätter geerntet und entweder sofort verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Das Blattmaterial wurde dann bei RT in den Kavitäten einer 96er Kunststoff-Multi-Titerplatte mit einem Kunststoffpistill zerrieben. Das homogenisierte Gewebe wurde mit $400\ \mu\text{l}$ Extraktionspuffer in ein Reaktionsgefäß überführt und für 3-4s auf Stufe 7 gevortext. Um Proteine aus dem Extrakt zu entfernen, wurden $150\ \mu\text{l}$ 3M K-Acetat (pH6.0) zugegeben, durch Invertieren kurz gemischt und bei $13000\ \text{min}^{-1}$ in einer Eppendorf 5417 Zentrifuge für 2min zentrifugiert. $550\ \mu\text{l}$ des Überstandes wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit $550\ \mu\text{l}$ Isopropanol gemischt. Nach zwei min Inkubation bei RT wurde die gefällte DNA bei $13000\ \text{min}^{-1}$ für 5 min pelletiert (Eppendorf Zentrifuge 5417, $13000\ \text{min}^{-1}$). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet unter dem Abzug ca. 20-30 min getrocknet und in je $70\text{-}100\ \mu\text{l}$ 1x TE resuspendiert. Für eine PCR-Reaktion wurden je $2\text{-}5\ \mu\text{l}$ eingesetzt. Die Lagerung der DNA (bis zu einem Jahr) erfolgte bei 4°C .

2.16.3. Genomische DNA aus *A. thaliana* für Southern Blot Analysen

Isolation von Blüten-DNA

2 x Puffer

0.6 M	NaCl
100 mM	Tris/HCl pH 7.5
40 mM	EDTA
4% (w/v)	Sarkosyl
1 % (w/v)	SDS

Extraktionspuffer

25 ml	2 x Puffer
	20 ml 12 M Harnstoff
	2.5 ml Phenol
	2.5 ml H ₂ O

PCI

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1

TE

10 mM	Tris/HCl pH 8.0
1 mM	EDTA

Eine schnelle Möglichkeit zur Präparation genomischer DNA in guter Qualität (geeignet für genomische *Southern Blots*) stellt die Isolation von DNA aus *Arabidopsis*-Blüten dar. Dazu wurden zwei bis vier Blütenstände geerntet, in ein Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zu dem mit einem Pistill gemörserten homogenen Gemisch wurden 250 µl Extraktionspuffer hinzugegeben. Nach weiterem Mörsern bis zum Auftauen wurden nochmals 250 µl Extraktionspuffer hinzugefügt. Anschließend phenoliserte man das Gemisch durch Zugabe von 400 µl PCI, kräftiges Schütteln und anschließende Zentrifugation (10 min 3500 rpm). Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt. Die Fällung erfolgte durch Zugabe von 0.8 Volumenanteilen Isopropanol. Nach zehn Minuten Inkubation bei RT wurde für 10 min zentrifugiert (3500 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol zweimal gewaschen. Das an der Luft getrocknete Pellet wurde in 50 µl TE/RNaseA gelöst (10 µg/ml). Für einen anschließenden Verdau der DNA für genomische Southern Blots wurden 32 µl der DNA in einem Gesamtvolumen von 40 µl eingesetzt.

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

GUS-Färbelösung

0.1 M	Na-Phosphat pH 7.0
10 mM	EDTA
0.5 mM	K-Ferricyanid
0.5 mM	K-Ferrocyanid
1.0 mM	X-Glucuronid
0.1 %	Triton X-100

GUS-Fixierlösung

50 % (v/v)	Ethanol
5 % (v/v)	Essigsäure
3.7 % (v/v)	Formaldehyd

Der histochemische Nachweis von β -Glucuronidase Aktivität in verschiedenen Geweben transgener *A. thaliana* Pflanzen erfolgte nach der von Stom (1992) beschriebenen Methode. Dazu wurden ganze Pflanzen oder einzelne Pflanzenteile in 15 ml Röhren oder 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt, die mit Färbelösung gefüllt waren. Die Proben wurden zur Infiltration des Gewebes mit Färbelösung in einen Exsikkator gegeben. Es wurde mehrmals Vakuum angelegt, bis das Gewebe möglichst vollständig infiltriert war. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C. Eine Blaufärbung des Gewebes trat je nach verwendetem Pflanzenmaterial entweder schon nach wenigen Minuten bis Stunden oder nach einer ü.N. Inkubation auf. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem man die Färbelösung entfernte und durch Fixierlösung ersetzte. Nach 30 min bei 65°C in der Fixierlösung erfolgt die vollständige Entfernung des Chlorophylls durch leichtes Schütteln in 80% Ethanol bei 65°C. Das Pflanzenmaterial konnte nun entweder für die Anfertigung von Gewebeschnitten in Paraffin eingebettet oder direkt mikroskopisch bzw. mit Hilfe eines Binokulars analysiert und anschließend fotografiert werden. Gefärbte Pflanzenteile wurden bis zu 6 Monaten in 80% Ethanol bei 4°C aufbewahrt.

2.18. Paraffineinbettung und Gewebeschnitte von *A. thaliana*-Material

2.18.1. Einbettung

Sollten Gewebeschnitte von gefärbtem Pflanzenmaterial angefertigt werden, wurden die Proben zunächst durch eine aufsteigende Ethanolreihe auf 100% Ethanol

gebracht (70 %, 85 %, 95 %, 2x 100 %, je 30 min). Anschließend wurde Ethanol in folgenden Schritten gegen Rotihistol® ausgetauscht:

25 % Rotihistol / 75 % Ethanol, 1 h
50 % Rotihistol / 50 % Ethanol, 1 h
75 % Rotihistol / 25 % Ethanol, 1 h
100 % Rotihistol, mindestens 1 h

Die Einbettung in Paraplast® (Roth) erfolgte durch Zugabe von Paraplast-Chips in ein 15 ml Röhrchen, das die Proben in 100% Rotihistol enthielt. Durch Inkubation bei 42°C schmolz das Wachs und wurde nach 1 h durch neues mit Paraplast gesättigtes Rotihistol ersetzt. Dieses wurde nach einer weiteren Stunde durch 100% Paraplast (geschmolzen, 60°C) ersetzt. Zur vollständigen Infiltration des Gewebes mit Wachs wurden die Proben über Nacht bei 60°C in einen Wärmeschrank gestellt. Am folgenden Tag wurde noch einmal das Wachs gewechselt. Das Gießen des Wachses mit den Gewebeproben in Wägeschalen (5.5x5.5 cm) fand bei RT statt. Um eine gleichmäßige Auskühlung zu fördern, wurden die Wägeschalen, nachdem sich eine stabile Wachshaut an der Oberfläche gebildet hatte, in eine Schale mit kaltem Wasser gestellt und, um den Auftrieb zu verhindern, mit einem Gewicht beschwert.

2.18.2. Anfertigung von Gewebeschnitten

Für Gewebeschnitte wurde ein Mikrotom (Mikrotom-Kryostat HM500 OM, MICROM Laborgeräte GmbH, Walldorf) verwendet. Die Paraffinblöcke waren etwa ca. 0.5 cm³ groß und die Flächen trapezförmig getrimmt. Die Schnitte wurden bei ca. 5-10°C durchgeführt, damit das Paraffin nicht zu weich wurde. Es wurden Schnitte einer Dicke von 8-15 µm angefertigt. Die Schnittbänder überführte man auf beschichtete Objektträger, auf die zuvor ein Wassertropfen aufgebracht wurde, so dass die Schnitte schwammen. Die Objektträger wurden für 2 h auf eine Heizplatte (42°C) gelegt, damit das Wasser verdampfte und die Schnitte glatt auf der Glasoberfläche auflagen. Die Entfernung des Paraffins erfolgte bei RT durch Inkubation in folgenden Lösungen:

Rotihistol	10 min
Rotihistol/Ethanol (50:50)	5 min
Ethanol (100%, 95%, 80%, 60%, 30%)	je 1 min
Wasser	1 min

Die Objektträger trockneten an der Luft und wurden dann mit einem Tropfen Entellan® (Merck) versetzt, auf den ein Deckglas gelegt wurde. Die Lagerung der Objektträger bis zur mikroskopischen Analyse erfolgte in Kunststoffboxen bei RT.

2.19. Präparation und Analyse von RNA

2.19.1. Präparation von RNA aus *Arabidopsis thaliana* (nach Eggermont et al., 1996)

DEPC-Wasser

0.2% (v/v) DEPC

Das DEPC-Wasser wird kräftig geschüttelt und anschließend sofort autoklaviert.

Extraktionspuffer

100 mM Na-Acetat

1 mM Na-EDTA

4% (w/v) SDS pH-Wert auf 5.0 einstellen

8 M LiCl

DEPC-behandelt (siehe DEPC-Wasser) autoklaviert

Das gefrorene (-80°C) Pflanzenmaterial (1.0-1.5 g) wurde in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser mit dem Pistill zu feinem Staub zerrieben. Nach Zugabe von etwa 2 ml Extraktionspuffer und dem gleichen Volumen PCI wurde weiter gemörsert, bis die Proben aufgetaut waren. Nach Überführung in Eppendorfgefäße und einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurde bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann phenolisiert und nach erneuter Zentrifugation (10 000 g, fünf Minuten) mit Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die RNA mit einem halben Volumen 8 M LiCl aus der wässrigen Phase gefällt. Nachdem die Proben eine Stunde auf Eis standen, wurde die RNA für zehn Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 70%igem Ethanol (DEPC) gewaschen, an der Luft getrocknet und in 100 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch, indem die Absorption bei 260 nm gemessen wurde. Für ein Test-RNA-Gel wurde das Volumen einer Probe eingesetzt, welches laut Berechnung (auf Basis der photometrisch ermittelten Werte) einer RNA-Menge von 30 µg entsprach.

2.19.2. RNA-Gele (nach Ausubel et al., 1987)

10x RB

200 mM Mops (pH 7.0/NaOH)

50 mM Na-Acetat

5 mM EDTA

Probenvorbereitung für RNA-Gele

12 μ l	Formaldehyd
40 μ l	Formamid
10 μ l	10x RB
40 μ l	RNA (+ DEPC-Wasser)

Nach Inkubation bei 65°C (zehn Minuten) wurden die Proben mit 1 μ l Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) versetzt und auf das Gel aufgetragen.

Formaldehyd-Agarosegel

3.2 g	Agarose
32 ml	10x RB
268 ml	dest. Wasser
20 ml	Formaldehyd

Die RNA wurde in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennt, um Sekundärstrukturen und RNA-RNA-Heteroduplexe zu vermeiden.

Nach Lösen der Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle ließ man die Lösung auf ca. 50°C abkühlen, gab 20 ml Formaldehydlösung (Endkonzentration 2% (v/v)) hinzu und goss sie in eine Flachbettkammer. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 150 V für 2-3 Stunden. Als Laufpuffer wurde 1x RB verwendet.

2.19.3. Northern Blot Analyse

Die RNA wurde aus dem Agarosegel auf Hybond-N Membranen (Amersham) transferiert. Der Aufbau des Blots entsprach dem Aufbau beim *Southern Blot*. Als Transferpuffer wurde 10x SSC (s. 2.12.) verwendet. Die Membran wurde vor dem Blotten zuerst mit dest. Wasser angefeuchtet, dann kurz in 10x SSC gelegt.

Nach dem Abbau des Blots wurde die Membran für fünf Minuten in 2x SSC gewaschen und dann für 2-3 Stunden bei 80°C gebacken.

2.19.4. Hybridisierung eines *Northern Blots*

2.19.4.1. Hybridisierung mit *Northern-Hybridisierungspuffer*

Northern-Hybridisierungspuffer

250 ml	Na-Phosphat pH 7.2	
50 ml	5 M NaCl	
70 g	SDS	
2 ml	0.5 M EDTA pH 8.0	
1 ml	Heringssperm-DNA (10 mg/ml), denaturiert	
50 g	PEG 6 000	
250 ml	Formamid	ad 1 l mit dest. Wasser

Die Membran mit der gebundenen DNA wurde zunächst kurz mit dest. Wasser abgespült und dann für zwei Minuten in 0.25 M NaCl/0.25 M Na-Phosphat gelegt. Die Vorhybridisierung (42°C, zwei Stunden) und die Hybridisierung (42°C, zwölf Stunden) fanden in einem möglichst kleinen Volumen Northern-Hybridisierungspuffer statt, dem ca. 200 µl denaturierte Heringssperm-DNA zugesetzt waren. Gewaschen wurde mit Southern-Waschlösung bei 65°C.

Alternativ wurde zur Hybridisierung Church-Buffer verwendet:

2.19.4.2. Church-Puffer (nach Church und Gilbert, 1984)

Hybridisierungspuffer

1 mM	EDTA	
0.5 M	Na-Phosphat	pH 7.2
7% (w/v)	SDS	

Bei der Hybridisierung mit Church-Puffer wurde als Membran, auf welche die Nukleinsäuren transferiert wurden, Pall Biodyne A nach Angabe des Herstellers verwendet. Die Vorhybridisierung erfolgte in Hybridisierungslösung bei 68°C. Die Hybridisierung fand ü.N. in einem Volumen von mind. 2 ml Hybridisierungspuffer/100cm² bei 58°C statt. Der Blot wurde anschließend nach folgendem Schema gewaschen:

6xSSC, 0.5% SDS, 5 min, RT
 4xSSC, 0.5% SDS, 5 min, RT
 2xSSC, 0.5% SDS, 5 min, RT

Sollte stringent gewaschen werden, wurde der Blot danach bis zu 15 min bei 65°C im Wasserbad in 2xSSC und 0.5% SDS inkubiert.

2.20. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*Polymerase chain reaction*) ist eine Primer-gesteuerte Methode der enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Das Prinzip der *in vitro* DNA-Vermehrung beruht auf einem sich 25-35fach wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Bindung der reziproken Oligonukleotide und Neusynthese der DNA-Stränge durch eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase). Die Verdopplung einer spezifischen DNA-Sequenz mit jedem Zyklus bedeutet einen exponentiellen Anstieg der Konzentration des von den Primern definierten DNA-Fragmentes.

Für eine Standard-PCR betrug das Reaktionsvolumen 50 µl. Es wurden 1-10 ng der zu amplifizierenden DNA und je 25 pmol der beiden spezifischen Oligonukleotide sowie 1 µl eines dNTP-Gemisches (je 100 mM), 5 µl 10x PCR-Puffer (Roche) und 2-5 U *Taq*-Polymerase eingesetzt.

Standard-Temperaturzyklen:

94°C	2 min	
<hr/>		
94°C	30 sec	
55°C	1 min	ca. 35 Zyklen
72°C	1 min	
<hr/>		
72°C	5 min	
4°C		

2.21. Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser, einem Mikroprozessor-gesteuerten Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektions-System, durchgeführt.

Die Sequenzierungsreaktion erfolgt nach einem modifizierten Protokoll der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Die verwendete AmpliTaq-Polymerase besitzt eine besonders hohe Akzeptanz gegenüber Didesoxynukleotiden. Die DNA wird am 3'-Ende durch Einbau der vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Didesoxynukleotide, den sog. Dye Terminatoren, markiert. Nach der Reaktion müssen die sequenzierten DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend aufgetrennt, detektiert und analysiert werden. Die Auftrennung durch Elektrophorese erfolgt in einer 75 µm dicken Kapillare. Ein 10 mW Argonlaser, dessen Hauptemissionen bei Wellenlängen von 488 und 514,5 nm liegen, ist das Kernstück der Detektionseinheit. Der Laserstrahl wird auf das Fenster der Kapillare gerichtet und in ihr fokussiert. Erreicht ein markiertes DNA-Fragment den Bereich, den der Laserstrahl trifft, so wird es zur Aussendung von Fluoreszenzstrahlung angeregt, die dann mit einer Linse fokussiert wird. Eine CCD-Kamera wandelt das Lichtsignal in ein digitales um, das als Rohdatenfile direkt auf den Computer übertragen und gespeichert wird. Zur Systemsteuerung und als Auswertungseinheit dient ein Power PC Macintosh Computer.

Probenvorbereitung für die Sequenzierung mit ABI Prism™ 310 Genetic Analyser:

Plasmid-DNA wurde für Sequenzierungen mit RNase behandelt, mit Phenol extrahiert und bei Raumtemperatur gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in Wasser (bidest) aufgenommen. Die DNA durfte keine Salze, Ethanol oder Phenolrückstände enthalten.

Sequenzierungsansatz:

A: Plasmid-DNA

4 µl	Prämix (ABI)
1 µg	ds-DNA
3-10 pmol	Primer

B: PCR-Produkte

2 µl	Prämix (ABI)
200 ng	PCR-Produkt
3-10 pmol	Primer

ad 10 µl

Sequenzierung-Temperaturzyklen:

96°C	20 sec	
<hr/>		
96°C	10 sec	
50°C	5 sec	25-35 Zyklen
60°C	4 min	

4°C

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden die Proben in 1.5 ml Eppendorfgläser überführt, die

100 µl dest. Wasser
10 µl 3 M Na-Ac. pH 5.0 und
250 µl Ethanol

enthielten. Die Fällung erfolgte bei Raumtemperatur. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 14000 min^{-1} (Eppendorf Centrifuge 5417) wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde in 20 µl TSR-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden bei 4°C gelagert oder direkt in die Gefäße für den ABI310 überführt. Vor der Analyse im ABI PRISM 310-Gerät wurde der Ansatz für zwei Minuten bei 95°C denaturiert.

2.22. RT-PCR

2.22.1. Reverse Transkription

Für die Synthese von Erststrang cDNA wurde das Superscript™ II RNase H Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) verwendet.

Es wurden 1-2 µg Gesamt-RNA mit 10 U RNase-freier DNase (Roche) inkubiert (15 min 37°C). Anschließend wurde das Enzym durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 2.27 mM) und Hitze (10 min 65°C) inaktiviert.

Reaktionsansatz: 5 µl Erststrang-Puffer
 1 µl DNase (10 U)
 1-2 µg RNA
 ad 25 µl mit H₂O bidest

Die Hälfte des DNase-Verdau wurde dann für die reverse Transkription eingesetzt:

12.5 μ l RNA, DNase behandelt
7.5 μ l Erststrang-Puffer
2 μ l Oligo dT(12-15) (500 μ g/ μ l)
10 μ l Nukleotide (je 2.5 mM)
5 μ l DTT (0.1 M)
1 μ l Reverse Transkriptase
ad 50 μ l mit H₂O bidest

Die Erststrangsynthese erfolgte bei 42°C für eine Stunde. Anschließend wurde das Enzym durch Hitze (15 min 70°C) inaktiviert.

Die RT-PCR wurde dann mit den entsprechenden Primerpaaren entweder in einem herkömmlichen PCR-Gerät (z.B. PE 9600) oder als „*real-time*“ PCR mit dem LightCycler (Roche) oder dem GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurden jeweils 2-6 μ l cDNA eingesetzt.

2.22.2. Semiquantitative RT-PCR

Hierfür wurde für die verschiedenen Primerkombinationen durch Verwendung unterschiedlicher Zykluswiederholungen (15-30) ausgetestet, zu welchem Zeitpunkt die Amplifikation des Zielgens im linearen Bereich lag. Gele mit aufgetragenen PCR-Produkten aus so ermittelten Reaktionsprofilen wurden dann geblottet und mit einer entsprechenden radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Als Referenz diente die gleiche Menge cDNA (aus der gleichen Präparation), wie sie für das zu testende Zielgen eingesetzt wurde, in einer Reaktion mit Aktin2- oder 18SrRNA-spezifischen Primern. Auch hier wurde zunächst der lineare Amplifikationsbereich getestet.

2.22.3. Real time PCR

Für die meisten *real time* RT-PCR Experimente wurde das „GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems) verwendet. Das System besteht aus einem optischen Detektor und einem PCR-Gerät (GeneAmp[®] PCR System 9600), koordiniert von Software, die auf einem angeschlossenen Computer (PC) installiert ist. Es wurde für die Detektion der Akkumulation von PCR-Produkten entwickelt, entweder über die Bindung von SYBR[®] Green I an doppelsträngige DNA oder über sog. TaqMan[®] Sonden. Die bis zu 96 Reaktionsgefäße werden mit weißem Licht bestrahlt, und das resultierende Fluoreszenzsignal wird durch eine CCD-Kamera detektiert, die eine Aufnahme von allen 96 Gefäßen macht. Die Software sammelt die Bilder während der PCR-Zyklen und analysiert die Daten, um eine

Amplifikationskurve für jede Reaktion zu erstellen. Außerdem nutzt das Gerät einen internen Referenzfarbstoff (ROX), um nicht PCR-korrelierte Schwankungen der Grundfluoreszenz in den einzelnen Gefäßen zu normalisieren.

Ein wichtiger Parameter für die Auswertung von *real-time* PCR Experimenten ist der sog. *threshold cycle*- oder C_t -Wert; er ist definiert als genau die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz einen festgelegten *threshold*-Wert überschreitet, welcher sich im Auswertungsprogramm manuell festlegen lässt und bei dem die Fluoreszenz anfängt, sich vom Hintergrund (begrenzt durch die parallel zur x-Achse verlaufende *threshold*-Linie) abzuheben. Wie Higuchi et al. (1992) gezeigt haben, erhält man eine gerade Linie, wenn man den Logarithmus der eingesetzten Kopienzahl einer Auswahl verschiedener Standard-Zielsequenzen gegen den C_t -Wert aufträgt. Also kann man die Anfangsmenge einer Zielsequenz aus einer unbekannt Probe ermitteln, indem man den C_t -Wert misst und eine Standardkurve verwendet, um die Kopienzahl beim Start der Reaktion zu ermitteln.

Mit Hilfe einer anderen Quantifizierungsmethode, die auf eine Standardkurve verzichtet, kann man eine Vielzahl von Proben gleichzeitig testen. Die sog. komparative C_t -Methode oder ΔC_t -Methode beruht auf dem Vergleich der Menge einer Referenzsequenz mit der Expression des Zielgens (siehe Anhang).

Die Primer für Experimente mit dem GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System wurden mit dem Programm Primer Express[®] (ABI) erstellt. Die Schmelztemperatur der Primer betrug stets 58-60 °C, die Amplikons hatten eine Größe von 100-150 bp, da die Effizienz der Reaktion für kleine Amplifikate größer ist, und damit auch die Wahrscheinlichkeit, das ein Assay direkt mit dem ersten getesteten Primerpaar funktioniert. Die Konzentration der Oligonukleotide betrug in der Regel 300 nM.

Die PCR-Reaktion begann stets mit einer Erhitzung auf 95 °C für 10 min. Durch diesen Schritt wird die AmpliTaqGold[®] Polymerase aktiviert. Es folgte eine Zweischritt-PCR mit einem Denaturierungsschritt für 15 sec bei 95 °C und einem kombinierten *Annealing*- und *Elongation*-schritt bei 60 °C für eine Minute. Diese Temperaturfolge wurde 40-mal wiederholt.

In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurden keine TaqMan[®] Sonden verwendet, sondern es wurde ausschließlich mit SYBR[®] Green I gearbeitet. Da letzteres jede Art von doppelsträngiger DNA markiert, also auch Primerdimere und andere unspezifische Produkte, wurde nach der PCR-Reaktion eine sog. „Schmelzkurve“ erstellt. Dabei fährt das PCR-Gerät einen kontinuierlichen Temperaturgradienten von 60 bis 95 °C ab. Dadurch werden die PCR-Produkte denaturiert und die Fluoreszenz nimmt ab. Durch Auftragen der ersten Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur erhält man Schmelzprofile, anhand derer man verschiedene PCR Produkte, also auch korrekte Amplifikate und z.B. Primerdimere im gleichen Reaktionsgefäß, zuverlässig unterscheiden kann.

2.23. Präparation von Schließzellen für nachfolgende RT-PCR

Um eine Anreicherung von Schließzellen für nachfolgende RNA-Präparationen und RT-PCR-Experimente zu erreichen, wurden jeweils 2-3 *Arabidopsis*-Rosettenblätter in einen Haushaltsmixer (Fa. Braun) in einem Liter Wasser für eine Minute zerkleinert. Die Suspension wurde dann durch ein Nylonnetz (Porengröße 200 μ l) filtriert. Die auf dem Netz zurückgehaltenen Zellreste wurden in frisches Wasser überführt und wieder gemixt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellreste vom Nylonnetz abgekratzt und in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die reverse Transkription erfolgt mit Hilfe von Dynabeads® (Dyna) nach Angaben des Herstellers. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem FastRNA Green Isolation Kit (Bio 101, Inc.) in Kombination mit dem Aufschlussgerät FastPrep FP120 (Bio 101 Savant), für 3 x 90 sec. Danach wurde zunächst das Protokoll für die direkte Isolierung von mRNA aus Pflanzengewebe angewendet (mRNA DIRECT™ Kit). Nach Elution der mRNA in 50 μ l wurde diese nochmals gereinigt (Dynabeads mRNA Purification Kit) und anschließend eluiert (50 μ l). Die mRNA war danach DNA-frei und konnte für RT-PCR-Experimente eingesetzt werden

2.24. Proteintechniken

2.24.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)

Acrylamid/Bisacrylamidstammlösung

30% (w/v)	Acrylamid
0.8 % (w/v)	Bisacrylamid

Sammelpuffer (4x konzentriert)

500 mM	Tris/HCl (pH 6.8)
0.4% (w/v)	SDS

Trennpuffer (4x konzentriert)

1.5 M	Tris/HCl (pH 8.8)
0.4% (w/v)	SDS

Elektrodenpuffer (10x konzentriert)

250 mM	Tris
192 mM	Glycin
0.5 % (w/v)	SDS

Probenpuffer (2 x)

125 mM	Tris/HCL pH 6.8
20 % (w/v)	Glycerin
5 % (w/v)	SDS
5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,0025% (w/v)	Bromphenolblau

Denaturierte, in Probenpuffer aufgenommene Proteingemische wurden in Anlehnung an die Methode von Laemmli (1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde das Minigel Apparatur System 2050 Midget (Pharmacia-LKB, Freiburg) verwendet. Die Größe der Gele betrug 101x82x0.75 mm. Die Proben wurden zunächst in einem Sammelgel fokussiert, das 4.5% (w/v) Acrylamid, 0.12 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 0.03 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat, 0.13 % (v/v) N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und einfach konzentrierten Sammelgelpuffer enthielt. Für die nachfolgende Auftrennung wurde ein aus 12.5 % (w/v) Acrylamid, 0.33 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 0.05 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat und 0.05 % (v/v) TEMED bestehendes Gemisch und einfach konzentriertem Trenngelpuffer verwendet.

Nach dem Auftragen der Proben wanderten diese zunächst mit 15 mA in das Sammelgel ein und wurden dann bei 40 mA fokussiert. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei ca. 25 mA und einer konstanten Spannung von 200 Volt.

Für präparative Zwecke wurden Gele mit einer Größe von 160x150x1.5 mm genutzt. Hier wurden zum Einlauf in das Sammelgel 25 mA angelegt, die Fokussierung erfolgte bei 70 mA und die Auftrennung im Trenngel bei 50 mA mit einer Spannung von 200-300 Volt. Während des Laufes wurden die Gele mit einem Ventilator gekühlt.

Als Molekulargewichtsmarker wurde der Dalton Mark VII-L (Sigma) eingesetzt, der einen Bereich von 66 kDa bis 14.2 kDa umfasst.

2.24.2. Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliantblau

Färbelösung I

0.5 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau
(Serva-Blue G250, Serva)

Färbelösung II

20 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung

10 % (v/v) Essigsäure
40 % (v/v) Methanol

Die Proteinfärbung erfolgte nach Weber und Osborn (1969). Dazu wurden die Färbelösungen I und II zu gleichen Teilen vermischt. Das Gel wurde für ca. 30 min unter leichtem Schütteln gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel in Entfärbelösung geschüttelt.

2.24.3. Proteinfärbung mit Silbernitrat

Fixierlösung

50 % (v/v) Methanol
12 % (v/v) Essigsäure
0.019 % (v/v) Formaldehyd

Entwicklerlösung

0.57 M Dinatriumkarbonat
0.019 % (v/v) Formaldehyd
17.3 μ M Natriumthiosulfat

Imprägnierlösung

0.2 % (w/v) Silbernitrat
0.075 % (v/v) Formaldehyd

Stopplösung

50% (v/v) Methanol
12 % (v/v) Essigsäure

Die Silbernitratfärbung nach Blum et al. (1987) ist ca. 5- bis 10-mal empfindlicher im Vergleich zur Färbung mit Coomassie-Brilliantblau.

Die Gele wurden zunächst für 30 min in der Fixierlösung geschüttelt und dann dreimal je 20 min mit 50 % (v/v) Ethanol und 1 min mit 800 μ M Natriumthiosulfat gewaschen. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 20 Sekunden in H₂O wurden die Gele für 20 min in der Imprägnierlösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele zweimal kurz mit H₂O gewaschen und dann entwickelt (Entwicklerlösung). Nach deutlichem Hervortreten der Proteinbanden wurde zweimal kurz mit H₂O gespült und der Entwicklungsvorgang durch Schütteln in der Stopplösung beendet (20 min).

2.24.4. Anfärben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Kupferchlorid

Färbelösung

300 mM Kupfer-II-chlorid

Entfärbelösung

125 mM Tris

125 mM EDTA

Die Färbemethode nach Lee et al. (1987) ist im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Methoden reversibel und nicht fixierend. Sie wurde eingesetzt zum Nachweis von Proteinen in präparativen Gelen, aus denen ein Protein ausgeschnitten und später zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt wurde.

Das Gel wurde ca. 5-15 min in der Färbelösung inkubiert, bis eine bläuliche Trübung der Gelmatrix eintrat. Vorhandene Proteinbanden blieben dabei transparent bläulich. Vor einem schwarzen Hintergrund wurden die entsprechenden Proteinbanden dann ausgeschnitten. Diese Gelstücke wurden anschließend in der Entfärbelösung entfärbt, ca. 3-5-mal in H₂O gewaschen, zerkleinert und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Die Protein-Gelmasse wurde in PBS resuspendiert und zur Immunisierung verwendet.

2.24.5. Aufarbeitung von *E. coli* Gesamtprotein

1-2 ml ü.N. Bakterienkultur wurden bei 14000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5417) sedimentiert. Das Sediment wurde in 400 μ l TE resuspendiert und mit 400 μ l neutralisiertem Phenol 5 min geschüttelt. Nach 5 min Zentrifugation (12000 rpm) wurde die wässrige Oberphase verworfen und die Unterphase mit 1 ml Ethanol versetzt und für 20 min auf Eis gestellt. Das Protein wurde bei 14 000 rpm präzipitiert und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Die so gewonnenen

Proteinsedimente wurden durch kräftiges Schütteln und Zerreiben mit Einmal-Plastikrührspateln in ca. 100 μ l Proteinauftragepuffer gelöst. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden ca. 10-20 μ l der Proben auf geladen.

2.24.6. Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Westernblot)

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen (Fa. BioRad) wurde mit einer Transfer-Kammer (Carboglass, Schleicher & Schuell) im *semi-dry-blot*-Verfahren nach Khyse-Andersen (1984) durchgeführt. Als Filterpapier diente das „Gel-Blotting“-Papier GB002 der Firma Schleicher & Schuell), für den elektrophoretischen Transfer wurden Puffer der Firma Roth nach Vorschrift des Herstellers verwendet (Roti[®]-Blot, Puffer 2K und 2A). Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: auf die Anodenseite wurden zunächst vier Lagen in Anodenpuffer getränktes Filterpapier gelegt, darauf die durch 1 min Inkubation in Methanol aktivierte Transfermembran, auf welche dann das Acrylamidgel gelegt wurde. Das Gel wurde noch von vier Lagen in Kathodenpuffer getränktem Filterpapier bedeckt, bevor der Stromkreis durch Auflegen der Kathodenfläche geschlossen wurde. Um den Aufbau zu beschweren, legte man ein Gewicht von ca. 2kg auf. Der Elektrotransfer erfolgte bei 1 mA/cm² für 60-90 min.

2.24.7. Reinigung exprimierter Fusionsproteine durch Amylose-Affinitätschromatographie

2.24.7.1. Amylose-Affinitätschromatographie

Säulenpuffer

20 mM	Tris/HCl pH 7.4
100 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	DTT

Für die Gewinnung von MBP (Maltose-Bindeprotein)-Fusionsprotein zur späteren Immunisierung von Kaninchen wurden 5 ml einer ü. N. Kultur in 500 ml LB, das zusätzlich 0.2% Glukose enthielt, verdünnt. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0.5 (nach ca. zwei Stunden) erfolgte die Induktion mit 0.3 mM IPTG, nach weiteren drei Stunden wurden die Zellen geerntet. Das nach Zentrifugation (4000 \times g, 20 min) erhaltene Zellpellet wurde in 20 ml Säulenpuffer resuspendiert und über Nacht bei -20°C

eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wurden die Zellen durch Sonifizieren aufgeschlossen (Branson Sonifier 250, *duty cycle* 20%, *output control* 5, ca. 20 min, auf Eis). Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 9000 x g bei 4°C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und auf Eis gestellt. Für die folgende Affinitätschromatographie wurde der Extrakt 1:5 mit Säulenpuffer verdünnt. 15 ml des Amylose-Säulenmaterials (Bindungskapazität: 3 mg/ml Bettvolumen) wurden nun in eine mit Watte abgedichtete Kunststoffsäule (Durchmesser 1.7 cm) gegeben. Die Säule wurde zunächst mit 8 Volumen Säulenpuffer gewaschen, anschließend wurde der verdünnte Extrakt nach und nach auf die Säule gegeben. (Die Durchflussgeschwindigkeit betrug ca. 100 ml/h.) Danach wurde mit 12 Säulenvolumen Säulenpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit Säulenpuffer, dem 10 mM Maltose zugesetzt war. Es wurden ca. 15 3 ml-Fractionen gesammelt. Später wurden proteinhaltige Fraktionen vereinigt und mit einem Centricon-Röhrchen (Amicon) konzentriert.

2.24.7.2. Regeneration des Säulenmaterials

Die Regeneration der Amylosesäulen fand nach folgendem Schema statt:

3 Säulenvolumen Wasser (bidest)

3 Säulenvolumen 0.1% SDS

1 Säulenvolumen Wasser (bidest)

3 Säulenvolumen Säulenpuffer

Das Säulenmaterial konnte bis zu viermal wieder verwendet werden, wobei Restmengen von Amylase im *E. coli* Extrakt die Bindungskapazität der Säule bei wiederholtem Gebrauch verminderten. Die Lagerung des Säulenmaterials erfolgte bei 4°C.

2.25. Transportexperimente

2.25.1. Expression rekombinanter Phosphatranslokator-Proteine in Hefe

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) - Platten

1%	Hefeextrakt
2%	Peptone
2%	Dextrose (D-Glukose)
2%	Agar

SC-Minimalmedium

0.67%	<i>yeast nitrogen base</i> (ohne Aminosäuren, mit Ammoniumsulfat)
2%	Glukose oder Raffinose
0.01%	Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan, Uracil
0.005%	Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin Tyrosin, Valin
2%	Agar (für Platten)

Selektionsmedium

SC ohne Uracil

Induktionsmedium

SC ohne Uracil, mit 2% Galaktose

10xTE

100 mM	Tris/HCl	pH 7.5
10 mM	EDTA	

1xLiAc/0.5xTE

100 mM	Lithium Acetat	pH 7.5
5 mM	Tris/HCl	pH 7.5
0.5 mM	EDTA	

1xLiAc/40%PEG-3350

100 mM	Lithium Acetat	pH 7.5
40 %	PEG-3350	
10 mM	Tris/HCl	pH 7.5
1 mM	EDTA	

Der verwendete Hefestamm INVSc1 ist auxotroph für Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil, d.h. diese Aminosäuren müssen dem Minimalmedium hinzugefügt werden, damit der Stamm wachsen kann. URA3 dient als Selektionsmarker für mit pYES2/NT transformierte Hefezellen.

Die Induktion des *GAL1* Promotors erfolgte mit Galaktose (2%).

2.25.2. Hefetransformation

10 ml YPD-Medium wurden mit einer Einzelkolonie INVSc1 angeimpft und ü. N. bei 30°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Kultur zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.4 in 50 ml YPD-Medium verdünnt und wuchs weitere 2-4 h. Die Zellen wurden dann für 15 min bei 1500 x g abzentrifugiert, in 40 ml 1xTE aufgenommen, wieder 15 min bei 1500 x g zentrifugiert und in 2 ml 1xLiAc/0.5xTE aufgenommen. Es folgte eine Inkubation bei RT für 10 min. Für jede Transformation wurde nun 1 µg Plasmid-DNA mit 100 µg denaturierter und gescherter Heringssperm-DNA und mit 100 µl der Hefezellen-Suspension gemischt. Dazu gab man 700 µl 1xLiAc/40%PEG-3350/1xTE. Nach gutem Durchmischen wurde der Ansatz für 30 min auf 30°C erwärmt. Nach Zugabe von 88 µl DMSO fand für 7 min ein Hitzeschock bei 42°C statt. Danach wurde nach kurzer Zentrifugation der Überstand verworfen, das Sediment in 1 ml TE aufgenommen, erneut zentrifugiert und schließlich in 50-100 µl 1xTE resuspendiert, die auf einer Selektionsmedium-Platte ausplattiert wurden.

2.25.3. Expression des rekombinanten Proteins

15 ml SC-U-Medium mit 2% Glukose wurden mit einer INVSc1-Kolonie, die das pYES2/NT-Konstrukt enthielt, angeimpft und ü.N. unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Kultur wurde dann so in 50 ml Induktionsmedium verdünnt, dass die OD₆₀₀ 0.4 betrug. Dafür wurde das ermittelte Volumen an benötigter ü.N.-Kultur bei 1500 x g, 4°C für 5 min pelletiert und anschließend im Induktionsmedium resuspendiert. Nach weiteren 6-8 h im Schüttler (30°C) wurden die Zellen bei 1500 x g abzentrifugiert (5 min, 4°C) und in 500 µl sterilem Wasser aufgenommen. Die Zellen wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 sec bei 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.25.4. Mechanischer Aufschluss der Hefezellen

TE-Puffer

10 mM	Tris/HCL pH 7.5
1 mM	EDTA

PMSF-Stammlösung

100 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (in Ethanol)
--------	--

Glasperlen (Durchmesser ca. 0.5 mm)

Die Zellen wurden nach Zusatz von PMSF mit Hilfe von Glasperlen unter starkem Schütteln aufgeschlossen (Ausubel et al., 1989). Die hierbei auftretenden Scherkräfte beschädigten die Zellwände und setzten so die Zellorganellen und die Proteine frei. Zellen einer 50 ml Kultur wurden in 210 μ l TE-Puffer resuspendiert und in ein mit 400 mg Glasperlen gefülltes 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dem TE-Puffer wurde 1/100 Volumen 100 mM PMSF zugefügt, um die während eines Zellaufschlusses aus der Vakuole freigesetzten Endo- und Exoproteasen am Proteinabbau zu hindern. Anschließend wurde für 6 min in einem Zellhomogenisator (Fa. Braun, Melsungen) bei 4°C kräftig geschüttelt. Zu dem Gemisch aus Glasperlen und Zellsuspension wurden nach 10 sec Zentrifugation (2000g) 700 μ l TE/PMSF gegeben. Nach kurzem Schütteln wurde erneut zentrifugiert (200g, 45sec) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Durch kurze Zentrifugation (1min, 2200g) wurden Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen sedimentiert. Der leicht trübe Überstand wurde abgenommen. In einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 40000rpm für 15min (Kontron-Ultrazentrifuge, Centrikon T-1065, Rotor 65.13, 4°C, ca. 100000g) wurden lösliche und membrangebundene Fraktion getrennt. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierte Membranfraktion bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.25.5. Reinigung von His-gekoppelten Proteinen über Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Puffer I (Solubilisierungspuffer)

100 mM	NaH ₂ PO ₄ pH 8.0
50 mM	NaCl
8 mM	Imidazol

Puffer II (Waschpuffer)

10 mM	Tricin/KOH pH 7.6
8 mM	Imidazol
0.08% (w/v)	n-Dodecyl- β -maltopyranosid

Puffer III (Elutionspuffer)

150 mM	Imidazol
0.08% (w/v)	n-Dodecyl- β -maltopyranosid

Die Reinigung der rekombinanten Transportproteine erfolgte bei 4°C. In einem Standardansatz wurden ca. 4 mg Hefe-Membranprotein aus einer 100 ml Kultur in 280 μ l Puffer I aufgenommen. Die Solubilisierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 55 μ l 20 % (w/v) n-Dodecyl- β -maltopyranosid. Nach 5 min wurden nochmals 370 μ l Puffer I zugegeben. Der verdünnte Solubilisierungsansatz wurde für 2 min bei 10000 rpm (Stratagene, Pro Fuge, 5600 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit zuvor äquilibriertem Ni²⁺-NTA-Agarosematerial (Volumen Säulenmaterial ca. 80 μ l) für eine Stunde unter gleichmäßigem, langsamem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Ni²⁺-NTA-Agarose/Proteingemisch in eine mit etwas Watte gefüllte Pasteurpipette überführt, der Durchlauf in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und die Säule mit mindestens 1 ml Puffer II gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte in einem Schritt in ca. 180 μ l Puffer III. Das so erhaltene gereinigte Protein wurde für eine Kinetik oder die Bestimmung der Affinität des Transporters zu einem bestimmten Substrat eingesetzt. Sollten mehrere Kinetiken/Substrate gemessen werden, wurde entsprechend mehr Ausgangsmaterial (Hefemembranprotein) eingesetzt, alle folgenden Schritte wurden mit proportional vergrößerten Mengen durchgeführt (z. B. doppelter Ansatz von Puffer und Ni²⁺-NTA-Agarosematerial bei Verwendung von zwei 100 ml Hefemembranpellets).

2.25.6. Reinigung des Phospholipids

L- α -Phosphatidylcholin wurde zur Entfernung freier Fettsäuren nach der Methode von Krämer (1977) gereinigt. Dazu wurden 30 g L- α -Phosphatidylcholin (Sigma) in 90 ml Chloroform gelöst, mit 540 ml entwässertem Aceton versetzt und für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte die Fällung des Phosphatidylcholins bei 4°C über Nacht. Das Lösungsmittel wurde dekantiert und das feste Lipid in 100 ml Diethylether gelöst. Der Ether wurde am Rotationsverdampfer abgedampft. Nach Trocknung im Exsikkator wurde das gereinigte Phosphatidylcholin bei -20 °C aufbewahrt.

2.25.7. Rekonstitution der Membranproteine

Der Einbau der Membranproteine in künstliche Membranvesikel erfolgte nach der Frier-Tau Methode von Kasahara und Hinkle (1977).

Liposomenpuffer I

100 mM	Tricin/KOH pH 7.6
30 mM	Kaliumglukonat
20 mM	Substrat

Liposomenpuffer II

100 mM	Tricin/KOH pH 7.6
68 mM	Kaliumglukonat

PD10-Säulenpuffer

100 mM	Natriumglukonat
50 mM	Kaliumglukonat
10 mM	Tricin/KOH pH 7.5

Für die Präparation der künstlichen Membranvesikel wurden Liposomenpuffer I (mit unterschiedlichen Substraten) und Liposomenpuffer II (für den Kontrollwert) mit 14 % (w/v) gereinigtem Phospholipid versetzt und zur Vesikelbildung für 3 min auf Eis beschallt (Branson Sonifier 250, *duty cycle* 20%, *output control* 5). Im Anschluss wurden ca. 150 μl eines Protein/Detergenz Gemisches mit 600 μl Liposomenlösung versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die schockgefrorenen Proteoliposomen wurden für einige Tage bei -80°C gelagert oder sofort auf Eis aufgetaut und für 30 Pulse beschallt (Branson Sonifier 250, *duty cycle* 30%, *output control* 5). Danach wurde das nicht in die Proteoliposomen eingebaute externe Substrat durch eine Größenausschluss-Chromatographie auf einer mit PD10-Puffer äquilibrierten Sephadex G-25-M Säule abgetrennt. Die Liposomen wurden mit PD10-Säulenpuffer in einem Volumen von 950 μl eluiert. Die Liposomen wurden nun direkt für die Transportversuche eingesetzt.

2.25.8. Messung der Transportaktivität

Substratlösung

55 nCi/ μ l	[³² P]-Phosphat
10.5 mM	KH ₂ PO ₄

Inhibitormix

100 mg/ml	Pyridoxal-5'-phosphat (PLP)	
10 mg/ml	4,4'-Diidothiocyano-stilben-2,2'-disulfonat (DIDS)	
35.4 mg/ml	Mersalyl	in 1.5 M Imidazol

Dowex-Puffer

0.15 M	Natriumacetat
--------	---------------

2.25.8.1. Abhängigkeit der Substrataufnahme in die Proteoliposomen von der Reaktionszeit (Kinetik):

Hierzu wurden 850 μ l einer Proteoliposomen-Suspension zum Zeitpunkt t=0 sec mit 45 μ l Substratlösung versetzt. Nach definierten Zeiten (15, 35, 55 und 75 sec) wurden je 200 μ l der Liposomen aus dem Reaktionsansatz entnommen und zum Abstoppen des Transportes auf eine mit Dowex-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule (Biorad, Dowex AG 1x8, Acetatform, 200-400 mesh, 0.5 x 4 cm Säulengröße) gegeben. Anschließend wurden die Liposomen sofort in zwei Schritten (erst 0.5 ml, dann 1.0 ml Dowex-Puffer) in ein Szintillationsgefäß eluiert, wobei das nicht eintransportierte Substrat auf der Säule abgetrennt wurde. Die in die Liposomen transportierte Aktivität wurde im Szintillationszähler bestimmt.

2.25.8.2. Abstoppen des Transportes durch ein Inhibitorengemisch

Wenn der zeitliche Verlauf der Substrataufnahme nicht entscheidend für die Versuchsauswertung war und z.B. nur die Substratspezifität bestimmt werden sollte, konnte der Transport zu einem bestimmten Zeitpunkt durch Zugabe eines Inhibitorengemisches abgestoppt werden.

Dazu wurden 200 μ l einer Proteoliposomen-Suspension in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß bei RT vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l der radioaktiven Substratlösung gestartet und nach 1 min durch 25 μ l Inhibitorlösung gestoppt. In Kontrollansätzen, die der Bestimmung von unspezifisch in die Proteoliposomen aufgenommenen Radioaktivität dienen, wurde den Liposomen vor dem Starten der Reaktion (vor Zugabe der Substratlösung) das Inhibitorengemisch

zugegeben. Nach dem Reaktionsstopp wurden auch hier 200 μ l der Liposomenlösung auf eine Dowexsäule gegeben, das weitere Vorgehen entspricht dem Versuchsablauf bei Messung einer Kinetik. Der Vorteil dieser Methode liegt v. a. darin, dass man durch Verwendung einer speziellen Apparatur („Plimper“), die aus einer mit Handgriff ausgestatteten Verbindung von 2x12 „Löffeln“ (für die Substratlösung bzw. den Inhibitor) besteht, bis zu 24 Werte gleichzeitig erhalten kann.

2.25.9. Messung der Transportaktivität in pflanzlichen Geweben

Aufschlusspuffer

0.2 M	Tricin/KOH pH 8.0
10 mM	EDTA
4 mM	DTT
6 mM	Ascorbat
0.1 % (w/v)	BSA (entfettet)
0.1 % (w/v)	PVP (unlöslich, Polyclar AT)
0.08 %	n-Dodecyl- β -maltopyranosid

Liposomenpuffer (2x)

200 mM	Tricin/KOH pH7.8
40-60 mM	Substrat
50 mM	K-Glukonat

Die Liposomen wurden doppelt konzentriert angesetzt, da die Zugabe des Pflanzenextraktes zu einer starken Verdünnung führt (s.u.). Für einen Standardansatz wurden 150 mg Lipid eingewogen, mit 600 μ l zweifach konzentriertem Liposomenpuffer versetzt und beschallt (Branson Sonifier 250, *duty cycle* 20%, *output control* 5). Bis der Pflanzenextrakt zugefügt wurde, standen die Liposomen auf Eis.

200 mg Blatt- oder Blütenmaterial wurden nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde in einem vorgekühlten Mörser fein zerrieben. Es wurden ca. 2.5 ml Aufschlusspuffer hinzugegeben. Bis zum Auftauen wurde weiter gemörsert. Die Suspension wurde in ein vorgekühltes 2 ml Reaktionsgefäß überführt und sofort bei 2500 rpm (4°C, Eppendorf Zentrifuge 5417) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. 600 μ l dieser Suspension wurden mit 500 μ l Liposomenlösung (s.u.) vermischt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Versuchsdurchführung entsprach dem Vorgehen bei Messung der Transporteigenschaften von rekombinanten Proteinen in Abhängigkeit von der Zeit (siehe 2.26.8.1.). Aus 200 mg Material konnten drei Kinetiken gemessen werden.

2.26. Stärkefärbung

Jod-Kaliumjodidlösung

5,7 mM	doppelt sublimiertes Jod
43,4 mM	Kaliumjodid

Kaliumjodid wurde in demineralisiertem Wasser gelöst, bevor das Jod zugegeben wurde.

Zum Ende der Lichtperiode wurden ein bis zwei Blätter einer entsprechenden Pflanze mit einem Skalpell abgetrennt und in 80% Ethanol bei 60°C gebleicht. Der ethanolische Überstand wurde dann entfernt, und die gebleichten Blätter wurden in Jod-Kaliumjodidlösung (modifiziert nach Caspar et al., 1985) gefärbt.

2.27. Bestimmung von Stärke/löslichen Zuckern

Für die quantitative Hydrolyse wurden zunächst Blattscheiben (Durchmesser 0,5 cm) in 1 ml Ethanol zweifach für 15-30 min auf 60-80°C erhitzt, bis alle Pigmente solubilisiert waren. Für eine quantitative Hydrolyse der Stärke wurde das gebleichte Material in 0,25 ml 0,2 M KOH homogenisiert und nach Zugabe von weiteren 0,25 ml 0,2 M KOH bei 95°C für 45 min inkubiert. Nach Abkühlung wurde der pH-Wert des Extraktes durch Zugabe von 1 N Essigsäure auf 5,5 eingestellt (ca. 90-100 µl). Die Stärke wurde ü.N. bei RT zu Glukose abgebaut, indem sie mit 3,5 U α -Amylase (Fa. Roche, 17 µl) und 2,5 U Amyloglukosidase (in 0,1 M Na-Ac. Puffer pH 4,6, Fa. Roche, 83 µl) inkubiert wurde. Der Ansatz wurde zur Denaturierung der Enzyme 10 min auf 90°C erhitzt und anschließend 4 min bei 14.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417). Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur enzymatischen Messung des Glukosegehaltes bei -20°C gelagert.

Der Gehalt an Glukose wurde nach Bergmeyer (1970) bestimmt. Die enzymatische Messung löslicher Zucker erfolgte nach der Endpunktmethode mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät SpectraFluor Plas (TECAN GmbH, Salzburg, Österreich) im Fluoreszenz-Modus (Messung der NADPH-Bildung). Unter Berücksichtigung des Chlorophyllgehaltes konnten die Gehalte pro mg Chlorophyll oder pro m² Blattfläche bestimmt werden.

Reaktionsansatz zur Bestimmung von Glukose:

100 mM	HEPES pH 7.5 (NaOH)
0.8 mM	NADP ⁺
2 mM	ATP
10 mM	MgCl ₂
10-20 µl	Extrakt

Das Volumen der Reaktionen betrug standardmäßig ca. 200 µl. Nach Zugabe von 2 µl Glukose 6-P-Dehydrogenase wurde die Grundextinktion bei 340 nm gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.5 µl Hexokinase gestartet.

2.28. Mikroskopie und Dokumentation**Folgende Geräte wurden verwendet:**

Binokulare: Nikon SMZ-U
Leica MZFLIII
GFP Erregerfilter: 470/40 nm, Sperrfilter: 525/50 nm

Mikroskope: Nikon Eclipse E800

Filter: **GFP (R) – BP** EX 460-500
DM 505
BA 510-560

UV – 2A EX 330-300
DM 400
BA 420

Konfokales Laser Scanning Mikroskop: Leica DMIRBE, TCS 4D, Leica

Kameras für mikroskopische Aufnahmen:

Nikon FDX-35, verwendet mit Tageslichtfilm Agfa RSXII, Iso100/21°

Digitale Kamera: Nikon Coolpix 995

2.29. Internetadressen

Eine Auswahl der wichtigsten in dieser Arbeit genutzten Internetadressen:

Arabidopsis Membrane Protein Library

<http://www.cbs.umn.edu/arabidopsis/>

ChloroP 1.1 Prediction Server

<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>

ExPASy Molecular Biology Server

<http://www.expasy.ch/>

HMMTOP

<http://www.enzim.hu/hmmtop>

NCBI HomePage

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NetPhos 2.0 Prediction Server

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>

Plot Hydrophobicity

http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/plot_hydroph.html

Predotar

<http://www.inra.fr/predotar/>

TAIR

<http://www.arabidopsis.org>

Transport Protein Overview

<http://www.biology.ucsd.edu/~msaier/transport/>

3. Ergebnisse

Der Triosephosphat/Phosphattranslokator (TPT) aus Spinat war eines der ersten klonierten pflanzlichen Membranproteingene überhaupt (Flügge et al., 1989). In den folgenden Jahren wurden TPTs aus mehreren anderen Pflanzen isoliert (Fischer et al., 1994a). Später stellte sich heraus, dass es weitere sehr homologe plastidäre Transportproteine gab, die aber andere Substratspezifitäten besaßen. Die Genfamilie der plastidären Phosphattranslokatoren lässt sich nun in vier Untergruppen einteilen: die TPT-Klasse, die GPT- und PPT-Klasse (Kammerer et al., 1998; Fischer et al., 1997) sowie die kürzlich entdeckte XPT-Klasse (Eicks et al., 2002).

Bisher wurde in keiner Pflanze das Zusammenspiel der Proteine der verschiedenen Klassen, die teilweise überlappende Substratspezifitäten besitzen, untersucht. Ebenso blieb die Frage offen, wie viele Gene in jeder der Klassen vorhanden sind. Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, deren Genom zu Beginn der Arbeit in absehbarer Zeit sequenziert sein sollte, bot eine gute Ausgangsbasis für eine solche vergleichende Studie.

3.1. Die NST (*Nucleotide Sugar Transporter*) - TPT (Triosephosphat/Phosphattranslokator) Genfamilie in *A. thaliana*

3.1.1. Plastidäre Phosphattranslokatoren in *A. thaliana*

3.1.1.1. Die vier plastidären Phosphattranslokator-Klassen

Mit den bereits bekannten PT-Sequenzen wurden Datenbanksuchen durchgeführt, um einen Überblick über die vorhandenen PT und PT-homologen Sequenzen zu erhalten. Alle vier bekannten Klassen von PT-Proteinen konnten in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Die Identitäten der Aminosäurereste zwischen den einzelnen Klassen betragen zwischen 31% und 44%. Neben einem einzelnen TPT sowie einem XPT gibt es jeweils zwei Mitglieder der GPT- und der PPT-Klasse, die eine Aminosäure-Identität von 74% bzw. 52% aufweisen (Tab. 3.1).

	AtTPT	AtGPT1	AtGPT2	AtPPT1	AtPPT2	AtXPT
AtTPT		36	35	32	31	37
AtGPT1			74	35	35	42
AtGPT2				34	33	44
AtPPT1					52	36
AtPPT2						37
AtXPT						

Tab. 3.1: Vergleich der Aminosäure-Identitäten der plastidären Phosphattranslokatoren aus *Arabidopsis thaliana*. Angaben in % Identität. Die Werte gelten für die Vorläuferproteine mit Transitpeptid. Die reifen Proteine weisen eine um ca. 8 % höhere Identität auf. Grau unterlegt sind die Aminosäure-Identitäten zwischen Mitgliedern der gleichen Phosphattranslokator-Klasse.

3.1.1.2. Die genomische Struktur der Phosphattranslokator-Gene

Für zwei der plastidären Phosphattranslokatoren wurde eine Durchmusterung einer genomischen Phagenbibliothek durchgeführt (*AtTPT*, Deterding, 1998, und *AtPPT1*, AF209210.1). Die erhaltenen Klone wurden sequenziert und mit den bekannten cDNA Sequenzen verglichen, um die Exon-Intronstruktur zu ermitteln. Für die übrigen Gene wurden die zur entsprechenden cDNA gehörigen Klone durch Datenbankrecherchen im Verlauf der vollständigen Sequenzierung des *A. thaliana* Genoms ermittelt (AGI, 2000). Wie in Abb. 3.1 dargestellt, besitzt das *TPT*-Gen elf, die beiden *PPT*-Gene acht und die beiden *GPT*-Gene vier Introns, das *XPT*-Gen hat kein Intron. Auffällig ist, dass innerhalb einer Klasse Anzahl und Positionen der Introns konserviert sind, auch wenn die Größe der Introns variieren kann. Zwischen den Klassen sind nur zwei Positionen exakt konserviert: *TPT*-Intron 7 und die *PPT*-Introns 5, sowie *TPT*-Intron 9 und die *PPT*-Introns 7. Um 61bp verschoben ist Intron 2 der *GPTs* gegenüber Intron 4 der *PPTs*. Eine weitere Gemeinsamkeit bezüglich der Intronlage zwischen *TPT* und *GPTs* besteht darin, dass auf dem letzten Exon nur noch wenige für Aminosäuren kodierende Basen liegen (beim *TPT* fünf, bei den beiden *GPTs* drei Aminosäuren).

Es wurde gezeigt, dass die Position eines inserierten Introns innerhalb eines Kodons eine Rolle für mögliche *exon shuffling* Prozesse während der Evolution spielt. Eine besondere Bedeutung haben in diesem Zusammenhang sog. Phase-0-Introns, welche häufig an „Modulgrenzen“ von Proteinen liegen (Souza et al., 1998). In Tab. 3.2 sind die Phasen (Position des Introns innerhalb eines Kodons: 0 -zwischen zwei Kodons-, 1 oder 2) der PT Introns aufgeführt. Innerhalb einer PT-Klasse entsprechen sich nicht nur die Positionen, sondern auch die Phasen der entsprechenden Introns.

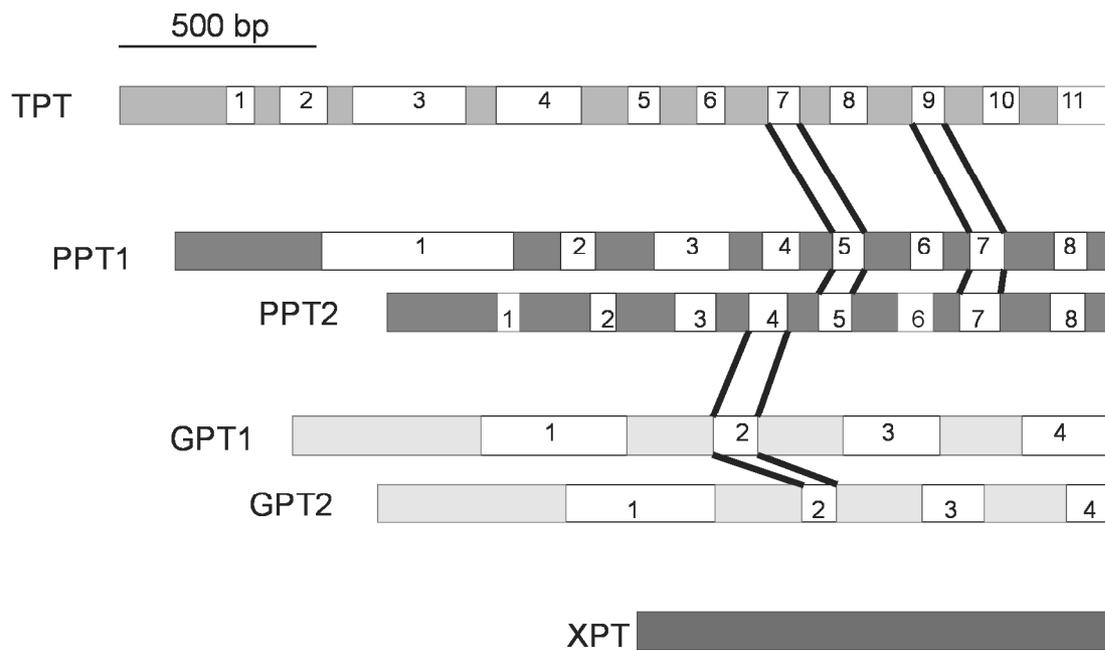


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Exon- Intronstruktur der Phosphattranslokatorgene in *Arabidopsis thaliana*. Die Abbildung stellt die Längen sowie die Lage der Introns (nummeriert) in den einzelnen Genen schematisch dar, Introns sind weiß gekennzeichnet, die Exons der unterschiedlichen Klassen in Grautönen (unterschiedliche Helligkeit zwischen den verschiedenen Klassen). Introns, welche in verschiedenen Klassen an gleicher Position - bezogen auf die Proteinsequenz - lokalisiert sind, wurden durch Strichverbindungen miteinander verbunden.

Die exakten Intronpositionen der PTs sind in Abb. 3.2 dargestellt. Der Darstellung liegt ein *ClustalX-Alignment* der sechs Phosphattranslokatoren aus *Arabidopsis thaliana* zu Grunde. Zusätzlich wurden Membranspannen eingezeichnet (grau unterlegt). Verschiedene Vorhersageprogramme prognostizieren für die Phosphattranslokatoren eine unterschiedliche Anzahl von Transmembranspannen, welche zwischen sechs und zehn liegt. Hier wurde ein Modell mit acht Membranspannen ausgewählt, das statistisch gesehen (neben einem Sieben-Membranspannen-Modell) am häufigsten vorhergesagt wurde.

In der vorletzten Membranspanne liegt die wahrscheinliche Substratbindestelle, ein Lysin (Lysin₂₇₃ des Spinat-TPT) gefolgt von einem Arginin (Flügge und Heldt, 1979; Fischer et al., 1994a), welche innerhalb der Phosphattranslokatorfamilie in allen Klassen konserviert ist.

AtTPT	MESRVLLRAT	ANVVG-----	---IPKLRRP	IGAIHRQFST	ASSSSFSVKP	IGGIGEGANL	52
AtXPT	---MISLNL	PSLNPGLLHK	TRTCQOPTRL	SALLVTNPKP	FNHRHPLGLS	PIPNLQIRDV	57
AtGPT2	----MLSSIK	PSSSS-----	-----FSTAI	SGSVRRSIPT	KLKFSPLLI	KNCHNQSFNA	46
AtGPT1	----MVLSVK	QTLS-----	-----PK	IGLFRRNPSS	SLGRSPVSL	FPST-ELPKR	41
AtPPT2	MFALTFLNPN	PRLP-----	-----	SPLFLAKSTP	ES-----	--ALSRRSRA	34
AtPPT1	MOSSAVFSL	PSLPL-----	LKPRRLSLRH	HPITTAASS	DLNVSPNVVS	IPSLRRSWR	55
AtTPT	ISGRQLRPIL	LLDSSAINGG	EKREILKPVK	AAAAEGGDTA	GDAKVGFLAK	YPWLVTGFFF	112
AtXPT	SAKPLLSLTN	PSSSGFSRK	PRSIAAVGSS	DSNPDEK-SD	LGEAEKKEK.	AKT.QL.IV.	116
AtGPT2	NVVS HQPLH	ISSASNFKR-	EVKVEAYEAD	RSRPLDINIE	LPDEQ----S	AQK.KI.IY.	101
AtGPT1	TVLAVSKPLH	LSSSLRAKSP	VVRCEAYEAD	RSEPHPIGDD	AA.AETKSEA	AKK.KI.IY.	101
AtPPT2	FSSSNS----	-----YPWRP	NLRFNGFKLK	S.TVPEN--V	EGGDLESGSL	VKG.KL.GM.	83
AtPPT1	LASSDSPLRA	WSGVPSPISH	SLDTNRFRTA	.T.VPES--.	EEGDN-SGKL	TKV.EL.LL.	112
AtTPT	FMWYFLNVIF	NILNKKIYNY	FPYPYFVSVI	HLFVGVVYCL	ISWSVGLPKR	APIDSNLLKV	172
AtXPT	GL..FQ.IV.	..F...AL.VWLLASF	Q..A.SIWM.	VL..FK.YPC	PK.SKPFIIA	176
AtGPT2	AT.WA...V.	..Y...VL.AWLT.TL	S.AC.SLMM.	V..ATRIADA	PKT.LEFW.T	161
AtGPT1	AT.WA...V.	..Y...VL.A	Y...WLT.TL	S.AA.SLMM.	...A..IVET	PKT.FDEFW.T	161
AtPPT2	GV..L..IYY	..F..QVLRV	Y...AT.TAF	Q.GC.TLMIA	.M.LLK.HPR	PKFSPSOFT.	143
AtPPT1	A...LF.IY.	..Y..QVLKA	LHA.MT.TLV	QFAV.S.LIT	.M.VLN.Y..	PK.SGAQ.AA	172
AtTPT	LIPVAVCHAL	GHVTSNVSFA	AVAVSFTHTI	KALEPFFNAA	ASQFIMGQSI	PITLWLSLAP	232
AtXPT	.LGP.LF.TI	..ISAC...S	K.....V.	.SA..V.SVI	F.-SLL.D.Y	.LAV...IL.	235
AtGPT2	.F...A.TI	...AAT..MS	K.....I.	.SG..A.SVL	V.R.F..ETF	.LPVY...L.	221
AtGPT1	.F...A.TI	...AAT..MS	K.....I.	.SG..A.SVL	V.R..L.ETF	.TSVY...I.	221
AtPPT2	IVQL..A.T.	.NLLT...LG	R.N....T.	..M..F.TVL	L.VLLL.EWP	SLW.VC..L.	203
AtPPT1	ILPL..V.T.	.NLEFT.M.LG	K.S....T.	..M..F.SVL	L.AMFL.EKP	TPWVLGAIV.	232
AtTPT	VVLGVAMASL	TELSFNWLGF	ISAMISNISF	TYRSIFSCK-	---AMTDMDS	TNVYAYISII	288
AtXPT	I.M.CSL.AV	..V...LG.L	SG....VG.	VL.N.Y..R-	SLQSFKEI.G	L.L.GC...L	294
AtGPT2	IIG.C.L.AI	...N..IT..	MG.....LA.	VF.N.F...-	GMKG-KSVSG	M.Y..CL.MM	279
AtGPT1	IIG.C.LSA.	...N..MI..	MG.....LA.	VF.N.F...-	GMKG-KSVSG	M.Y.ACL.ML	279
AtPPT2	I.A..SL..F	..A...J..	C...A..VTN	QS.NVL...F	MVGKD-AL.N	I.LFSI.T..	262
AtPPT1	I.G...L..I	S.V...A..	S...A..LTN	QS.NVL...V	MVKKDDSL.N	ITLFSI.TLM	292
AtTPT	ALFVCIPPAI	IVEGPKLLNH	GFADAIKVG	-MTKFISDLF	WVGMFYHLYN	QLATNTLERV	347
AtXPT	S.LYLF.V..	F...-SHWVP	.YHK...S..	TPST.YEWVL	LS.V.....	.SSYQA.DEI	353
AtGPT2	S.VILT.FS.	A...QMWA	.WQN.VSQ..	--PN.VVWV	AQSV.....	.VSYMS.DQI	337
AtGPT1	S.LILT.F..	A...QMWD	.WQT.L.T..	--PQ.VVWV	AQSV.....	.VSYMS.DQI	337
AtPPT2	SFILLV.L..	LID.F.VTPS	HLQV.GLS.K	---E.CIMSL	LA.VCL.S.Q	.VSYMI..M.	319
AtPPT1	S.VLMA.VTF	FT..I.FTPS	YIQS.GVN.K	---QIYTKSL	IAALCF.A.Q	.VSYMI.A..	349

Abb. 3.2: Vergleich der Positionen von Exons und Introns der PT-Gene; Membranspannen.

AtTPT	APLTHAVGNV LKRVFVIGFS IVIFGNKIST QTGIGTGIAI AGVAMYSIIKA KIEEEKRQG	407
AtXPT	S...FS...T M...V...I.T VLV.R.PVRP LNAL.SA... F.TFL..QATA .KKKIEVG.	413
AtGPT2	S...FSI..T M..IS..VA. .I..HTP.QP VNAL.AA... F.TFL..QA.Q -----	387
AtGPT1	S...FS...T M..IS..V.. .I..RTPVQP VNAL.AA... L.TFL..QA.L -----	387
AtPPT2	S.V..S...C V...V..T.. .LF.KTPVSP LNS...AT.L ...YL..RA.R VQVKPNPKM	379
AtPPT1	S.V..S...C V...V..V.. VIF.KTPVSP VNAF.....L ...FL..RV.- -GIKP.PKT	406
AtTPT	KKA-	410
AtXPT	D.KN	417
AtGPT2	----	
AtGPT1	----	
AtPPT2	S---	380
AtPPT1	A---	407

Abb. 3.2 Fortsetzung. Vergleich der Positionen von Exons und Introns der PT-Gene; Membranspannen. Der Aminosäurevergleich basiert auf einem Ergebnis des ClustalX-Programms. Die Präsequenzen der Proteine sind durch Fettdruck hervorgehoben. Die Positionen der Introns in der DNA-Sequenz sind durch Pfeile gekennzeichnet. Stellen, an denen sich die Intronpositionen zwischen einzelnen Klassen höchstens um sechs Basenpaare unterscheiden, sind hellgrau unterlegt. Mit einem mittleren Grauton sind wahrscheinliche Transmembranbereiche hervorgehoben. Die putative Substratbindestelle der Phosphattranslokatoren (KR) ist dunkelgrau markiert.

Intron	<i>AtTPT</i>	<i>AtPPTs</i>	<i>AtGPTs</i>
1	2	0	0
2	0	0	1
3	2	0	0
4	0	2	0
5	1	0	
6	1	0	
7	0	0	
8	0	1	
9	0		
10	1		
11	0		

Tab. 3.2: Phasen der Introns der PT-Gene in *Arabidopsis thaliana*

3.1.2. Pseudogene der plastidären Phosphattranslokatoren

Bei Datenbanksuchen mit PT-Sequenzen wurden weitere Sequenzen erhalten, welche Homologien zu *GPT* oder *PPT* Sequenzen zeigten, sich bei genauer Analyse aber als Pseudogene erwiesen. Insgesamt wurden sechs *PPT*-Pseudogene und vier *GPT*-Pseudogene identifiziert. Da die Sequenzen z.T. nicht als Gene annotiert wurden und dementsprechend teilweise keine AT-Nummern zugeordnet bekamen, werden sie hier nummeriert und nach den Klonen, auf denen sie lokalisiert sind, benannt.

In der folgenden Tabelle 3.3 sind die plastidären Gene und Pseudogene sowie ihre chromosomale Lage dargestellt.

Gen	Klon	Chromosom	At-Nr.	Accession-Nr.
<i>AtTPT</i>	MCL19	5	At5g46100	AAC83815.1
<i>AtGPT1</i>	MGB8	5	At5g54800	BAB08759.1
<i>AtGPT2</i>	F8K4	1	At1g61800	AAC28500.1
<i>AtPPT1</i>	F19N2	5	At5g33320	BAB10483.1
<i>AtPPT2</i>	F4P13	3	At3g01550	AAF01540.1
<i>AtXPT</i>	K10A8	5	At5g17630	CAC01907.1
<i>AtGPTps1</i>	T24M8	4	-	-
<i>AtGPTps2</i>	F26C17	5	-	-
<i>AtGPTps3</i>	MMG15	3	-	-
<i>AtGPTps4</i>	T23J18	1	-	-
<i>AtPPTps1</i>	F25G13	4	-	-
<i>AtPPTps2</i>	T32A11	3	-	-
<i>AtPPTps3</i>	K12G2	5	-	-
<i>AtPPTps4</i>	F1I21	1	-	-
<i>AtPPTps5</i>	MJI6	3	-	-
<i>AtPPTps6</i>	T1D16	2	-	-

Tab. 3.3: Phosphattranslokatorgene und -pseudogene in *Arabidopsis thaliana*. Das Gen, der korrespondierende Klon, chromosomale Lokalisation, At-Nummer (At-Nr.) und zugehörige Accession-Nummer (Accession-Nr.) sind aufgeführt.

3.1.2.1. GPT-Pseudogene

In einem Sequenzvergleich der *GPT*-Gene und der vier *GPT*-Pseudogene (Abb. 3.3) wird deutlich, dass die Pseudogene neben mehreren Leserasterverschiebungen auch einige Stoppkodons enthalten. Die Homologien erstrecken sich über nahezu die gesamte Proteinsequenz. Bei zwei der Pseudogene fehlt jedoch das Transitpeptid (MMG15 und T23J18). Die Lage der Introns ist in allen *GPT*-Pseudogenen bezüglich der Positionen in *AtGPT1* und *AtGPT2* konserviert. F26C17 weist eine Lücke in der Homologie über etwa 100 Aminosäuren in der Mitte des Proteins auf, welche dem ursprünglichen GPT-Exon3 entsprechen würde. Die Ähnlichkeit zur GPT-Sequenz bricht bei MMG15 nach etwa 120 Aminosäuren des reifen Proteins ab (in Exon2). T23J18 beginnt erst nach ca. 50 Aminosäuren des reifen GPT-Proteins.

Tab. 3.4 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der Pseudogene mit den funktionellen GPTs sowie der Pseudogene untereinander. Alle Pseudogen-Aminosäuresequenzen weisen eine leicht höhere Homologie zu GPT2 auf. Die Sequenzen von T24M8, MMG15 und T23J18 bilden eine Gruppe mit hoher Aminosäure-Identität, während die F26C17 Sequenz sich am meisten von den anderen Sequenzen unterscheidet (Tab. 3.4).

	<i>AtGPT1</i>	<i>AtGPT2</i>	<i>T24M8</i>	<i>F26C17</i>	<i>MMG15</i>	<i>T23J18</i>
<i>AtGPT1</i>		74	65	59	67	79
<i>AtGPT2</i>			70	66	72	80
<i>T24M8</i>					74	92
<i>F26C17</i>					67	77
<i>MMG15</i>						84
<i>T23J18</i>						

Tab. 3.4: Homologievergleich der GPT-Gene und GPT-Pseudogene auf Aminosäureebene. Die Werte sind in „% Identität“ angegeben.

Ergebnisse

Präsequenz							
-85	MISSLRQPSI	SISGSDVVL	KRHATLI---	QLRPQSFSFP	SSREKSQRSV	PsGPT	
-66	.VL.VK.TLS	----PKIG.F	R.NPSSSL--	GRS.V.L.FP	.TELPKRTVL	AtGPT1	
-70	.LS.IKPS.S	.F.TAISGSV	R.SIPTKLF	SPLLIKN-C	HNQSFNANV.	AtGPT2	
IKPVLP	.-LTAI.GVS	-QSIQAKLQF	-----LHYP	L.ETSKSLIL	T24M8	
IKPV.S	.F.-AITGI-	R.SILPKLQF	SPFSIIEN--	----FQKPNH	F26C17	
	-----	-----	-----	-----	-----	MMG15	
	-----	-----	-----	-----	-----	T23J18	
-38	VSTKKPLHLA	CLGVGNFGSV	KNFESEASFG	QSDLVKCG	PsGPT		
-22	AVS.P.H.SS	S.-----	-----RA	K.PV.RVE	AtGPT1		
-21	SHQ.PLHISS	A-----	-----SN	FKRE.KVE	AtGPT2		
	YLINIFYHFR	NLSNFALVAA	AAQ-----	G..VFRV.	T24M8		
	LPQ.PL.SS*	NLSNFTFAAA	AA*-----	R..#LRV.	F26C17		
	-----	-----	-----	-----	-----	MMG15	
	-----	-----	-----	-----	-----	T23J18	
reifes Protein							
PsGPT	AYEAD--RSE	VEGGDGPSE	-----AAKKV	KIGIYFATWW	ALNVVFNIN	KKVLNAYPYP	53
AtGPT1	PHPI.DDAAA	AETKSE...L	59
AtGPT2	---R SRPLDINIE-	LPDEQS.Q.LY.....F...	55
T24M8	---R SI.IV#N.L-	--DKQSGQ..	*.....I..	...G...N..F..L	
F26C17	...S.--WPR	LI.I.IN.P-	--DEQSGQ..	.L..CC....	..HI....*KF..M	
MMG15	---R PI.I.IHVL-	--E#QSRQ..D.S.N..F..L	
T23J18	-----	-----	-----	-----	-----	-----VYM	
PsGPT	WLTSTLSLAC	GSLMMLISWA	TRIAEAPKTD	LEFWKTLFPV	AVAHTIGHVA	ATVSMKVVAV	113
AtGPT1L.....	VG.V.T....	FD...T....	119
AtGPT2L...V..	...D....	...T....	115
T24M8	..L.....	..L...V..V	.GV.D.L*I.	.Y...T....	.L.....E	.I.....V.	
F26C17	C.....PS	..L.T.V..V	.GVV..L..N	.D.*.T..L	.L.....	.I.T...V.	
MMG15	..LM.....	..PL...V..V	S.V.D.L*I.	.D.L.T....	.L.....E	.I.....V.	
T23J18	..L.....Y	..L...V..V	.V..L..I.	.D...S....	.L.....E	.I.....V.	
PsGPT	SFTHIIKSGE	PAFSVLVSRF	ILGETFPVPV	YLSLLPIIGG	CALAAVTELN	FNMIGFMGAM	173
AtGPT1TS.I.....	...S.L....	179
AtGPT2	FM.....L.I....	..IT.....	175
T24M8	...T#..S.	A.....SL	F...S..LH.*M.	
F26C17	...V...S.	...R...S.	F...S.H.S.TR.IM.	
MMG15	...T#..S.	AT...F---	-----	-----	-----	-----	
T23J18	...T#..S.	A..G...SL	F...S..LH.*S.....	
PsGPT	ISNLAFVFRN	IFSCKGMKKG	SVSGMNYIAC	LSILSLAILT	PFAIAVEGPA	MWAAGWQKAL	233
AtGPT1M...L..VD...T..	239
AtGPT2MM..V..	..S.....N.V	235
T24M8V.....	..MM..L.V.	...NS.....	...D...NDV	
F26C17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
MMG15	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
T23J18V.....	..MMT.L.V.	...NYV....	..VD...NDV	
PsGPT	AEIGP-QFIW	WVAAQSIFYH	LYNQVSYMSL	DEISPLTFSI	GNTHKRISVI	VSSIIIFHTP	292
AtGPT1	.TV..-....	..V...V..Q.....VR..	398
AtGPT2	SQV..-N...	..V...V..Q.....A.....	294
T24M8	SKSD.#N..*	..V.H.V..	N*.....AL	.A.....Q.L	
F26C17	-----	..M...V..Q.....V	..K..W....QKH	
MMG15	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
T23J18	SKSD.#N..*	..V.H.V..	*.....AFL	.A.....Q..	
PsGPT	IQPVNALGAA	IAVFGTFLYS	QAKQ	316			
AtGPT1	V.....	..I.....	...L	322			
AtGPT2IF.....	...L	318			
T24M8	L#H.....	..I...I..	----				
F26C17	.K.....SV.	..I...LTF.	----				
MMG15	-----	-----	----				
T23J18	.#H.....	..I...I..	----				

Abb. 3.3: Sequenzvergleich der AtGPT-Gene und -Pseudogene. Die Sequenzen sind im Vergleich zur Sequenz des GPT aus Erbsenwurzel dargestellt. Ein Punkt (.) symbolisiert identische Aminosäurereste, (*) steht für ein Stoppkodon, (#) stellt eine Leserasterverschiebung dar. (-): keine Homologie in diesem Bereich.

3.1.2.2. PPT-Pseudogene

Die Situation der sechs *PPT*-Pseudogene stellt sich komplexer dar (Tab. 3.5, Abb. 3.4). Die Pseudogene lassen sich hier in drei Gruppen einteilen: F25G13 besitzt eine typische *PPT1*-Präsequenz, die Homologie endet jedoch nach wenigen Aminosäuren des reifen Proteins. Zur zweiten Gruppe gehören die Sequenzen T32A11, K12G2 und F1I21. Ihre Ähnlichkeit zum *PPT* erstreckt sich vom N-Terminus bis zur Hälfte der Präsequenz und taucht dann erst wieder in einem Bereich von 46 Aminosäuren in der Mitte des reifen Proteins auf. Die Homologie beginnt exakt an der Stelle, wo in den funktionellen *PPTs* Exon⁴ beginnt, welches in diesen Pseudogenen vollständig erhalten ist. Nach Intron⁴ folgen noch einige Aminosäuren des Exons⁵, ehe die Homologie wieder abbricht.

Der letzten *PPT*-Pseudogengruppe (MJI6 und T1D16) fehlt das Transitpeptid, und innerhalb des Proteins gibt es getrennte *PPT*-homologe Bereiche von 28, 49 und 62 Aminosäuren. Der erste Bereich entspricht dem *PPT*-Exon². Es fehlen jedoch ca. 15 Aminosäuren am C-Terminus. Der zweite Homologiebereich ist identisch mit dem *PPT*-Exon³, der dritte erstreckt sich vom Beginn des Exons⁶ bis zum Ende des Exons⁷. Die Lage des dazwischenliegenden Introns ist ebenfalls konserviert.

Aus dem *PPT*-Sequenzvergleich (Abb. 3.4) kann man schließen, dass wahrscheinlich alle *PPT*-Pseudogene von *AtPPT1* abstammen, da die Aminosäure-Identitäten zwischen diesem und den Pseudogenen wesentlich höher sind als zwischen *AtPPT2* und den Pseudogenen (Tab. 3.5).

Die F25G13 Sequenz weist starke Ähnlichkeit mit der Präsequenz und dem Beginn des reifen *PPT1*-Proteins auf (88%). Die Sequenzen F32A11, K12G2 und F1I21, Sequenzen der zweiten Gruppe, stammen offensichtlich voneinander ab; ihre Aminosäure-Identität beträgt über 95%. Die dritte Gruppe (MJI6, T1D16) ist zu 86% identisch, kann jedoch aufgrund fehlender Überlappungsbereiche nicht mit den übrigen Pseudogenen verglichen werden.

Ergebnisse

Präsequenz

```

-81 MQSSAVFSAS PSLPLLKPGR LSLRH-PVT- --ASSNLSVS PPNVSVPPPL BoPPT
-84 .....L. ....R. ....H.I.T AAS..D.N.. .-...I.S. AtPPT1
-55 .FALTFLNPN .R..SP---- .F.AK----- --STPE----- -----SA. AtPPT2
      .....I..L. #.....Q. ....H.I.V -AS..D.NIF .-...T.S. F25G13
      .....L. ..I...QQR. ....H.I.- AAS..D.NM. .-..PV---- T32A11
      .....L. ..I...QQR. ....H.I.- AAS..D.NM. .-..PV---- K12G2
      .....PL. .LI...QQR. ....H.I.- AAS..D.NM. .-..PV---- F1I21
      ----- MJI6
      ----- T1D16

-35 PRRSWRLASS DSPLRAWGSL PSVSSPSLDT NRFKT BoPPT
-35 S.....L. ....V ..PI.H.... ..R. AtPPT
-27 S...RAFS. N.--YP---- -RPN-LRFNG FKL.S AtPPT2
      S...L..T.. ....V ..SI.H.... ..T. F25G13
      ----- T31A11
      ----- K12G2
      ----- F1I21
      ----- MJI6
      ----- T1D16
  
```

reifes Protein

```

BoPPT AATAVP---- EE-GE----- -GSGKMTKVL ELGLLFAMWY LFNIFYFNIYN KQVLKALHAP 49
AtPPT1 .....I..... .SA-.EGD-- -N...L.... ..... 52
AtPPT2 .T--..... .NV--GGD-- LE..SLV.G. K..GM.GV.. .L...Y..F. ....RVYPY. 52
F25G13 .....I..... *SA-.EGD-- -N...L..I. .... 52
T32A11 -----
K12G2 -----
F1I21 -----
MJI6 -----
T1D16 -----#...

BoPPT MTVTLVQFAV GSVLITFMWA LNLVKRPKIS AAQLAAILPL AVVHTLGNLF TNMSLGKVSV 109
AtPPT1 .....I..V ..... G..... .....I..... 112
AtPPT2 A...AF.LGC .TLM.AI..L .K.HP...F. PS.FTV.VQ. ..A.....L ..V...R.N. 112
F25G13 -----
T32A11 -----
K12G2 -----
F1I21 -----
MJI6 .....SI..V ----- .V..... V..C..... .....Y.
T1D16 .I..... .P..V..V ----- D..... E...Y.

BoPPT SFTHTIKAME PFFSVVLSAM FLGEVPTPWV IGSIIPIVGG VALASVTEVS FNWAGFLSAM 169
AtPPT .....L.... ....K.... L.A.V.... ....IS... .....S... 172
AtPPT2 .....T.L..VL L...W.SL.I VC.LL...A. .S...F..A. ....I..C... 172
F25G13 -----
T32A11 -----K...*. LSA.V..... ....IS... ....R.S...
K12G2 -----K...*. LSA.V..... ....IS... .....S...
F1I21 -----K...Y. LSA.V..... ....IS... .....S...
MJI6 .....P.. ....L...L .H-----
T1D16 .....I. ....L.... ..-----

BoPPT ASNLTNQSRN VLSKVMVKK DDSLDNITLF SIITLMSLFL MAPVTFFSEG IKFTPSYIQS 229
AtPPT1 .....V. ....T. .... 232
AtPPT2 ...V..... ....F..G. -.A...N.. ....II.FI. LV.LAILID. F.V...HL.V 232
F25G13 -----
T32A11 .....P. -----
K12G2 .....P. -----
F1I21 .....P. -----
MJI6 ----- .M..... .....V. ..H...T.. .....C...
T1D16 ----- .I..T.... ....I..V. ..H...T.. .....
  
```

Abb. 3.4: Sequenzvergleich der AtPPT-Gene und -Pseudogene – Teil 1.

BoPPT	AGVNVQQIYT	KSLIAALCFH	AYQQVSYMIL	ARVSPVTHSV	GNCVKRVVVI	VSSVIFFKTP	289
AtPPT1K....	292
AtPPT2	..LS.KEFCI	M..L.GV.L.	S.....	EM.....	T..IL.....	292
F25G13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
T32A11	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
K12G2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
F1I21	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
MJI6F.D.....	-----	-----	-----	
T1D16	T.....Y..	-----	-----	-----	
BoTPT	VSPVNAFGTG	IALAGVFLYS	RVKRI--KPK	PKTA			321
AtPPT1G.--...			324
AtPPT2	...L.SI..A	T.....Y...	.A..VQV..N	..MS			326
F25G13	-----	-----	-----	----			
T32A11	-----	-----	-----	----			
K12G2	-----	-----	-----	----			
F1I21	-----	-----	-----	----			
MJI6	-----	-----	-----	----			
T1D16	-----	-----	-----	----			

Abb. 3.4: Sequenzvergleich der AtPPT-Gene und -Pseudogene, Fortsetzung. Die Sequenzen sind im Vergleich zur Sequenz des PPT aus Blumenkohl dargestellt. Ein Punkt (.) symbolisiert identische Aminosäurereste, (*) steht für ein Stoppkodon, (#) stellt eine Leserasterverschiebung dar. (-): keine Homologie in diesem Bereich.

	<i>PPT1</i>	<i>PPT2</i>	<i>F25G13</i>	<i>F32A11</i>	<i>K12G2</i>	<i>F1I21</i>	<i>MJI6</i>	<i>T1D16</i>
<i>PPT1</i>		52	88	89	90	88	89	90
<i>PPT2</i>			35	29	30	30	55	55
<i>F25G13</i>				76	76	71	-	-
<i>F32A11</i>					99	96	-	-
<i>K12G2</i>						97	-	-
<i>F1I21</i>							-	-
<i>MJI6</i>								86
<i>T1D16</i>								

Tab. 3.5: Homologievergleich der PPT-Gene und PPT-Pseudogene auf Aminosäureebene. Die Werte sind in „% Identität“ angegeben.

3.1.2.3. Herkunft der Pseudogene

Der Ursprung der *PT*-Pseudogene ist nicht klar zu ermitteln. Es liegen keine Tandemduplikationen vor. Außerdem scheinen die *PT*-Gene und Pseudogene nicht in eindeutig als dupliziert gekennzeichneten Regionen zu liegen. Es wurde daher in Regionen, welche die *PT*-Gene und -Pseudogene umgeben, nach Sequenzen gesucht, die für eine Transduktion verantwortlich sein könnten.

Auffällig ist, dass der *AtPPT1*, von dem wahrscheinlich alle *PPT*-Pseudogene abstammen, in der Zentromerregion des Chromosoms 5 liegt (Klon F19N2). Die *PPT1*-Sequenz ist von mehreren möglichen Transposon-ähnlichen Sequenzen umgeben, u. a. einer LINE-(*long interspersed nuclear element*)-Sequenz. Die meisten *PPT*-Pseudogene liegen nicht in unmittelbarer Nähe von annotierten Transposonsequenzen. Nur bei dem Pseudogen auf Klon T1D16 findet man ca. 2 kb entfernt ein *retrotransposon-like element limpet*. Zwar finden sich bei den übrigen *pseudoPPTs* ebenfalls TEs (*transposable elements*) auf den entsprechenden Klonen, diese sind dann jedoch 8-20 kb entfernt.

Bei den *GPT*-Pseudogenen liegt in der Nähe des Gens auf Klon T24M8 eine Transposonsequenz mit Ähnlichkeit zu reversen Transkriptasen (T24M8.8). Diese auf Chromosom 4 lokalisierte *GPT*-Pseudogenesequenz weist eine hohe Identität (92%) mit der T23J18 *GPT*-Pseudogenesequenz auf Chromosom 1 auf Tab. 3.5).

Die auf Klon F26C17 lokalisierte Sequenz liegt ebenfalls neben einer möglichen Transposonsequenz, wie der folgende Datenbankausschnitt zeigt:

```
misc_feature complement(43456..44487)
    /note="pseudogene; similar to an Arabidopsis family of
    proteins; see T2L5.8"
misc_feature complement(45121..46432)
    /note="pseudogene; contains similarity to triose
    phosphate/phosphate translocators"
gene 49155..51238
    /gene="F26C17.1"
CDS join(49155..50213,50303..51238)
    /gene="F26C17.1"
    /note="contains similarity to maize transposon MuDR
    (GB:M76978)"
    /codon_start=1
    /evidence=not_experimental
    /protein_id="AAD49099.1"
    /db_xref="GI:5732431"
```

3.1.3. *PT-homologe Gene in Arabidopsis thaliana*

Führt man weitere Datenbankrecherchen mit PT-Proteinsequenzen (tBLASTn) durch, erhält man eine Vielzahl zusätzlicher Proteine als Resultat. Diese Sequenzen weisen eine Homologie von etwa 15-25% zu den Phosphattranslokatoren auf, in einigen Bereichen der Proteine liegt sie jedoch signifikant höher (30-40%). Die meisten dieser Proteine gehören zur NST-Genfamilie (*Nucleotide Sugar Transporter*).

NST-Proteine findet man im Golgi-Apparat und im ER eukaryotischer Zellen. Sie katalysieren den Austausch eines Nukleotid-Zuckers gegen ein Nukleotid (Antiport), z. B. GDP-Mannose gegen GMP oder UDP-Galaktose gegen UMP. So werden Metabolite, die im Zytosol synthetisiert werden, ins Lumen des Golgi-Apparates oder des ERs transportiert, wo sie zur Synthese von Glykoproteinen und -lipiden dienen. Sequenzierte NST-Proteine sind ca. 320-340 Aminosäurereste lang und besitzen acht bis zwölf Transmembranregionen (Abeijon et al., 1997; Kawakita et al., 1998).

PT- und NST-Gene werden auch zur TPT-NST-Genfamilie zusammengefasst. Beide sind wiederum Mitglieder der DMT (*Drug/Metabolite Transporter*) Superfamilie (Jack, 2001). Bisher gibt es keinen experimentellen Beweis für die Funktion der sog. NST-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* als *Nucleotide Sugar Transporter*.

3.1.3.1. *PT-homologe Sequenzen mit konservierter Substratbindungsstelle*

Die durch die Datenbanksuchen erhaltenen putativen NST-Proteinsequenzen wurden zunächst mit den Phosphattranslokatorproteinen verglichen: ein aus einem *Alignment* ausgewählter NST-Sequenzen und den PT-Sequenzen erstellter phylogenetischer Baum (Abb. 3.5) zeigt, dass die Sequenzen sich in vier Gruppen aufteilen. Auffällig ist, dass in allen Sequenzen das Lysin der wahrscheinlichen Substratbindungsstelle als einzige Aminosäure konserviert ist. Während die folgende Aminosäure bei allen plastidären Phosphattranslokatoren ein Arginin ist, findet man bei den PT-homologen Sequenzen drei Gruppen: eine gemischte Gruppe mit den Resten Valin, Alanin oder Glyzin (K/VAG-Gruppe, sieben Sequenzen), eine mit Asparaginsäure (KD-Gruppe, acht Sequenzen), und eine Gruppe, bei der auf das Lysin ein Threonin folgt (KT-Gruppe, neun Sequenzen). Ein *Alignment*-Ausschnitt im Bereich dieser möglichen Substratbindungsstelle ist in Abb. 3.6 dargestellt. Die lokale Homologie zwischen den Sequenzen der unterschiedlichen Gruppen beträgt hier zwischen 20 und 50% und ist damit wesentlich höher als die Aminosäure-Identitäten der vollständigen Proteine.

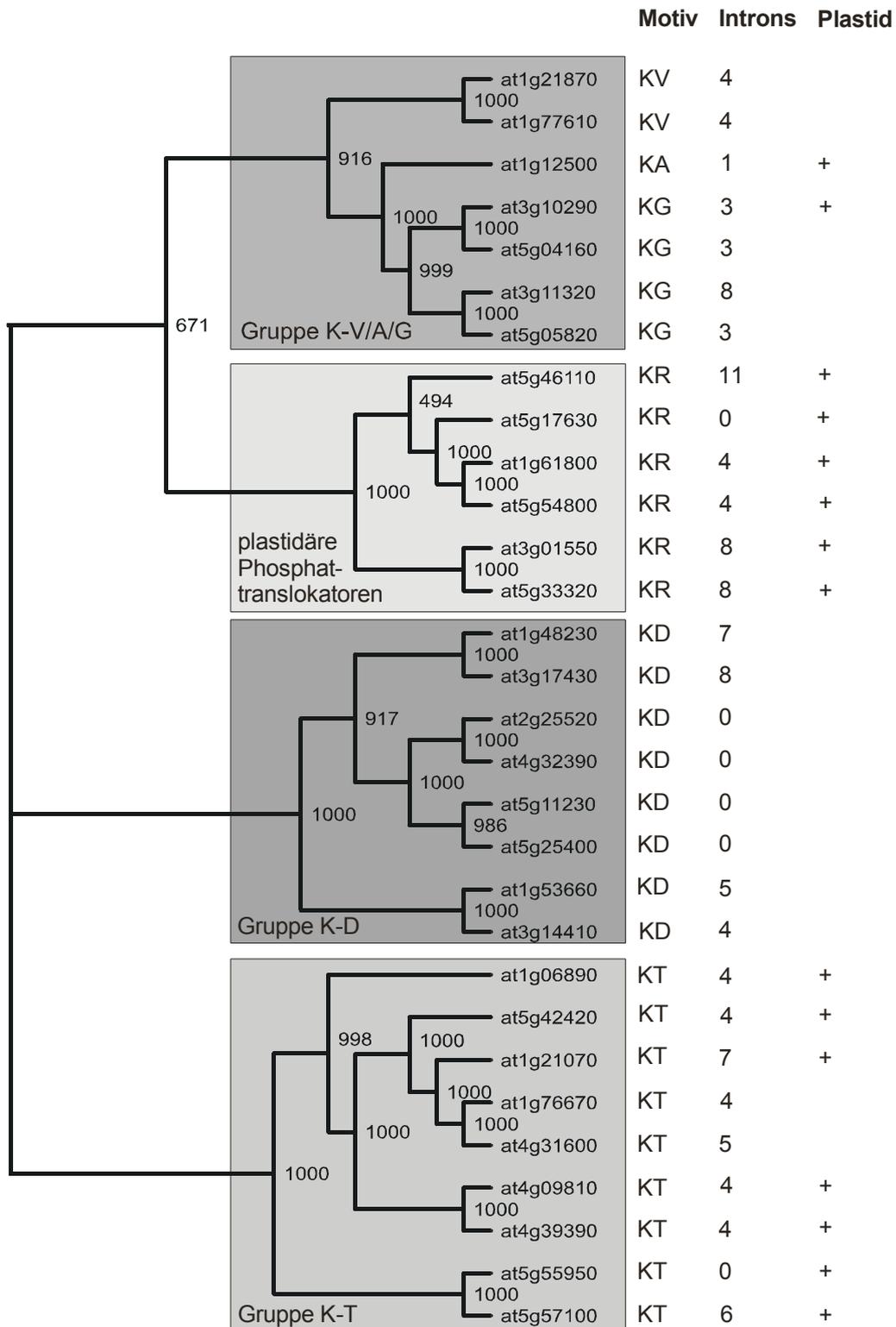


Abb. 3.5: Phylogenetischer Baum der Phosphatranslokatoren und deren homologer Gene in *Arabidopsis thaliana*. Auf der rechten Seite ist in der ersten Spalte die Sequenz der beiden wahrscheinlich an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren aufgeführt, in der nächsten Spalte die wahrscheinliche Anzahl der Introns. In der Spalte ganz rechts ist angegeben, ob die Sequenz möglicherweise ein Transitpeptid besitzt, welche das Protein zu den Plastiden dirigiert. +: Plastidäres Transitpeptid vorhergesagt (ChloroP).

at1g61800_	AQSVFYHLYNQVSYMSLDQISPLTFSIGN [□] TMKRISVIVASIIIFHT-PIQP	AtGPT2
at5g54800_V.....S.....R.-.V..	AtGPT1
at5g17630_	LSG.....S..QA..E.....V.....VV..ISTVLV.RN-.VR.	AtXPPT
at3g01550_	LAG.CL.S.Q.....I.EMV..V.H.V..CV..VV..TS..LF.K.-.VS.	AtPPT2
at5g33320_	IAALCF.A.Q.....I.AR.V..V.H.V..CV..VV...S.V.F.K.-.VS.	AtPPT1
at5g46110_	WVGM.....LATNT.ERVA...HAV..VL..VF..GF..V..GN-KIST	AtTPT
at1g21870_	NSG.LAFCL.FSIFYVIQSTTAV.FNVAGNL.VAVAVFV.WM..RN-.S.	
at1g77610_	SSG.LAFCL.FSIFYVIHSTTAV.FNVAGNL.VAVAVMV.WL..RN-.SY	K-V/A/G-Gruppe
at3g10290_	VN..MAYSA.LLNFLVTKHT.A..LQVLGNA.GAVAV.I..LL.RN-.VTV	
at5g04160_	VN..MAYSA.LLNFLVTKHT.A..LQVLGNA.GAVAV.I..L..QN-.VTV	
at3g11320_	FN.ALAYFV.LTNFLVTKHT.A..LQVLGNA.GAVAV.V..L..RN-.VSV	
at5g05820_	FN.ALAY.V.LTNFLVTNHT.A..LQVLGNA.GAVAV.V..L..KN-.VSV	
at1g12500_	GNATVAY.V.LTNFLVTKHT.A..LQVLGNG.AAVAAGV.VL..RN-.VTV	
at1g48230_	SNALCALAL.FSIFLVIGRTGAV.IRVAGVL.DWIL.AL.TV..PEST.TG	
at3g17430_	SNALCALAL.FSIFLVIGRTGAV.IRVAGVL.DWIL.AL.TV..PEST.TG	K-D-Gruppe
at2g25520_	TN..CAFAL.LAVFLLVGKT.A..MNVAGVV.DWLL.AF.WSVIKD-TVT.	
at4g32390_	TN..CAFAL.LAVFLLVGKT.A..MNVAGVV.DWLL.AF.WSVIKD-TVT.	
at5g11230_	AN.FCAFAL.LAVFLLVGKT.A..MNVAGVV.DWLL.AF.WSVIKD-TVT.	
at5g25400_	TN.FCAFAL.LAVFLLVGKT.A..MNVAGVV.DWLL.AF.WSVIKD-TVT.	
at1g53660_	LN.LCTFAL.LSVFLVISRT.A..IR.AGVV.DWL.VLV.ALL.AETKLT	
at3g14410_	LN.LCTFAL.LSVFLVISHT.A..IRVAGVV.DWV.VLV.ALL.ADTKLT	
at1g76670_	LSCALAVFC.ISQ.LCIGRF.ATS.QVLGHM.TVC.LTLGWLL.DS-EMTF	
at4g31600_	LSCALAVFC.ISQ.LCIGRF.A.SFQVLGHM.TVC.LTLGWLL.DS-EMTF	K-T-Gruppe
at1g21070_	LSCALAVFC.ISQ.LCIGRF.ATS.QVLGHM.TVC.LTLGWLL.DS-EMTF	
at5g42420_	LSCGLAVFC.ISQ.LCIGRF.AVS.QVIGHM.TVCILTLGWLL.DS-AMTF	
at4g09810_	LSCTIAIGT.LSQFICIGRFTAVS.QVLGHM.T.L.L.MGFFF.DRDGLNL	
at4g39390_	LSCSIAVGT.LSQFICIGRFTAVS.QVLGHM.T.L.L.LGFTF.GKEGLNL	
at1g06890_	LSC LISVS.V.FSTFLVIGKT..V.YQVLGHL.TCL.LAFGYVLLRD-.FDW	
at5g55950_	--ALLGF.LQWSGALA.GAT.ATSHVVLGQF.TCVILLGGYV..GS-DPGF	
at5g57100_	--ALLGFFLQWSGALA.GAT.AI.HVVLGQF.TCVLLLLGNYY..GS-NSGF	

Abb. 3.6: Vergleich der PT-homologen Gruppen im Bereich der möglichen Substrat-Bindestelle. Mit (.) sind identische Aminosäuren im Vergleich mit dem AtGPT2 (at1g61800) dargestellt. Die Substratbindestelle (Pfeil) ist dunkelgrau unterlegt.

3.1.3.2. Weitere PT-homologe Sequenzen

Neben den zuvor beschriebenen PT-Homologen sind in Tabelle 3.6 weitere homologe Sequenzen aufgeführt, die sich jedoch nicht in eine der nach Bindungsstellensequenz aufgeteilten Gruppen einordnen lassen. Sie weichen in diesem Bereich von der Phosphatranslokatorsequenz ab und besitzen nicht das in den anderen Gruppen konservierte Lysin. Die Aminosäure-Identität mit den PTs ist deutlich geringer, ca. 15-20%, sie erreicht jedoch in einigen Bereichen Werte bis 40%. Die Sequenzen lassen sich auch hier in einzelne Gruppen einteilen: Die „Transportprotein-Gruppe A“ besteht aus den Sequenzen at5g65000, at5g41760, at2g43240 und at3g59360. Als Funktion für diese Proteine wird ein Nukleotid-Zuckertransport

genannt (z. B. für at5g41760: UDP-Galaktosetransporter, Quelle: TAIR). Die „Transportprotein-Gruppe B“ besteht aus drei Sequenzen: at2g13650, at1g76340 und at5g19980. Für das erstgenannte Protein wird als mögliches Substrat Vanadat vorgeschlagen, die zweite Sequenz zeigt Homologie zu einem charakterisierten GDP-Fucose Transporter aus *Homo sapiens* (Lühn et al., 2001). Die letzte Sequenz aus der Gruppe B ist einem GDP-Mannosetransporter aus *Leishmania major* ähnlich (Acc.-No. AAK30249). Ein Ausschnitt aus einem *Alignment* der PTs mit Sequenzen der Transportproteingruppen A und B im mittleren Bereich der Proteine, die fast alle ca. 320-340 Aminosäuren lang sind, ist in Abb. 3.7 dargestellt.

Alle gefundenen Sequenzen sind in der Tabelle 3.6 zusammengestellt. Als zusätzliche Informationen sind hier die *Accession*-Nummer und der Name des entsprechenden Klons angegeben. Weiterhin wird in einem unverwurzelten phylogenetischen Baum (Abb. 3.8) die Zugehörigkeit der verschiedenen Sequenzen zu den unterschiedlichen Gruppen verdeutlicht.

at1g61800_	I K S G E P A F S V	L V S R F F M G E T	F P - L P V Y L S L	L P I I G G C A L A	A I T E L N F N I T	AtGPT2
at5g54800_	I R F I L - T S	I S	. L M I	AtGPT1
at5g17630_	I . . A . . V . . .	I F . - S L L . D S	Y . - L A . W . . I	. . . V M . . S . .	. V . . V S . . L G	AtXPT
at3g01550_	I . A M . . F . T .	. L . V L L L . . W	P S - . W I V C V A . V S . .	S F . A S . . W I	AtPPT2
at5g33320_	I . A M . . F L . A M . L . . K	P T - P W . L G A I	V . . V . . V . . .	S . S . V S . . W A	AtPPT1
at5g46110_	I . A L . . F . N A	A A . Q . I . . Q .	I . - I T L W . . .	A . V V L . V . M .	S L . . . S . . W L	AtTPT
at1g76340_	F R . A V . I . V A	I G E T L . L H Q P	W . S V K T W G . .	A T . F . . S L . Y	V F . D Y Q . T . A	Gr. B
at5g19980_	F R . L T . L L V A	I A D T V . R S Q P	L . S R L T F	V V . L A . A V G Y	V A . D S S . T L .	Gr. B
at5g65000_	L N Q T K I F . T A	F F T F I I L R O K	Q S I . Q I G A L C	. L . M A A V L . S	V G E G S . K D S S	Gr. A
at2g43240_	S S T V A T I . T G	I A . A A L F . H I	L T M N F L L G I S	I V F . S M H Q F F	S P L S K A K D E Q	Gr. A

Abb. 3.7: Alignment-Ausschnitt eines Vergleichs zwischen plastidären Phosphattranslokatoren und Proteinen der Transportproteingruppen (Gr.) A und B. Identische Aminosäuren im Vergleich zur AtGPT2-Sequenz sind durch einen Punkt (.) dargestellt. Innerhalb Gr. A und B sind alle Aminosäuren, die an der entsprechenden Position auch in einem der *PT*-Gene vorkommen, grau unterlegt.

at-Nummer	Klon	AccessionNo	CloroP	score	Introns
at1g06470	F12D11.18	AAF24821.1	n		7
at1g06890	F4H5.5	AAF63135.1	j	0.53	4
at1g12490	T12C24.5	AAF88101.1	j	0.52	1
at1g21090	T22I11.10	AAF80654.1	j	0.52	4
at1g21870	T26F17.9	AAF16530.1	n		4
at1g48230	F11A17.27	AAF79516.1	n		7
at1g53660	F22G10.26	AAG51967.1	n		5?
at1g76190	T23J18.28	AAF17629.1	n		4
at1g76340	F15M4.16	AAF16667.1	n		0
at1g76670	F28O16.4	AAF04433.1	n		4
at1g77610	T5M16.20	AAG51677.1	n		4
at2g13650	T10F5.19	AAD22687.1	n		4
at2g25520	F13B15.18	AAD20711.1	n		0
at2g43240	F14B2.18	AAC64313.1	n	(0.49)	15
at3g10290	F14P13.11	AAF02813.1	j	0.55	3
at3g11320	F11B9		n		8
at3g14410	MLN21.19	BAB01046.1	n	(0.49)	4
at3g17430	MTO12.2	BAB02919.1	n		8
at3g48850	T21J18.120	CAB87913.1	j	0.56	4
at3g59360	F25L23.220	CAB91606.1	n		14?
at4g09810	F17A8.160	CAB39648.1	j	0.51	4
at4g31600	F28M20.210	CAA19763.1	n		5
at4g32390	F8B4.90	CAA22566.1	n		0
at4g39390	F223K16.20	CAB44674.1	j	0.51	4
at5g04160	F21E1.80	CAC05498.1	n		3
at5g05820	MJJ3.24	BAB09676.1	n		3
at5g11230	F2I11.20	CAB96648.1	n		0
at5g14040	MUA22.4	BAB08283.1	j	0.57	5
at5g19980	F28I16.130		n		0
at5g25400	F18G18.140		n		0
at5g41760	K16L22.3		n		6
at5g42420	MDH9.11	BAB10483.1	j	0.52	4
at5g55950	MYN21.6	BAB08660.1	n		0?
at5g57100	MUL3.4	BAA97360.1	n		6
at5g65000	MXK3.23	BAA97312.1	n		4

Tab. 3.6: Zusammenstellung aller gefundenen PT-homologen Sequenzen. Aufgeführt sind die Namen der Klone, die *Accession Number* (wenn vorhanden), die Vorhersage einer plastidären Präsequenz (j=ja, n=nein) durch das Programm „ChloroP“ (mit *score*) sowie die wahrscheinliche Anzahl der Introns; grau unterlegt sind die Klone, die im Text näher erläutert werden.

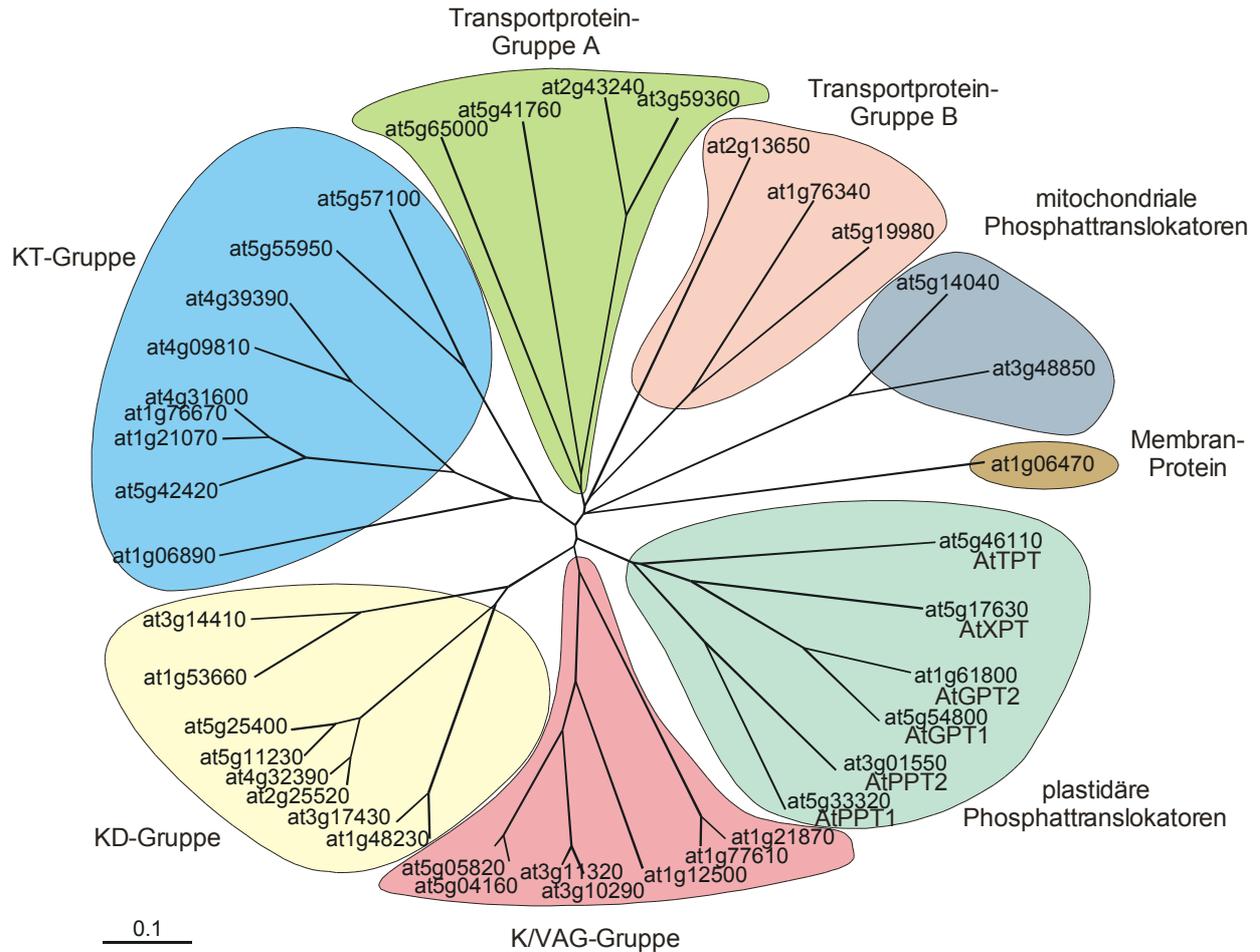


Abb. 3.8: Unverwurzelter phylogenetischer Baum aller PT-Gene und homologen Gene in *Arabidopsis thaliana*. Erstellt mit dem Programm ClustalX.

3.1.4. Hydrophobizitätsanalyse

Die Phosphattranslokatorproteine besitzen einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren (AtTPT z.B. 67.7%). Hydrophobizitätsanalysen der PT-Proteine zeigen, dass diese Proteine 6-9 Bereiche von 19-23 Aminosäuren besitzen, die α -helikale Strukturen bilden können (Willey et al., 1991). Wie in Abb. 3.2 dargestellt, favorisieren Vorhersageprogramme für die PTs häufig acht Transmembranspannen. Um herauszufinden, ob PT-homologe Sequenzen ähnliche Hydrophobizitätseigenschaften und eine vergleichbare Anzahl von Membranspannen besitzen, wurden aus den verschiedenen Familien Vertreter gewählt, deren Sequenz analysiert wurde: Abb. 3.9 zeigt einen Vergleich der Hydropathieplots des AtXPT und einer Sequenz aus der K/VAG-Gruppe

(at3g10290), welche wahrscheinlich ein Transitpeptid besitzt. Die Anzahl der Transmembranbereiche unterscheidet sich hier um zwei, und das Transitpeptid scheint bei der PT-homologen Sequenz etwas kürzer zu sein. Viele der PT-homologen Sequenzen scheinen wie die Phosphattranslokatoren sechs bis zehn Membranspannen zu besitzen. Für mitochondriale Transporter wird ein Dimer aus zwei Proteinen mit je sechs Membranspannen vorhergesagt. Tatsächlich besitzen die beiden als mitochondriale Phosphattranslokatoren bezeichneten Sequenzen nur vier bis sieben vorhergesagte Membranspannen.

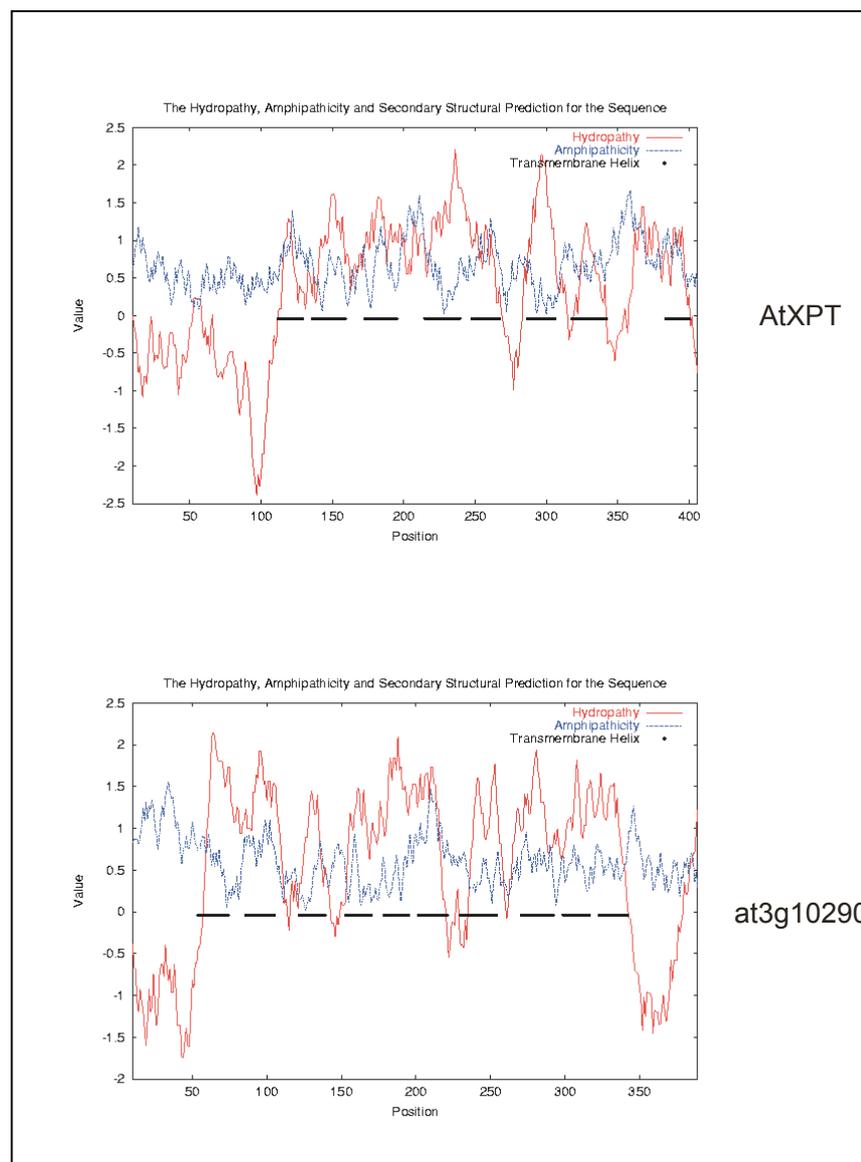


Abb. 3.9: Hydrophobizitätsanalyse und putative Transmembranregionen von AtXPT und at3g10290. Die Transmembranbereiche sind als horizontale Balken gekennzeichnet.

3.2. Expressionsstudien

3.2.1. Expression der plastidären Phosphattranslokatoren in *Arabidopsis thaliana*: Northern Blot Analysen und RT-PCR

Die Transkription eines Gens unterscheidet sich häufig in unterschiedlichen Gewebetypen, und viele zelluläre Prozesse führen zu einer Änderung der Genexpression. Es ist möglich, durch die Bestimmung von Transkriptmengen zu bestimmten Zeitpunkten und in verschiedenen Gewebetypen Rückschlüsse auf die Funktion eines Gens zu ziehen. Zurzeit sind vier verschiedene Methoden zur Determination von RNA bekannt: *Northern Blot* Analysen, *in situ* Hybridisierungen (Parker und Barnes, 1999), *RNase Protection Assays* (Hod, 1992) und RT-PCR (Weis et al., 1992). Als weitere Methode wären *cDNA Arrays* zu erwähnen (Bucher 1999).

Jede dieser Methoden hat bestimmte Vorteile. So stellt der *Northern Blot* die einzige Möglichkeit dar, Informationen über die mRNA-Größe, alternatives Spleißen und die Integrität der RNA-Präparation zu erhalten. Ein *RNase protection assay* ist nützlich, um Transkriptionsstart und -ende zu bestimmen oder um mRNAs ähnlicher Größe zu unterscheiden, die im *Northern Blot* auf gleicher Höhe erscheinen würden. *In situ* Hybridisierung ist die einzige Methode, die eine Lokalisation des Transkripts innerhalb bestimmter Zellen eines Gewebes erlaubt. Die Haupteinschränkung dieser drei Methoden ist ihre geringe Sensitivität (Melton et al., 1984). Die RT-PCR dagegen ist eine empfindliche *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation definierter cDNA-Sequenzen und erlaubt eine Analyse auch geringer Transkriptmengen (Wang und Brown, 1999).

Um Transkripte der PTs in verschiedenen Geweben von *A. thaliana* nachzuweisen, wurden *Northern Blot* Analysen durchgeführt (Abb. 3.10: *Northern Blot* Analyse von *GPT1* und *GPT2*). Da die Expression der PT-Gene mit Ausnahme des TPTs im *Northern Blot* aufgrund ihrer geringen Transkriptmenge schwer zu detektieren war, wurden zum Nachweis der Genexpression RT-PCR Experimente durchgeführt. Dabei konnte durch entsprechend ausgewählte Oligonukleotid-Kombinationen auch zwischen den Genen innerhalb einer Klasse unterschieden werden.

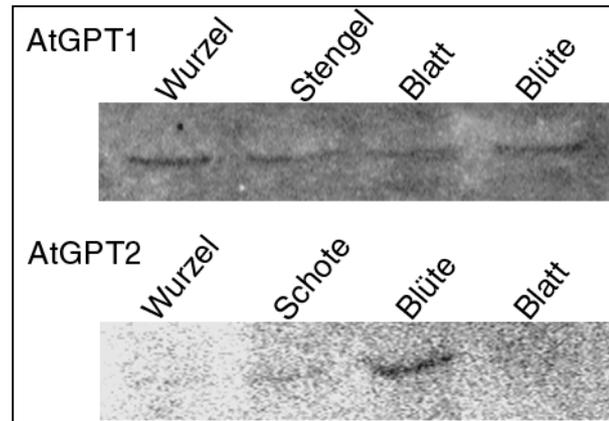


Abb. 3.10: Northern Blot Analyse. Es wurden 15 µg Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen. Als Sonden wurden einmal die Vollängen cDNA des *GPT1* verwendet, für den *GPT2* wurde eine spezifische PCR-Sonde (das Produkt der Oligonukleotide Bac1 und Bac 2, 150 bp, Sequenz: siehe Anhang) für die Hybridisierung eingesetzt.

Es wurde zunächst mit einem konventionellen Thermozykler gearbeitet. Da die Amplifikation einer DNA-Sequenz nur über einen bestimmten Bereich linear verläuft (bei logarithmischer Auftragung der relativen Produktakkumulation gegen die Zyklenzahl), wurden verschiedene PCR-Zykluszahlen (15-28) getestet, um diesen Bereich zu ermitteln. Die Amplifikationsprodukte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, anschließend wurde ein *Southern Blot* durchgeführt, der mit einer entsprechenden Sonde hybridisiert wurde. Als Standard für die eingesetzte cDNA-Menge wurde ein *Aktin2*-Amplifikat oder *18S rRNA* verwendet.

Zu Beginn der Experimente war nicht bekannt, dass es in *Arabidopsis thaliana* innerhalb einer PT-Klasse mehrere Gene gab. Daher wurden PCR-Sonden hergestellt, die – wie sich später herausstellte, nicht optimal geeignet waren, zwischen den Mitgliedern einer Klasse zu unterscheiden. Abb. 3.11 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR, bei der durch Auftragen der PCR-Produkte auf ein Agarosegel und eine anschließend durchgeführte Hybridisierung eines *Southern Blots* ein erster Überblick über die Transkriptmengen der PTs in unterschiedlichen Geweben erreicht wurde. Die *LHCP*-Sonde diente dabei als Kontrolle für die Reinheit der Wurzel-RNA Präparation, da dieses Gen nur in grünen Geweben exprimiert ist. Man sieht, dass außer dem TPT-Gen, welches nur eine sehr schwache Bande in der Wurzel zeigt, die Phosphattranslokatoren in allen Geweben, für die RT-PCR Experimente durchgeführt wurden, zu finden sind.

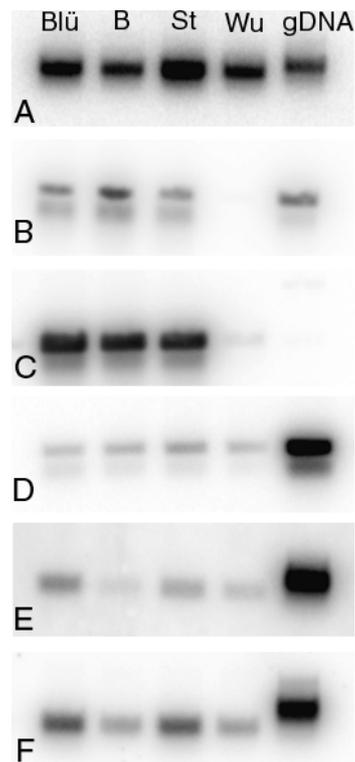


Abb. 3.11: Semiquantitative RT-PCR. Es wurden die Transkriptmengen von *Aktin2*, *LHCP* und verschiedenen Phosphattranslokatoren in unterschiedlichen Gewebetypen von *A. thaliana* getestet (Blü = Blüte, B = Blatt, St = Stängel, Wu = Wurzel). Nach erfolgter RT-PCR wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen, mittels *Southern Blot* auf eine Membran transferiert und mit spezifischen Sonden hybridisiert. A: *Aktin2*, 22 Zyklen; B: *LHCP*, 16 Zyklen, C: *TPT*, 20 Zyklen; D: *XPT*, 22 Zyklen; E: *GPT*, 22 Zyklen; F: *PPT*, 22 Zyklen.

Im Verlauf dieser Arbeit ergab sich die Möglichkeit, Experimente mit sogenannten *real-time* PCR-Geräten durchzuführen. Dabei handelte es sich um den LightCycler[®] (Roche) und das GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Es wurden mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green gearbeitet (Morrison et al., 1998). Ungebunden zeigt dieser Farbstoff kaum Fluoreszenz. Die Zunahme des Signals während der PCR wird am Ende des Elongationsschrittes eines jeden PCR-Zyklus durch ein entsprechendes optisches System detektiert und im Anschluss an die PCR mit der zugehörigen Software analysiert. Da jede Art von doppelsträngiger DNA Fluoreszenz erzeugt, ist diese Methode nicht spezifischer als eine konventionelle PCR. Allerdings kann zusätzliche Spezifität und eine PCR-Produkt-Verifizierung erreicht werden, indem man die Fluoreszenz als Funktion der Temperatur aufträgt und eine sog. Schmelzkurve erstellt (Ririe et al., 1997). Da die Schmelztemperatur eines Amplikons primär von seiner Nukleotidkomposition abhängt, ist es möglich, das Signal des korrekten Produktes zu identifizieren.

Als Standard gibt man entweder zuvor genau bestimmte Mengen an DNA mit entsprechenden Oligonukleotid-Paaren als Standard mit in die PCR (Standardgeraden-Methode), oder man bezieht die Ergebnisse auf einen internen Standard ($\Delta\Delta C_t$ -Methode, siehe Anhang).

Als interner Standard wurde zunächst *Aktin2* aus *Arabidopsis thaliana* gewählt. Es zeigte sich aber, dass dieses Gen nur geeignet ist, wenn man ausschliesslich die Transkriptmengen eines oder verschiedener Gene in einem einzigen Gewebetyp untersucht. Ein anderer interner Standard ist 18S rRNA. Wenn man dieses Gen als Standard für die *Aktin2*-Expression wählt, stellt man fest, dass die relativen Transkriptmengen zwischen den einzelnen Geweben variieren. Da zum Durchführungszeitpunkt der *real-time* RT-PCR Experimente die Sequenzen aller sechs plastidären Phosphattranslokatorgene aus *Arabidopsis* bekannt waren, konnten nun spezifische Oligonukleotide hergestellt werden, die zuverlässig zwischen den Mitgliedern einer PT-Klasse unterscheiden konnten.

In der Regel wurden vierzig Zykluswiederholungen durchgeführt. Nach der Reaktion wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt. Zwar diente dies nicht der Quantifizierung, doch erhielt man so zusätzlich zur stets durchgeführten Schmelzkurve eine weitere Kontrolle für die Spezifität der Amplifikation. Abb. 3.12 zeigt ein solches Agarosegel, welches im Anschluss an einen LightCycler[®]-Versuch angefertigt wurde. Da aufgrund der beschränkten Probenzahl keine Mehrfachwerte in einem Lauf gemessen werden konnten, zeigt Abb. 3.13 eine Auswertung von 4-6 (nicht in jedem Versuch wurden die Transkriptmengen aller Phosphattranslokatoren gemessen) unabhängigen LightCycler[®]-Versuchen zur Expression der PTs in *Arabidopsis thaliana*. Zur Auswertung wurde jeweils die Standardgeradenmethode verwendet. Da die absoluten Werte trotz Verwendung gleicher Mengen einer Erststrangpräparation zwischen den einzelnen Versuchen stark schwankten, sind die Werte nachträglich standardisiert worden. Als Standard diente hier *Aktin2*, bei späteren Experimenten wurden die besser geeigneten 18S rRNA Oligonukleotide gewählt.

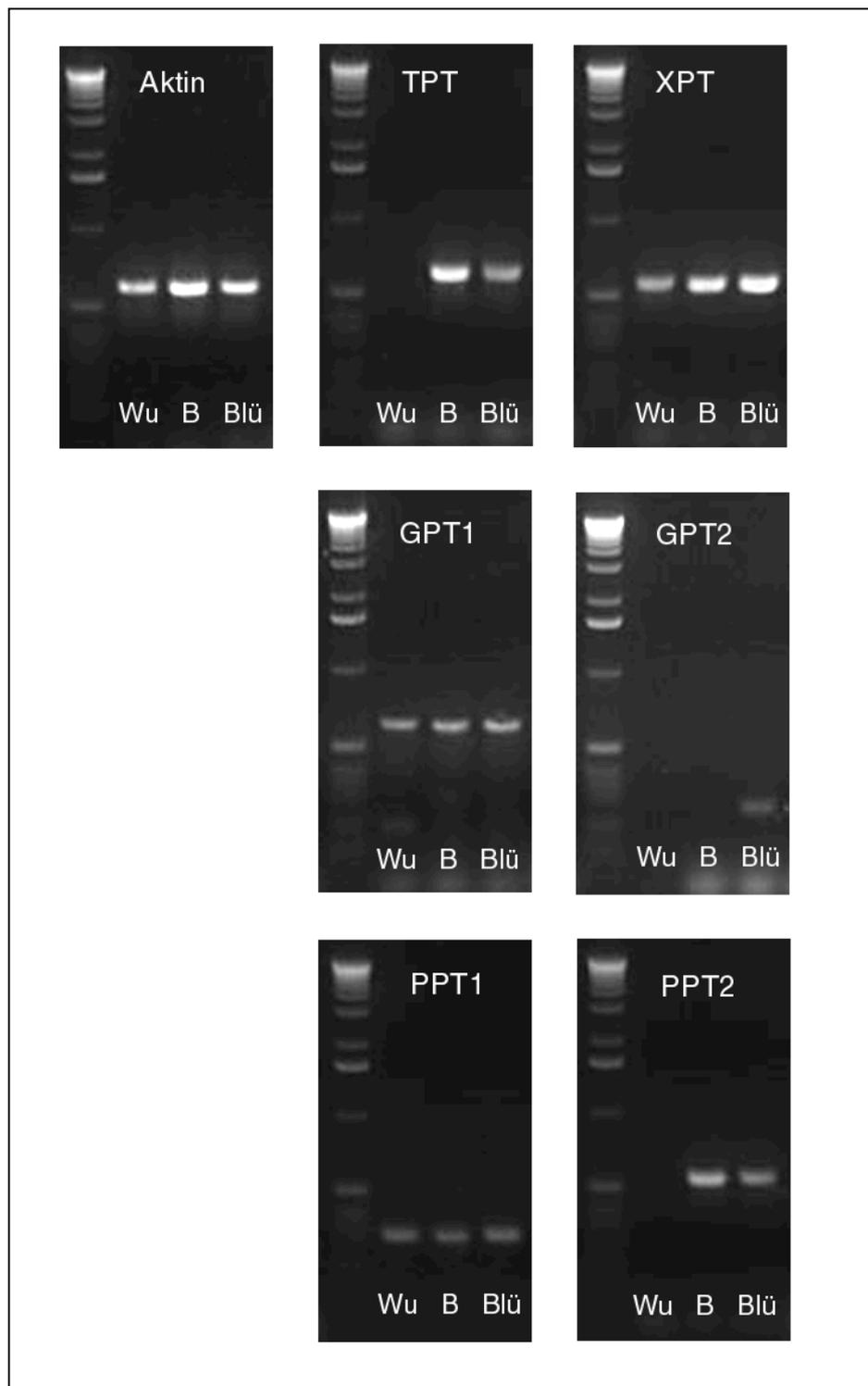


Abb.3.12: Agarosegele mit RT-PCR Produkten nach 40 Reaktionszyklen. Wu = Wurzel, B = Blatt, Blü = Blüte. Die Reaktion wurde mit dem LightCycler[®] (Roche) durchgeführt, der komplette Ansatz wurde aufgetragen (10 µl).

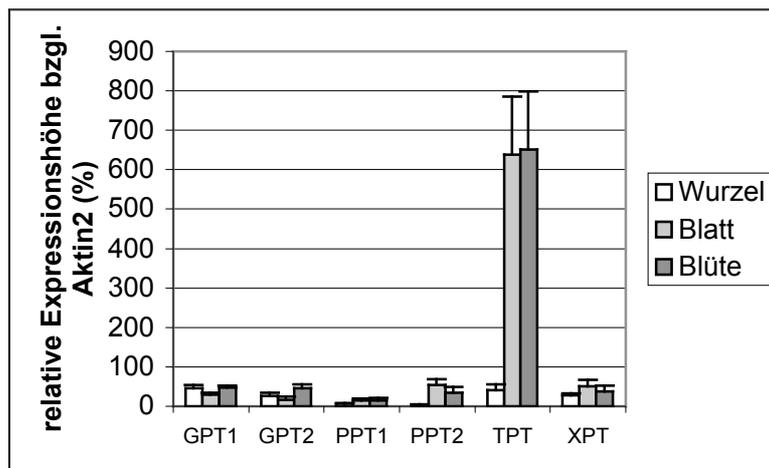


Abb. 3.13: LightCycler[®]-Experiment zur Expression der Phosphatranslokatoren. Die Ergebnisse stammen aus 4-6 unterschiedlichen Versuchen. Die Quantifizierung erfolgte mit der Standardgeraden-Methode. Die Höhe der Expression ist relativ zur Expression von *Aktin2* (=100 %) angegeben.

Das 18S rRNA ein zuverlässigerer interner Standard als *Aktin2* ist, geht aus den nachfolgend durchgeführten Messungen mit dem GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) hervor. In Abb.3.14 wurde wieder die Transkriptmenge der Phosphatranslokatoren bestimmt. Als interner Standard diente 18S rRNA. Da gleichzeitig die Aktintranskriptmenge bestimmt wurde, kann man deutlich sehen, dass diese im Vergleich zu 18S rRNA schwanken.

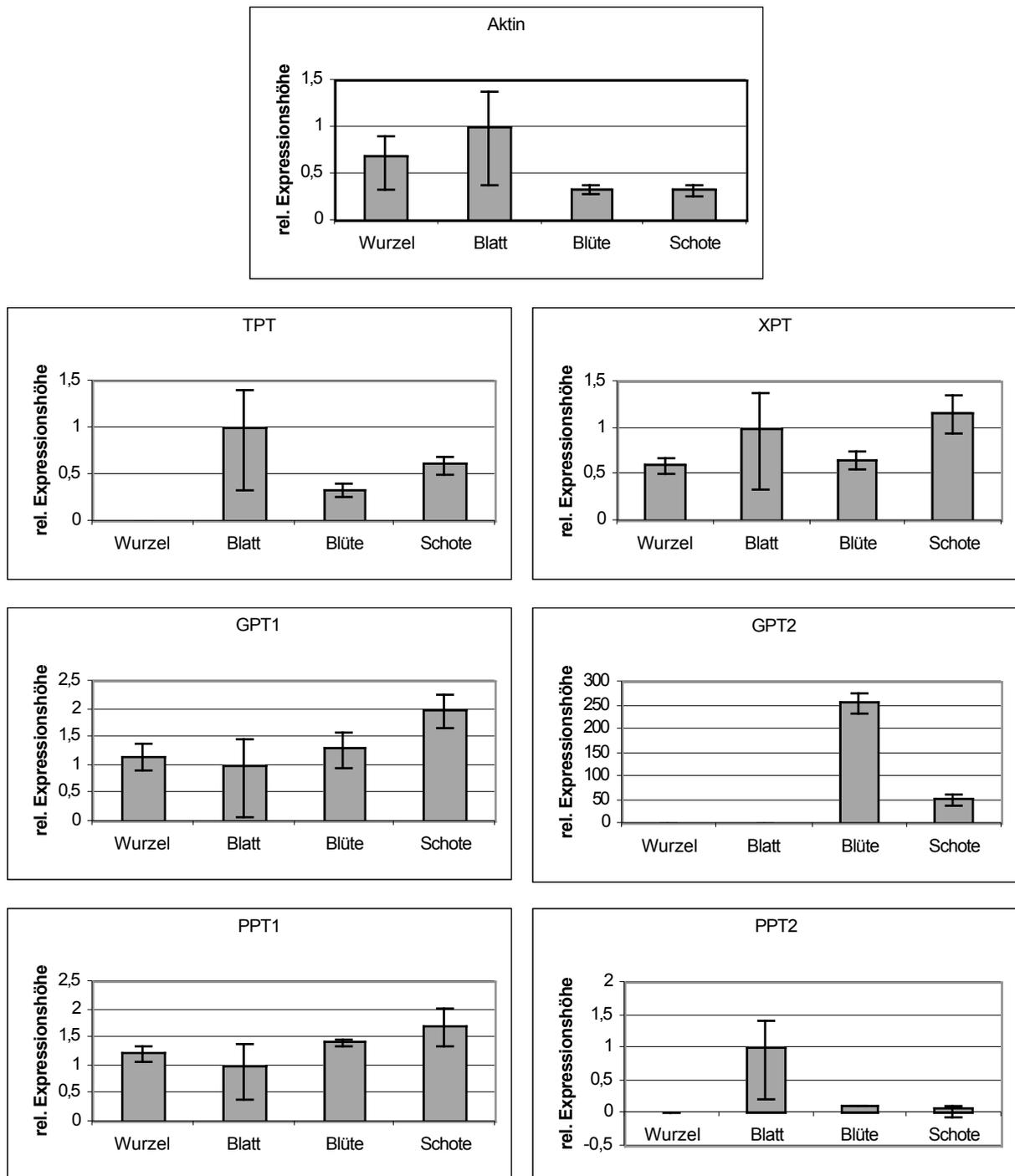
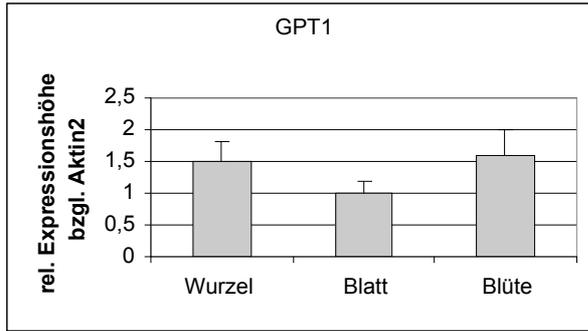
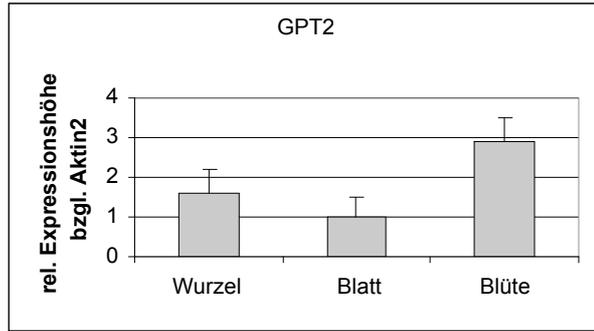


Abb. 3.14: Relative Expression der Phosphattranslokatorgene in verschiedenen Geweben von *A. thaliana*. Die Expressionshöhe wurde relativ zu Expression der 18S rRNA im entsprechenden Gewebe berechnet. Die Expression im Blatt wurde jeweils =1 gesetzt. Das Experiment wurde mit dem GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt.

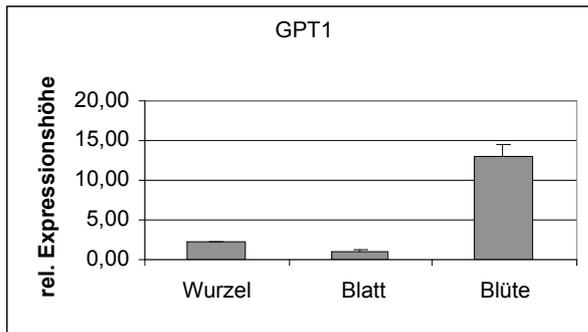
Ferner wurde untersucht, ob sich die Ergebnisse je nach verwendetem Gerät unterscheiden und ob die Quantifizierungsmethode (ΔΔCT oder Standardgeradenmethode) Auswirkungen auf die Bestimmung der Transkriptmengen hatte. Wenn man nur eine relative Quantifizierung durchführen will, also die Transkriptmenge eines Gens in verschiedenen Geweben im Vergleich zu einem Referenzgen (internem Standard) feststellen möchte, ist es einfacher, auf Standardgeraden zu verzichten und die sog. ΔΔC_t-Methode zur Errechnung der Expressionshöhe zu verwenden. Daher wurde getestet, ob die Ergebnisse bei dieser Methode denen der Standardgeradenmethode entsprachen. Außerdem wurden die Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Geräten erhalten wurden, miteinander verglichen. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurden die absoluten Werte, die mit der Standardgeradenmethode erhalten wurden, relativiert, d.h. bei allen Genen wurde die Expression im Blatt gleich eins gesetzt. Abb. 3.15 zeigt die Ergebnisse, die bei diesem Vergleich für die beiden *AtGPT*-Gene erhalten wurden. Die Resultate der unterschiedlichen RT-PCRs sind tendenziell ähnlich. Es fällt aber auf, dass die Spreizung der Werte für die Expression in verschiedenen Geweben bei den LightCycler[®]-Experimenten wesentlich geringer ausfällt, was besonders auffällig bei den *GPT2*-Transkriptmengen ist.



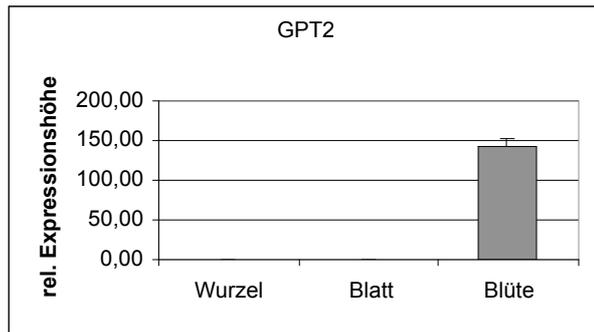
A: LightCycler



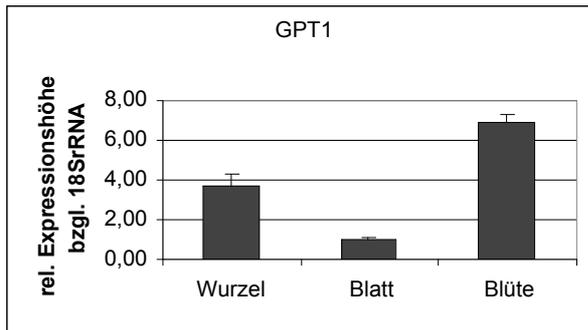
B: Lightcycler



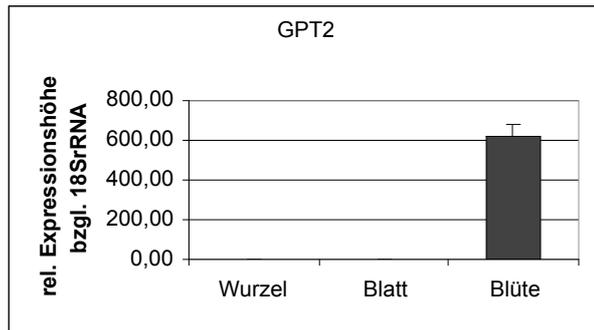
C: GeneAmp® 5700 SDS



D: GeneAmp® 5700 SDS



E: GeneAmp® 5700 ΔΔCt-Methode



F: GeneAmp® 5700 ΔΔCt-Methode

Abb. 3.15: Vergleich unterschiedlicher Geräte und Auswertungsmethoden für die relative Quantifizierung der Expression der *AtGPT* Gene in *Arabidopsis thaliana*. A, B: Gerät LightCycler®, relative Expression bezüglich *Aktin2*; C, D: Gerät GeneAmp® 5700, Auswertung nach der Standardgeradenmethode; E, F: Gerät GeneAmp® 5700, Auswertung nach der ΔΔCt-Methode, interner Standard = 18SrRNA; bei A-F wurde die Expression im Blatt jeweils gleich 1 gesetzt.

Insgesamt ergibt sich durch die *Northern-Blot* Analyse und die RT-PCR-Daten ein zusammenfassendes Bild von der Expression der sechs funktionellen plastidären PTs in *Arabidopsis thaliana* in den verschiedenen Gewebetypen. Tab. 3.7 zeigt schematisch die Transkriptmenge (von 0 = keine nachweisbaren Transkripte bis xxxx = hohe Transkriptmenge) an.

	<i>TPT</i>	<i>XPT</i>	<i>GPT1</i>	<i>GPT2</i>	<i>PPT1</i>	<i>PPT2</i>
Wurzel	0-x	x	x	0	x	0
Blatt	xxxx	xx	x	0	x	x-xx
Blüte	xxx	x-xx	x	x-xx	x	x
Schote	xxx	x-xx	x	x	x	x

Tab. 3.7: relative Transkriptmenge der Phosphattranslokatorgene in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis thaliana*. 0=keine Expression, XXXX=sehr starke Expression des Gens.

3.2.2. Wird *AtGPT1* in Schließzellen exprimiert?

In früheren Expressionsstudien wurde festgestellt, dass eine *GPT*-Expression häufig nur in heterotrophen Geweben zu finden ist, z.B. in Wurzeln, sich entwickelnden Maiskörnern, Kartoffelknollen und reproduktiven Organen (Kammerer et al., 1998). Transport von Glk6P wurde auch in isolierten Schließzellen gemessen (Overlach et al., 1993). Diesen fehlt, wie auch nicht-grünen Plastiden, eine Fruktose-1,6-bisphosphatase Aktivität (Hedrich et al., 1985), welche das Schlüsselenzym für die Umwandlung von Triosephosphaten in Hexosephosphate darstellt. Solche Gewebe sind auf den Import von Glk6P angewiesen, um Stärke synthetisieren zu können. In Schließzellen wird Stärke während der Öffnung der Stomata mobilisiert und in Malat umgewandelt, welches dann als Gegenion für Kalium verwendet wird.

Um festzustellen, ob die beobachtete Expression des *AtGPT1* in Blättern auf Expression des Gens in Schließzellen zurückzuführen ist, wurden RT-PCR Experimente mit angereicherter Schließzellen-RNA im Vergleich zu Gesamtblatt-RNA durchgeführt. Als Kontrolle für die Methode der Schließzellenisolation wurde gleichzeitig die Expression von *KAT1* aus *Arabidopsis thaliana* gemessen. Dieses Gen ist in Schließzellen um ein Vielfaches höher exprimiert als im Mesophyll (Nakamura et al., 1995). Die Transkriptmenge des *KAT1* ist insgesamt niedriger als die des *GPT1*. Im Vergleich zur *Aktin2* Expression wurde ein Anstieg der Transkriptmenge in Schließzellen gegenüber dem Gesamtblatt um 81% festgestellt. Die Expression des *GPT1* dagegen ist im Gesamtblatt nur wenig niedriger (25%) als in der Schließzellenfraktion (Abb. 3.16). Das *GPT1* RT-PCR- und *Northern-Blot* Signal stammt also sowohl aus Mesophyll als auch aus Schließzellen und ist nicht schließzellenspezifisch.

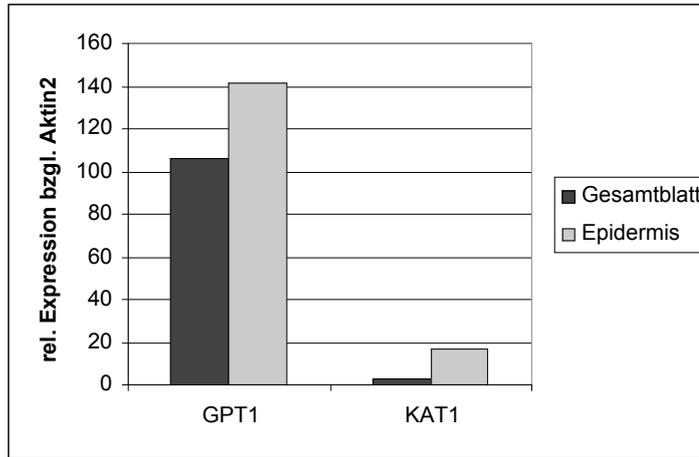


Abb. 3.16: relative Expressionshöhe der Gene GPT1 und KAT1 aus *A. thaliana* im Vergleich zur *Aktin2*-Expression in Gesamtblatt und angereicherten Schließzellen (Epidermis).

3.2.3. Tageszeitliche Variationen der *AtTPT*-Expression

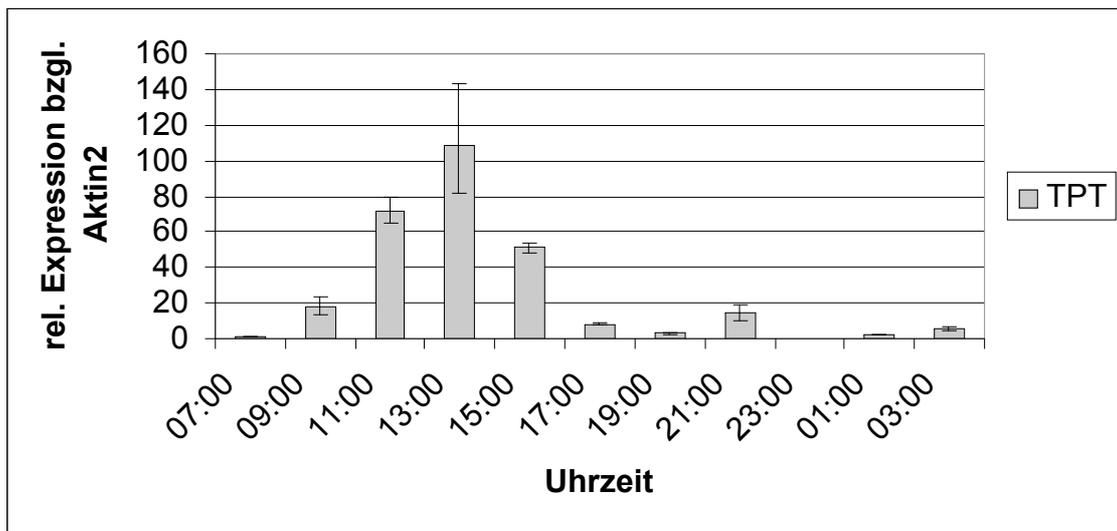


Abb. 3.17: Relative Expressionshöhe des *AtTPT* bzgl. *Aktin2*-Expression im tageszeitlichen Verlauf. Die RT-PCR wurde mit Blatt-RNA von ca. drei Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen durchgeführt. Die Pflanzen wurden 12 Stunden belichtet (8:00 Uhr - 20:00 Uhr).

Der TPT-Promotor enthält einige mögliche Lichtregulationselemente (Deterding, 1998), z. B. das I-Box Motiv, welches auch in dem für die kleine Untereinheit der RubisCO kodierenden *rbcS*-Gen vorkommt (Puente et al., 1996) sowie eine sog. H-Box; diese Sequenz ist als genereller Transkriptionsverstärker bekannt und in die Vermittlung der Induktion durch UV-Licht eingebunden (Block et al., 1990). Zusätzlich wurden mehrere mögliche Bindestellen für den Transkriptionsfaktor GT-1 identifiziert. Die Bindung von GT-1 ist häufig notwendig für eine

Transkriptionsaktivierung in lichtregulierten Genen (Gilmartin et al., 1990; Lübberstedt et al., 1994). Schulz et al. (1992) konnten über *Northern Blot* Analysen eine Lichtabhängigkeit für die Expression des Kartoffel-TPT-Gens nachweisen.

Die Expression des AtTPT ist im Dunkeln minimal (Abb. 3.17) und steigt nach Beginn der Belichtung kontinuierlich an, um ein Maximum nach ca. fünf Stunden zu erreichen. Obwohl die Lichtintensität gleich bleibend ist, reduziert sich die Expression danach wieder. Wahrscheinlich spielt bei der Regulation der Expression demnach auch ein tageszeitlicher Faktor eine Rolle.

3.2.4. Expression *PT*-homologer Gene

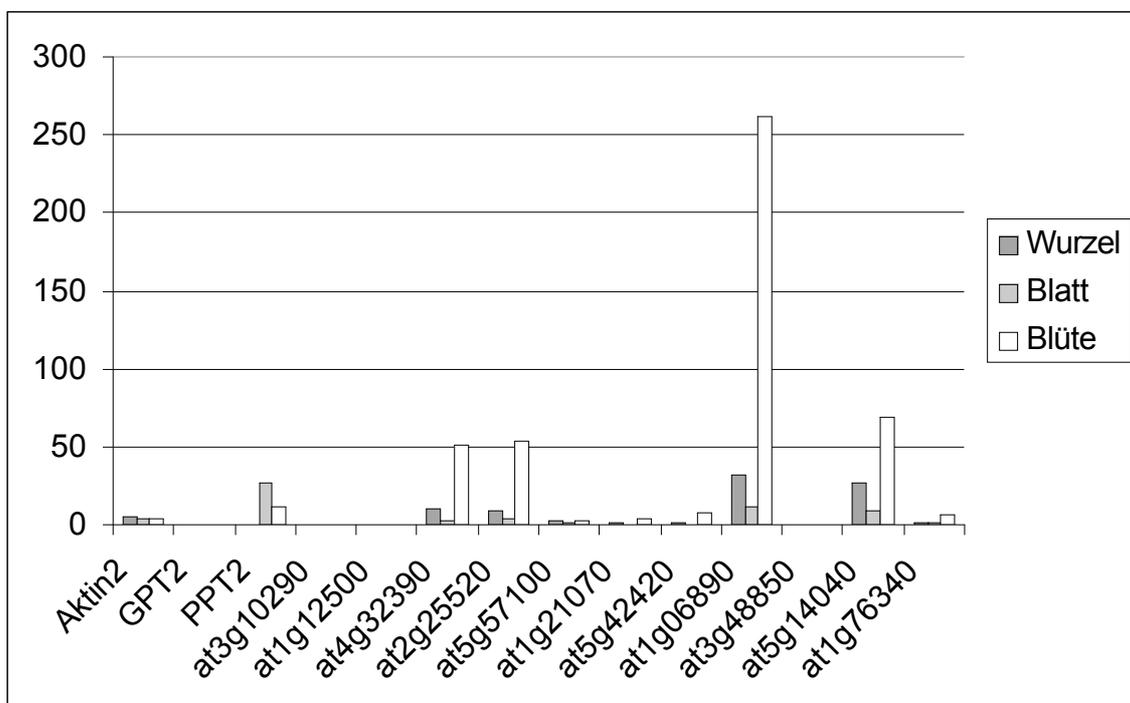


Abb. 3.18: Vergleich der Expression einiger *PT*-homologer Gene mit der Expression von *Aktin2*, *AtGPT2* und *AtPPT2*. Als Standard diente 18S rRNA. Das Experiment wurde mit dem GeneAmp[®] 5700 (Applied Biosystems) durchgeführt.

Für einige der *PT*-homologen Gene wurden ebenfalls RT-PCR-Experimente durchgeführt. Getestet wurde die Expression in Wurzeln, Blättern und Blüten von ca. vier Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

Zum Test der verwendeten cDNA wurde in der RT-PCR auch die Expression von *Aktin2* und *AtPPT2* untersucht. Während die *Aktin2*-Expression im Vergleich zur 18S rRNA relativ gleichmäßig in allen getesteten Geweben auftritt, lässt sich die *AtPPT2*-Expression erwartungsgemäß nur in Blättern und Blüten nachweisen.

Bei den beiden Genen aus der K/VAG-Gruppe (at3g10290 und at1g12500) ließen sich kaum Transkripte nachweisen.

Die Gene der KD-Gruppe (at4g32390 und 1t2g25520) zeigten ein ähnliches Expressionsmuster.

Von den vier untersuchten Genen der KT-Gruppe waren drei (at5g57100, at1g21070 und at5g42420) nur niedrig exprimiert. At1g06890 zeigte dagegen eine auffallend hohe Expression, besonders in der Blüte.

Bei einem putativen mitochondrialen Phosphattranslokatorgen (at3g48850) ließen sich keine Transkripte nachweisen, das andere (at5g48850) zeigte eine hohe Transkriptmenge in Wurzeln und Blüten. Das at1g76340-Gen aus der Transportprotein B - Gruppe ist ebenfalls niedrig exprimiert.

3.2.5. Promotor - Reporterfusionen der plastidären Phosphattranslokatoren

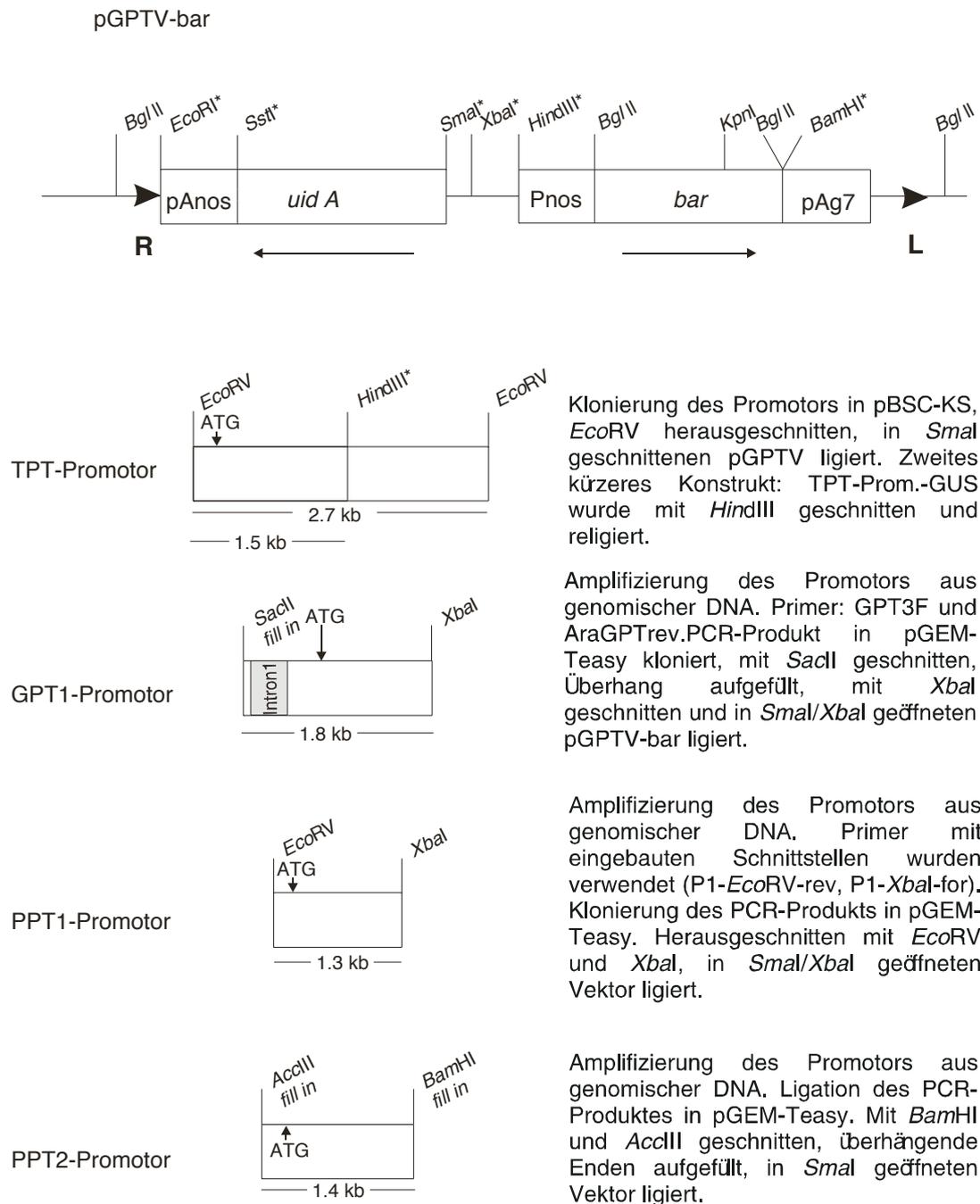
Durch die vollständige Sequenzierung des *Arabidopsis thaliana*-Genoms wurde es möglich, einen Überblick über die vorhandenen Phosphattranslokatorgene in der Gesamtsequenz zu erhalten. Wie oben ausgeführt, gibt es eine Vielzahl von PT-Genen, PT-Pseudogenen sowie homologen Sequenzen. Um das zeitliche und räumliche Expressionsmuster der verschiedenen Gene zu untersuchen, wurden zunächst Promotor-GUS-Fusionen der sechs plastidären PTs hergestellt, also jenen, die bekannte und bereits charakterisierte Funktionen in *Arabidopsis thaliana* und anderen Pflanzen haben.

Der Promotor des *TPT*-Gens in *Arabidopsis thaliana* wurde bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit isoliert, sequenziert und mit dem *uidA*-Gen fusioniert (Deterding, 1998). Es wurden zwei unterschiedlich lange Promotorfragmente mit dem Reporter gen fusioniert, einmal 1.5 kb, das zweite Fragment hatte eine Länge von 2.7 kb.

Für die Konstruktion der translationalen Promotor-GUS-Fusionen wurden die Promotorfragmente stets in den binären Vektor pGPTV-bar (Becker et al., 1992) kloniert. Dieser Vektor besitzt neben der linken und rechten Insertionssequenz des Ti-Plasmids und dem *bar*-Gen unter Kontrolle des *nos*-Promotors, welches Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin (BASTA) vermittelt, das für die β -Glucuronidase kodierende *uidA*-Gen und daran angrenzend einige nur einfach vorhandene Restriktionsschnittstellen (*Sma*I, *Xba*I, *Sal*I, *Hind*III).

Aus einer Durchmusterung einer genomischen *Arabidopsis thaliana* Bibliothek stammen die Klone Ag7.1 und Ag7.3. Beide hybridisieren mit einer Blumenkohl-*PPT*-Sonde und sind vermutlich zusammengehörende Fragmente aus einem Phagenklon, wie durch Sequenzierung gezeigt werden konnte (AF209210, *AtPPT1*).

Nach Veröffentlichung des *Arabidopsis thaliana*-Genoms wurde deutlich, dass es mindestens noch einen weiteren PPT in *Arabidopsis thaliana* gibt. Der Promotor dieses Gens (*AtPPT2*) wurde über PCR mit einer *Proofreading* DNA Polymerase (Pfx, Invitrogen) amplifiziert.



Klonierung des Promotors in pBSC-KS, *EcoRV* herausgeschnitten, in *SmaI* geschnittenen pGPTV ligiert. Zweites kürzeres Konstrukt: TPT-Prom.-GUS wurde mit *HindIII* geschnitten und religiert.

Amplifizierung des Promotors aus genomischer DNA. Primer: GPT3F und AraGPTrev.PCR-Produkt in pGEM-Teasy kloniert, mit *SacI* geschnitten, Überhang aufgefüllt, mit *XbaI* geschnitten und in *SmaI/XbaI* geöffneten pGPTV-bar ligiert.

Amplifizierung des Promotors aus genomischer DNA. Primer mit eingebauten Schnittstellen wurden verwendet (P1-*EcoRV*-rev, P1-*XbaI*-for). Klonierung des PCR-Produktes in pGEM-Teasy. Herausgeschnitten mit *EcoRV* und *XbaI*, in *SmaI/XbaI* geöffneten Vektor ligiert.

Amplifizierung des Promotors aus genomischer DNA. Ligation des PCR-Produktes in pGEM-Teasy. Mit *BamHI* und *AccII* geschnitten, überhängende Enden aufgefüllt, in *SmaI* geöffneten Vektor ligiert.

Abb.3.19: Klonierung von Phosphattranslokator-Promotoren in den Vektor pGPTV-bar (Becker et al., 1992). Es wurden jeweils translationale Fusionen mit dem *uidA*-Gen hergestellt. Die Klonierungsstrategien sind in der rechten Spalte kurz skizziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer finden sich im Anhang. R: *right border*, L: *left border*. Das "ATG" kennzeichnet den Translationsstart des entsprechenden Phosphattranslokatorgens. Das GPT1-Promotor-GUS Konstrukt enthält zusätzlich das erste Intron des Strukturgens.

Die beiden GPT-Promotoren (*AtGPT1* und *AtGPT2*) wurden ebenfalls über PCR mit genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* erhalten (Primer s. Anhang).

Abb. 3.19 gibt einen Überblick über die Klonierung der Promotorfragmente der vier genannten Gene. Die Länge der Promotoren lag zwischen 1.1 und 2.4 kb. Es wurden stets translationale Fusionen hergestellt, d.h. ein Stück der kodierenden Region (die Präsequenz und im Fall des *GPT1* auch noch das erste Intron und der Beginn des zweiten Exons) wurde im durchgängigen Leseraster mit dem *uidA*-Gen fusioniert.

Für den kürzlich entdeckten XPT existiert ebenfalls ein Promotor-GUS Konstrukt in pGPTV-bar (Eicks et al., 2002).

Als Kontrolle für die Durchführung der GUS-Färbung diente ein Konstrukt, welches das *uidA*-Gen hinter dem CaMV35S-Promotor enthielt (erhalten von B. Saal). Dieses Konstrukt wurde ebenfalls in *A. thaliana* Pflanzen transformiert. Bei Färbungsexperimenten wurde jeweils das entsprechende Gewebe der 35S-GUS-Pflanzen mit untersucht.

3.2.5.1. Expressionsmuster der *AtTPT*-Prom::GUS Pflanzen

Entsprechend seiner Funktion während der Photosynthese wurde erwartet, eine Expression des *TPT*-Prom::GUS Konstruktes vorwiegend in grünen Pflanzenteilen zu finden. Tatsächlich wurde in allen Entwicklungsstadien der Pflanzen stets eine gleichmäßige Färbung der Blätter beobachtet (Abb. 3.20 A). Die Kelchblätter (Sepalen) der Blüten, die chlorophyllhaltig sind, wiesen eine deutliche Blaufärbung auf, während die weißen Kronblätter (Petalen) nicht oder nur leicht gefärbt waren (Abb. 3.20 B). Im grünen Fruchtknoten der Blüte fand sich ebenso eine Expression des Konstruktes wie in den sich entwickelnden Schoten. Auch Samen, die anfangs noch grün sind, wurden bei Inkubation in Substratlösung blau (Abb. 3.20 C).

Gelegentlich konnte eine schwache Blaufärbung der Wurzelspitzen beobachtet werden (Abb. 3.20 D). Dies würde die schwache Expression des *TPT* in Wurzeln, die bei *Northern Blot* Analysen (Deterding, 1998) und RT-PCR Experimenten festgestellt wurde, bestätigen.

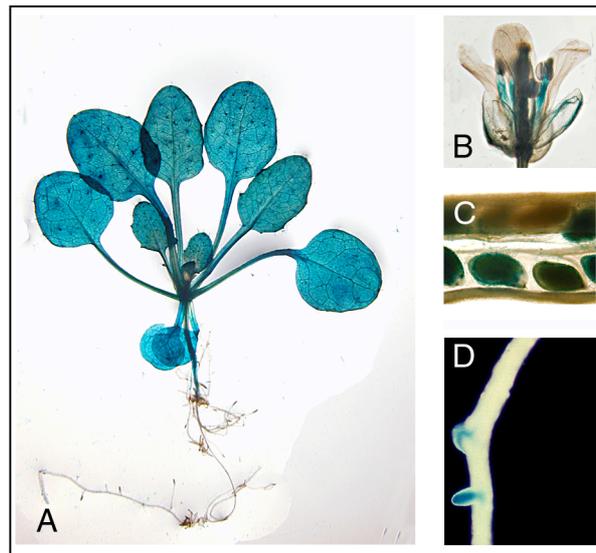


Abb. 3.20: GUS-Färbung von Pflanzen, welche ein *TPT*-Prom::GUS-Konstrukt exprimieren. A: ganze Pflanze, B: Blüte, C: aufgeschnittene Schote, D: Detail: Wurzel.

3.2.5.2. Expression des *AtGPT1*-Prom::GUS Konstruktes

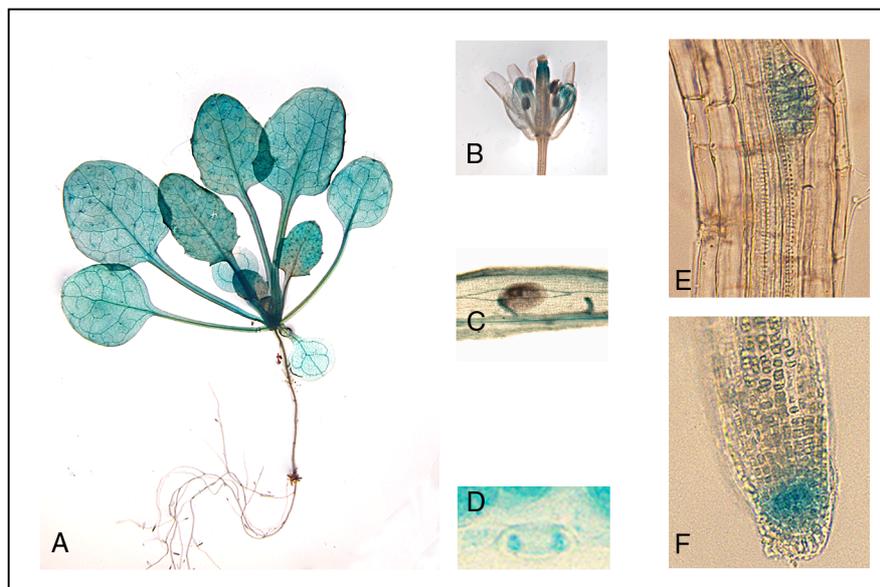


Abb. 3.21: GUS-Färbung von Pflanzen, welche ein *GPT1*-Prom::GUS-Konstrukt exprimieren. A: ganze Pflanze, B: Blüte, C: aufgeschnittene Schote, D: Detail: Schließzellen, E: Seitenwurzelsbildung, F: Wurzelspitze.

Das *AtGPT1*-Gen ist in allen Pflanzenorganen exprimiert (Abb. 3.21). Die Blätter sind gleichmäßig gefärbt (3.21 A), eine Färbung der Schließzellen konnte beobachtet werden (3.21 D). Die Blattfärbung ist jedoch nicht so intensiv wie bei *TPT*-Prom.:GUS Pflanzen (3.20) und tritt erst nach längerer Inkubation in Substratlösung auf. Die Regionen um die Leitbündel der Blätter werden dabei zuerst angefärbt, ehe sich die Färbung rasch im gesamten Blatt ausbreitet. In den Blüten beobachtet man am Pistill und in den Kelchblättern eine Blaufärbung (3.21 B). In den aufgeschnittenen Schoten sieht man, dass der *AtGPT1* hier hauptsächlich im Leitgewebe exprimiert wird. Außerdem sind die Funiculi gefärbt. In den Wurzeln ist der *AtGPT1* vor allem in Wurzelspitzen (Abb. 3.21 F) und sich entwickelnden Seitenwurzeln exprimiert (Abb. 3.21 E).

3.2.5.3. Lokalisation der Expression des *AtPPT1*

Für *AtPPT1* wurden weitere, detailliertere Studien durchgeführt. Dabei wurde zunächst das Expressionsmuster während der Entwicklung der Pflanze anhand in verschiedenen Stadien durchgeführter GUS-Färbungen untersucht (Abb. 3.22 A, B, C). Dabei zeigte sich, dass die Wurzel stets sehr stark gefärbt war. Der Ort der Färbung schien eine Gewebelage im Zentralzylinder der Wurzel zu sein. Weiterhin wurde das Expressionsmuster im Blatt untersucht. Während bei sehr jungen Pflanzen die Färbung ausschließlich in den Blattadern auftrat, zeigte sich bei etwas älteren Pflanzen (Abb. 3.22 B), dass die blaue Farbe bei nachfolgenden Blättern auch in das Mesophyll übergehen konnte und dann insgesamt schwächer ausgeprägt war (Abb. 3.22 C). Abb. 3.22 C zeigt die Blattrosette einer ca. fünf Wochen alten blühenden Pflanze, bei der nur die relativ jungen Blätter das ausgeprägte Expressionsmuster um die Leitbündel zeigen, bei älteren Blättern wird die Färbung insgesamt schwächer und geht mehr auf den Rest des Blattes über. Abb. 3.22 D zeigt eine Detailansicht auf ein Rosettenblatt. Hier sind zwar die Blattadern intensiv nachgezeichnet, jedoch sieht man in den angrenzenden Mesophyllzellen ebenfalls eine Färbung. Dies kann nicht auf Diffusion zurückzuführen sein, da das Konstrukt, wie erwähnt, das plastidäre Transitpeptid enthält. Daher ist die Blaufärbung in den Plastiden lokalisiert, wie man in Abb. 3.22 G erkennen kann, d. h. das Fusionsprotein wird größtenteils in die Plastiden transportiert und diffundiert nicht von Zelle zu Zelle. Um das Signal im Leitgewebe genauer lokalisieren zu können, wurden Mikrotomschnitte (10 µm) von gefärbten *PPT1*-Prom.:GUS Blättern angefertigt. Im Querschnitt (H) sind die Xylemgefäße als weiße ringartige Strukturen zu erkennen. Zwischen diesen Ringen, also im Xylemparenchym, erscheint die Färbung am intensivsten. In Blüten zeigen die Pollensäcke sowie die Narbe die stärkste Blaufärbung (Abb. 3.22 F). Aufgeschnittene Schoten waren ebenso wie die darin liegenden Samen gefärbt (Abb. 3.22 E).

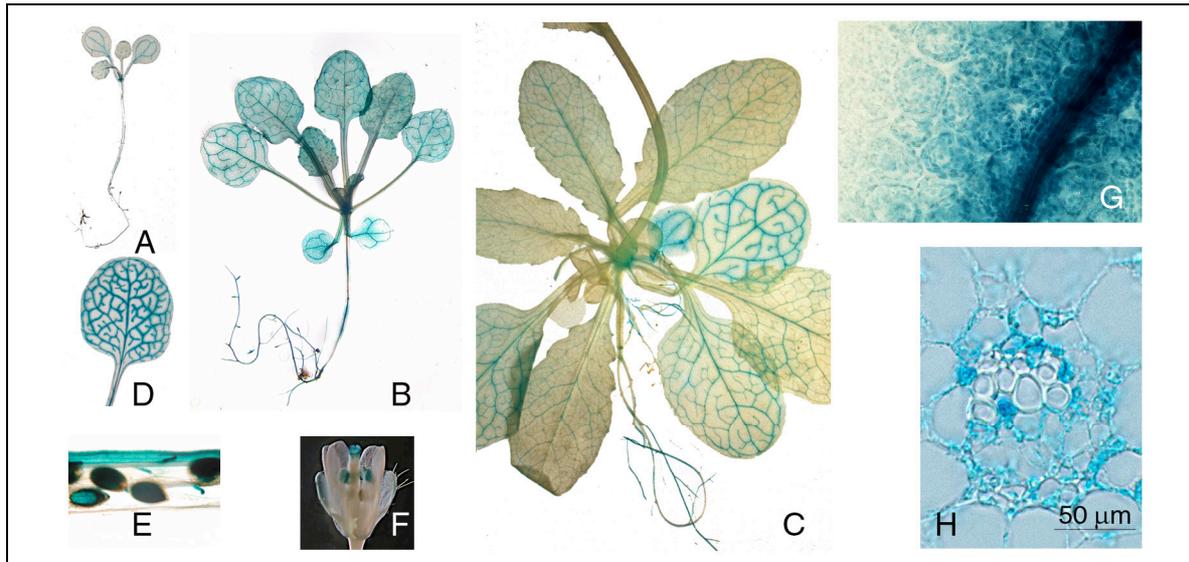


Abb. 3.22. *PPT1*-Prom::*GUS* Pflanzen. A: junge Pflanze, B: Rosette einer ca. 14 Tage alten Pflanze, C: Blattrosette einer blühenden Pflanze, D: Blatt, E: Schote, F: Blüte, G: Detail: Mesophyll mit Blattader, H: Mikrotomschnitt (10µm) eines *GUS*-gefärbten Blattes (Blattquerschnitt).

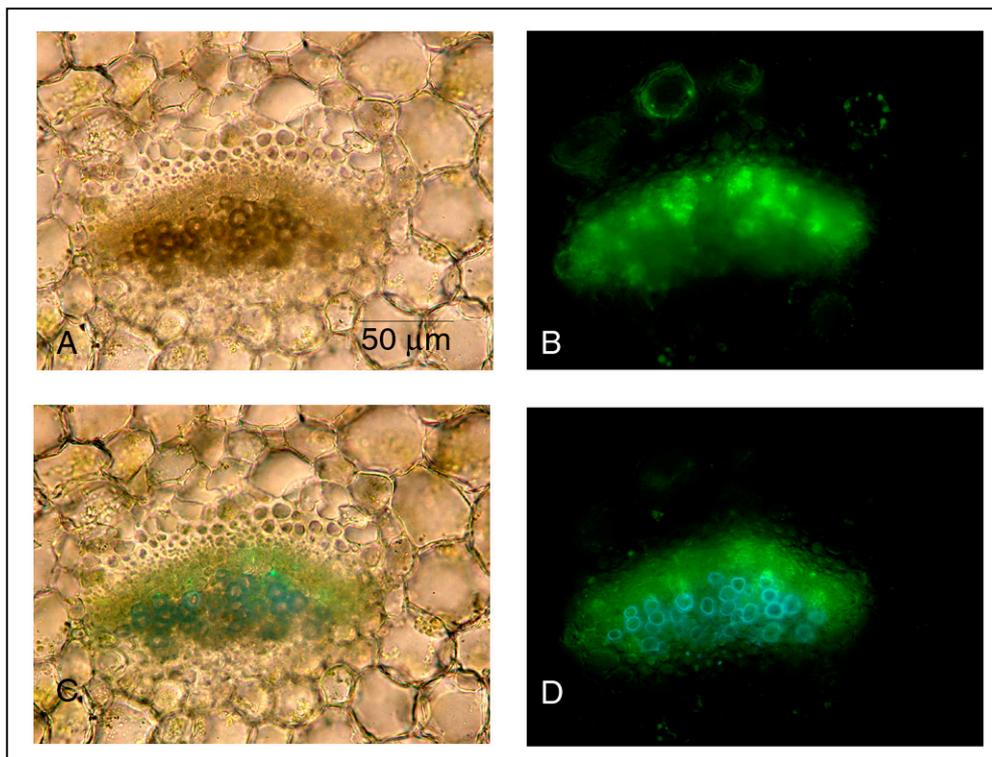


Abb. 3.23: Blattquerschnitt einer transgenen *PPT1*-Prom::*GFP* Pflanze. A: Durchlicht, B: GFP-Filter, C: Durchlicht mit UV-Filter, D: UV-Filter. Anregungs- und Detektionswellenlängen der Filter siehe Anhang.

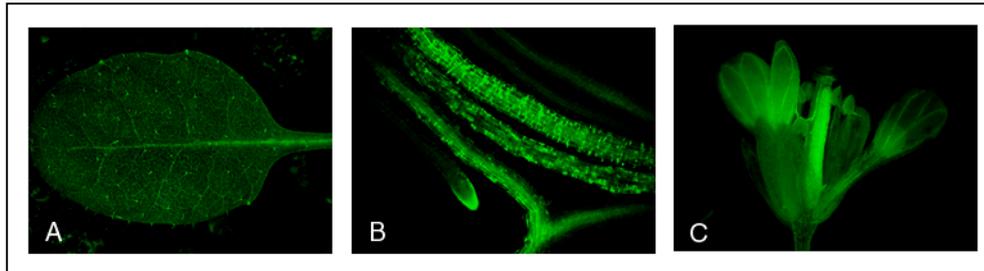


Abb. 3.24: Detektion der GFP-Fluoreszenz in transgenen Pflanzen, die eine *PPT1*-Prom-mGFP5-ER Fusion exprimieren. A: Rosettenblatt, Aufsicht, B: Wurzeln, C: Blüte.

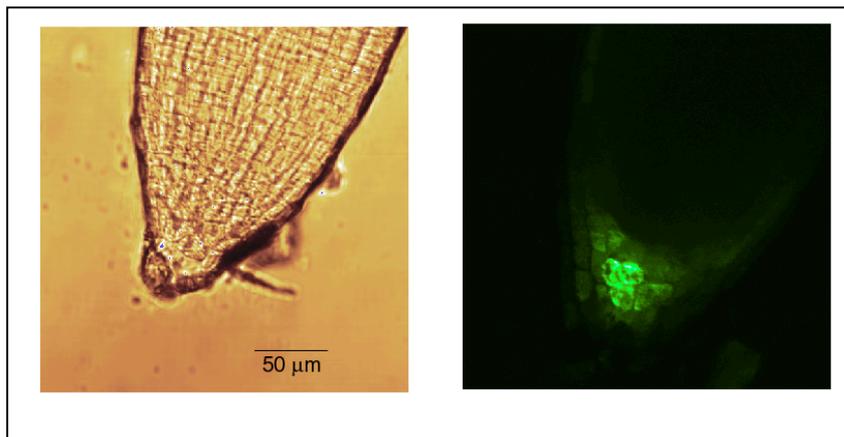


Abb. 3.25: Wurzelspitze einer *PPT1*-Prom::*GFP* Pflanze. Links dargestellt ist eine Durchlicht-Aufnahme der Wurzel, rechts ein konfokales Bild der GFP-Fluoreszenz.

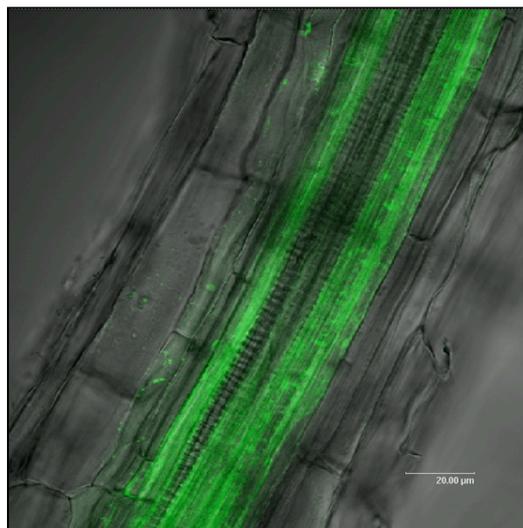


Abb. 3.26: Bildüberlagerung einer Wurzelaufnahme von einer transgenen *PPT1*-Prom::*GFP* Pflanze. Durchlichtbild und konfokales Bild (GFP-Detektion) wurden übereinander gelegt.

Um genauere Untersuchungen bezüglich der Lokalisation des PPT1 durchführen zu können, wurde zusätzlich ein *PPT1*-Promotor-GFP-Konstrukt hergestellt (Durchführung der Klonierung: Hildegard Lender). Dazu wurde der Promotor mit spezifischen Oligonukleotiden (siehe Anhang), die eingebaute Schnittstellen enthielten (*Bam*HI, *Hind*III), amplifiziert und in den Vektor pBIN-mGFP5-ER, aus dem zuvor der 35S-Promotor entfernt wurde, gerichtet über die *Bam*HI und *Hind*III Schnittstellen des Vektors eingefügt. Das Konstrukt wurde in *A. thaliana* transformiert, und transgene, Kanamycin resistente Pflanzen wurden anschließend analysiert. Um einen ersten Überblick über die Expression des Transgens zu erhalten, wurden die *PPT1*-Prom::GFP Pflanzen unter einem Fluoreszenzbinokular betrachtet. Hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie in den *PPT1*-Prom::GUS Pflanzen: die Fluoreszenz war sehr stark in den Wurzeln (Abb. 3.24 B). In den Blättern ist das Signal in Blattadern am stärksten (Abb. 3.24 A). Auch in den Blütenblättern konnte man starke Fluoreszenz im Leitgewebe erkennen (Abb. 3.24 C).

Beim Vergleich der unterschiedlichen Reportergene (GUS oder GFP) wird deutlich, dass ein Vorteil des GFP-Konstruktes darin liegt, dass keine Limitierung durch die Substratzugänglichkeit auftritt. Beispielsweise wurde eine starke Fluoreszenz im Stempel der Blüte beobachtet (Abb. 3.24 C). Die GUS-gefärbte Blüte zeigte jedoch nur an der Narbe eine Blaufärbung (3.22 F). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass das Gewebe hier zu dick war und das Substrat X-Gluc daher nicht in die Zellen eindringen konnte, in denen die β -Glucuronidase exprimiert wird.

Ein Ziel dieser GFP-Fusion war es, das Signal im Leitgewebe genauer lokalisieren zu können. Dazu wurde die konfokale Lasermikroskopie angewandt. Es stellte sich jedoch heraus, dass das Signal zu tief ($> 200 \mu\text{m}$) im Blatt lag, als dass man es in der Aufsicht hätte detektieren können. Ein zusätzliches Problem stellte die Autofluoreszenz des Chlorophylls dar, welche das GFP-Signal überlagerte.

Um trotzdem Aussagen über die Lage des Signals innerhalb des Leitbündels treffen zu können, wurden Blattquerschnitte angefertigt. Abb. 3.23 zeigt ein Mittelrippen-Blattleitbündel, Abb. 3.23 A stellt eine normale Durchlichtaufnahme dar, Abb. 3.23 B eine Aufnahme mit GFP-Filter, Abb. 3.23 C eine Durchlichtaufnahme mit zugeschaltetem UV Filter, Abb. 3.23 D eine Fluoreszenzaufnahme mit UV-Filter. Die Xylemgefäße erscheinen unter UV-Licht aufgrund der Fluoreszenz eingelagerter Sekundärstoffe blau. Dies ermöglicht eine Positionsbestimmung des GFP-Signals in der Leitgeweberegion. Man erkennt, dass einzelne Zellen innerhalb des Leitgewebes sehr stark fluoreszieren. Dies sind einmal Zellen zwischen den Xylemelementen, aber auch Zellen, die oberhalb des Xylems (abaxial) liegen. Außerdem erscheinen einige Mesophyllzellen außerhalb des Leitbündels ebenfalls grün fluoreszierend.

In der Wurzel war die Lokalisation der GFP-Fluoreszenz einfacher und auch mit dem konfokalen Lasermikroskop möglich, da das Gewebe dünner und nicht chlorophyllhaltig war. In Wurzelspitzen konnte Fluoreszenz in der Kalyptra detektiert werden (Abb. 3.25).

In der Abb. 3.26 ist die Seitenansicht einer Wurzel gezeigt. Als dunkle, quergestreifte Struktur erkennt man die Wandverdickungen eines Xylemgefäßes. Unmittelbar zu beiden Seiten daran angrenzend ist die GFP-Fluoreszenz zu beobachten. Granuläre Strukturen innerhalb der Zellen, die stark leuchten, könnten Plastiden darstellen. Eine genaue Bestimmung des Zelltyps ist durch diese Aufnahme nicht möglich.

3.2.5.4. Expression des *AtPPT2*-Prom::*GUS*-Konstruktes

Die *PPT2*-Prom.-*GUS*-Fusion wird in allen Organen der Pflanze außer der Wurzel exprimiert (Abb. 3.27). Die gesamte Blattspreite erscheint gefärbt (3.27 A). Wenn man sich die Blätter näher ansieht, stellt man fest, dass häufig die Stellen, an denen Trichome sitzen, besonders intensiv gefärbt sind (Abb. 3.27 D). Sowohl Kelch- als auch Blütenblätter zeigen eine Expression des Reportergens, die Stamina und die Narbe sind ebenfalls blau gefärbt (Abb. 3.27 B). Während die aufgeschnittene Schote in Abb. 3.27 C eine Blaufärbung zeigt, bleiben die innen liegenden Samen ungefärbt. In Wurzeln war selbst nach Inkubation über Nacht keine Färbung festzustellen.

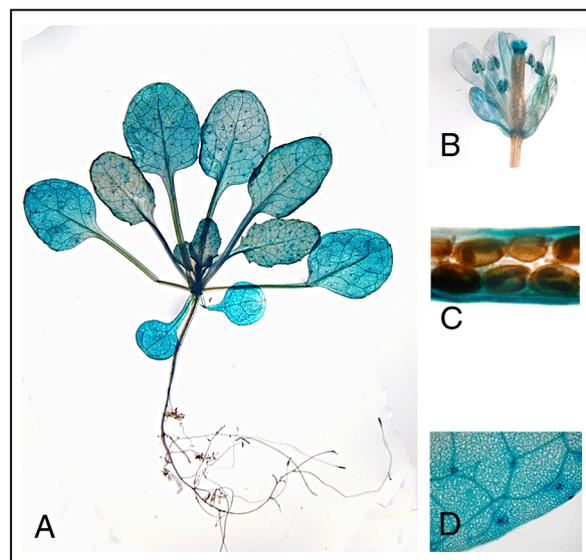


Abb. 3.27: *PPT2*-Prom::*GUS* Pflanzen. A: ganze Pflanze, B: Blüte, C: Schote, D: Detail eines Blattes.

3.3. Funktionelle Charakterisierung der PTs

3.3.1. Heterologe Expression der plastidären Phosphattranslokatoren in *Escherichia coli*

Um Aufschlüsse über die Funktion eines Proteins zu erhalten, ist es sinnvoll, nicht nur Informationen über die Expression des Gens zu erhalten, sondern auch das Protein nachweisen zu können. In der Regel verwendet man für diese Zwecke Antikörper, die gegen ein in großen Mengen angezogenes und gereinigtes rekombinantes Protein gerichtet sind. Eine andere Möglichkeit besteht darin, das Protein direkt aus der Pflanze heraus zu reinigen. Dies setzt jedoch normalerweise voraus, dass das betreffende Protein einen erheblichen Anteil am Gesamtproteingehalt bildet.

Die Phosphattranslokatoren sind Proteine mit sechs bis neun Membranspannen. Eine Expression dieser Proteine in Hefe wurde mehrfach erfolgreich durchgeführt (Eicks et al., 2002; Kammerer et al., 1998). Die daraus gewonnenen rekombinanten Proteine wurden für Transportstudien eingesetzt. Ihre Menge war jedoch nicht ausreichend für eine Immunisierung.

In dieser Arbeit wurde daher nach alternativen Systemen gesucht, um eine ausreichende Mengen an Protein für eine Immunisierung zu produzieren. Lösliche Proteine können schon lange erfolgreich in Bakterien wie *E. coli* oder *B. subtilis* exprimiert werden (Itakura et al., 1977). Die Expression von eukaryotischen Membranproteinen gestaltet sich schwieriger. Da Bakterien keine subzellulären Membranen besitzen, werden Proteine, die normalerweise in der Plasmamembran oder Endomembranen eukaryotischer Zellen sitzen, in die Plasmamembran der Bakterien integriert. Wenn es sich bei dem integrierten Protein um einen Transporter handelt, kann die Aktivität des fremden Proteins toxisch für die Bakterien sein und im Extremfall zur Lyse derselben führen. Daher sind wenige Beispiele für eine funktionelle Expression eukaryotischer Membranproteine in *E. coli* bekannt. Bibi et al. (1995) exprimierten beispielsweise ein *multidrug-resistance* Protein aus Maus, und Uozumi et al. (1998) komplementierten durch die Expression des KAT1 aus *A. thaliana* eine *E. coli*-Mutante, die einen Defekt in der K⁺-Aufnahme besaß. Es gibt Strategien, die eine Expression in *E. coli* trotz der oben geschilderten Schwierigkeiten möglich machen sollen. Dazu zählt die Fusion des Proteins von Interesse mit einem großen, löslichen Protein. So soll verhindert werden, dass das Fusionsprotein in die Plasmamembran integriert; außerdem werden exprimierte Peptide so stabilisiert. Beispiele hierfür stellen Fusionsproteine mit DHFR und dem Maltose-Bindeprotein (MBP) aus *E. coli* dar (Iwakura et al., 1992; Riggs, 2000). Daher wurden die Phosphattranslokatoren bzw. PT-Fragmente für Expressionsversuche mit diesen Proteinen fusioniert.

3.3.1.1. Klonierung der PTs in pMAL-c2 (NEB)

Die Präsequenz der Vollängen cDNA des *AtTPT*, *AtGPT1* und des *AtXPT* wurde jeweils entfernt und das verbleibende Fragment translational hinter das Maltosebindeprotein fusioniert.

Folgende Klonierungsstrategien wurden verwendet:

<i>AtTPT</i> :	<i>Bgl</i> II aufgefüllt, <i>Pst</i> I	pMAL-c2: <i>Eco</i> RI aufgefüllt, <i>Pst</i> I
<i>AtGPT1</i> :	<i>Hind</i> III aufgefüllt, <i>Pst</i> I	pMAL-c2: <i>Eco</i> RI, aufgefüllt, <i>Pst</i> I
<i>AtXPT</i> :	<i>Xho</i> I aufgefüllt, <i>Sal</i> I	pMAL-c2: <i>Xmn</i> I, <i>Sal</i> I

Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft und anschließend in *E. coli* TG1-Zellen transformiert. Es wurden Zeitreihen mit unterschiedlichen Wachstumszeiten (20 min bis 5 h) und Temperaturen (28 °C und 37 °C) nach Induktion der Proteinexpression durchgeführt.

Bei allen durchgeführten Versuchen nahm jedoch die gemessene OD₆₀₀ nach dem Zeitpunkt der Induktion stetig ab. Es ist zu vermuten, dass die Integration der Proteine in die Zellmembran auch durch die Fusion mit dem MBP nicht verhindert werden konnte und es so zu einer Lyse der Zellen kam. Abb. 3.28 zeigt einen Westernblot von aufgearbeiteten Zellen, die zwei Stunden nach Induktion geerntet wurden.

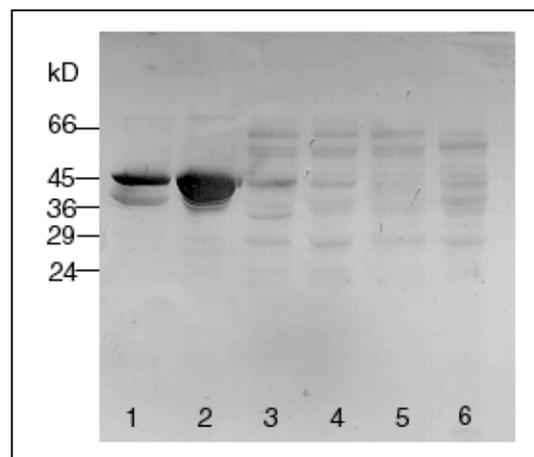


Abb. 3.28: Expression von MBP-PT Fusionsproteinen. 1: pMAL-c2 leer, nicht induziert, 2: pMAL-c2 induziert, 3: GPT1-pMAL in TG1-Zellen, induziert, 4: GPT1-pMAL in ER2508-Zellen, induziert, 5: XPT-pMAL in ER2508-Zellen, induziert, 6: TPT-pMAL in ER3508-Zellen, induziert. Nach Induktion wurden die Zellen für 2 h unter Schütteln bei 28 °C inkubiert. 1. Ak: Anti-MBP, 2. Ak: AP-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper.

Um die Anzahl der Membranspannen innerhalb der Fusionproteine zu reduzieren ohne vollständig neue Klonierungen durchführen zu müssen, wurden die vorhandenen Konstrukte auf folgende Weise verkürzt:

pMAL-c2-TPT: *NcoI*, Religation
pMAL-c2-GPT: *XhoI/HindIII*, aufgefüllt, Religation
pMAL-c2-XPT: *PstI*, Religation

Wieder wurden die Konstrukte in TG1-Zellen transformiert und verschiedene Klone auf die Höhe der Proteinexpression hin getestet.

3.3.1.2. Gewinnung eines AtXPT-Antikörpers

Ausschließlich bei dem verkürzten XPTpMAL-Konstrukt ließen sich hohe Mengen an Protein exprimieren. Insgesamt wurden zwei Liter *E. coli* angezogen und induziert. Das Bakteriensediment wurde aufgearbeitet und über Amyloseaffinitätschromatographie gereinigt. Zur Immunisierung eines Kaninchens wurden insgesamt ca. 300 µg Protein verwendet. Das erhaltene Serum wurde auf seine Spezifität getestet. Da es mit dem gereinigten, His-Tag versehenem XPT-Protein reagierte, wurden weitere Tests durchgeführt, um festzustellen, ob Kreuzreaktionen mit den nahe verwandten GPT-Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* auftreten. Dazu wurden die in Hefe exprimierten, gereinigten Proteine verwendet (Abb. 3.31).

Das Antiserum reagierte nur mit dem gereinigten XPT spezifisch. Zwar sieht man auch in den Spuren A 2 und 3 Banden, diese entsprechen jedoch nicht der Größe der GPT-Proteine (siehe Abb. 3.31 C 2 und 3). Die Reinigung und Konzentrierung des Antiserums zwecks weiterer Verwendung zur Lokalisierung des XPT-Proteins in Pflanzen wird z. Zt durchgeführt.

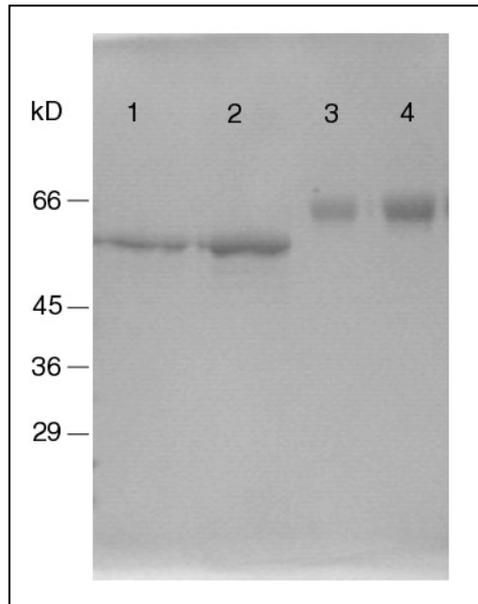


Abb. 3.29: SDS-Polyacrylamidgel zur Mengenbestimmung des gereinigten XPTpMAL-k Proteins. 1: 10 µl Extrakt, 2: 20 µl Extrakt, 3: 1 µg BSA, 4: 2 µg BSA.

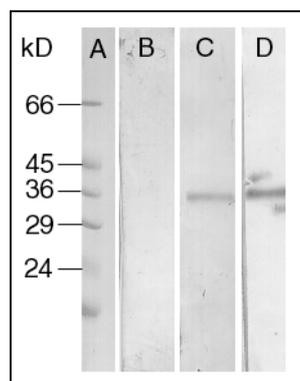


Abb. 3.30: Test des anti-XPTpMAL-k Antiserums aus Kaninchen. Western Blot. A: kD-Marker, B: gereinigtes XPT-Protein inkubiert mit Präimmunserum, C: gereinigtes XPT-Protein inkubiert mit anti-XPTpMAL-k Antiserum, D: gereinigtes XPT-Protein inkubiert mit anti-His Antikörper. (Detektion in B und C mit Anti-Kaninchen IgG-Antiserum aus Ziege mit gekoppelter alkalischer Phosphatase, in D mit Anti-Maus IgG mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase)

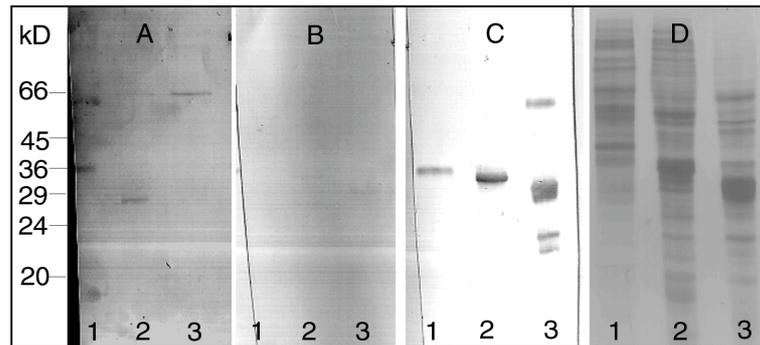


Abb. 3.31: Test des XPT-Antikörpers. 1: XPT-His, 2: GPT1-His, 3: GPT2-His. Blot A: 1. Ak Anti-XPT, 2. Ak Anti-Kaninchen. Blot B: 1. Präimmunserum, 2. Ak Anti-Kaninchen. Blot C: 1. Ak Anti-penta-His, 2. Ak Anti-Maus, D: Silberfärbung des korrespondierenden SDS-Polyacrylamidgels. Die 2. Ak waren jeweils an Alkalische Phosphatase gekoppelt.

3.3.1.3. Expression eines *AtGPT1*-PCR-Konstruktes

Da die hydrophoben Bereiche der Phosphattranslokatoren offensichtlich für die Schwierigkeiten bei der Expression in Bakterienzellen verantwortlich waren, wurde versucht, ein Peptid/Protein herzustellen, welches keine membrandurchspannenden Bereiche enthielt (Abb. 3.32). Dazu wurde für GPT1 ein PCR-*overlap*-Konstrukt hergestellt, das den N-Terminus des Proteins enthielt. Dieser wurde fusioniert mit der hydrophilen Schlaufe zwischen den Membranspannen IV und V (nach HMMTOP-Vorhersage). Daran anschließend folgte der C-Terminus des GPT-Proteins. Weil das Peptid insgesamt nur aus 76 Aminosäuren bestand, wurde es im Vektor pQE41 (Qiagen) C-terminal mit DHFR fusioniert, um die Stabilität des Expressionsproduktes zu erhöhen. Der pQE41 Vektor enthält außerdem einen His-Tag, der die Möglichkeit der Reinigung des Fusionsproteins über Ni^{2+} -NTA-Agarose eröffnet.

Das Konstrukt wurde in TG1 und ER2508 Zellen transformiert. Das Fusionsprotein ließ sich exprimieren, ohne dass das Wachstum der Zellen nach Induktion der Expression zu beeinträchtigen. Allerdings war die Ausbeute sehr gering, so dass auf eine Anzucht im großen Maßstab verzichtet wurde.

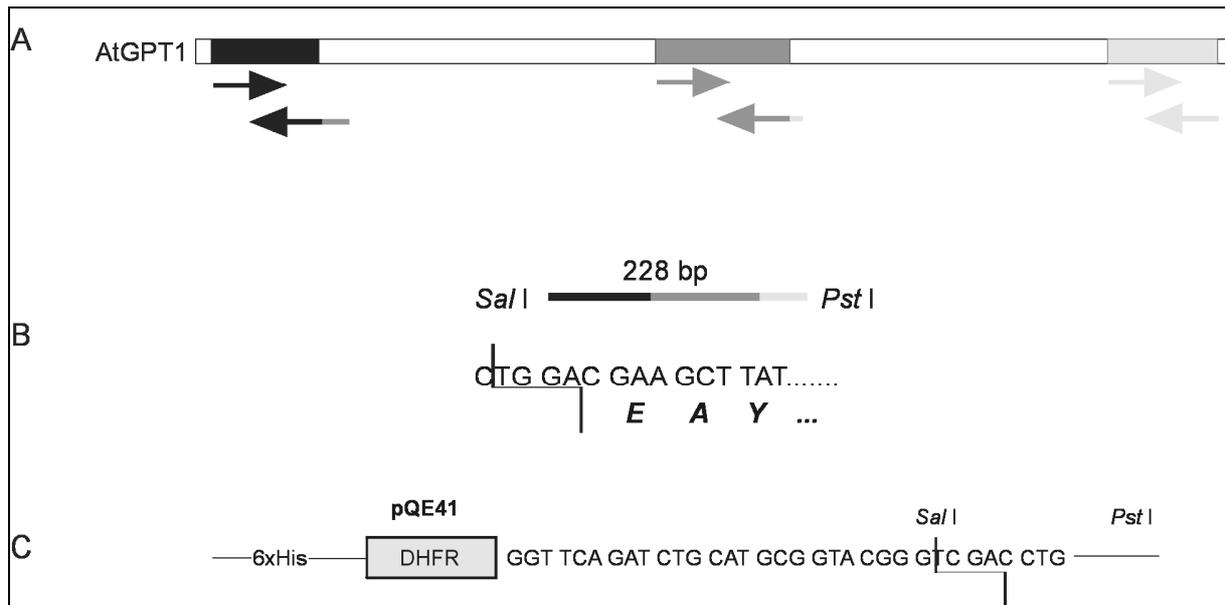


Abb. 3.32: Klonierung eines AtGPT1 *overlap*-Konstruktes ohne Transmembranspannen. A: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie. In der unteren Zeile sind die durch spezifische Oligonukleotide amplifizierten Regionen (N-Terminus, *Loop* zw. Membranspannen IV und V, C-Terminus) dargestellt; B: PCR-Fusion der drei Fragmente, C: für die *Sal*I/*Pst*I-Klonierung verwendeter Vektor pQE41.

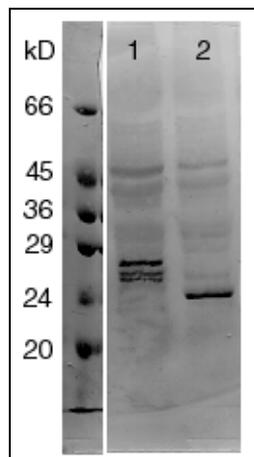


Abb. 3.33: Expression des AtGPT1-DHFR Fusionsproteins, Western-Blot. Spur 1: Fusionsprotein, Spur 2: DHFR. Inkubation mit anti-penta-His-Antikörper, 2. Ak AP-anti Maus.

3.3.2. Heterologe Expression der *AtGPTs* in *Saccharomyces cerevisiae*

Um die Substratspezifitäten der beiden GPT-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* näher zu charakterisieren und um festzustellen, ob der GPT2 für die gemessene Aktivität in Blüten verantwortlich sein kann, wurden die Gene in einen Hefe-Expressionsvektor kloniert (pYES2/NT). Mit den gereinigten rekombinanten Proteinen wurden Transportexperimente durchgeführt.

3.3.2.1. Herstellung der *AtGPT*-pYES/NT2-Konstrukte und Transportmessungen

Die cDNA des *GPT1* wurde durch eine Durchmusterung einer cDNA-Phagenbank von vier Wochen alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen isoliert. Als Sonde diente ein cDNA-Fragment des *GPT* aus Blumenkohl (*Brassica oleracea*) (Kammerer et al., 1998). Es wurde ein 1400 bp langes Vollängeninsert isoliert und sequenziert (AF233658). Für die Expression in Hefe wurde die Präsequenz, die zur Lokalisation des Proteins in den Plastiden führt, entfernt. Die *GPT1* cDNA wurde mit *PvuI* geschnitten, der 3'-Überhang wurde mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase entfernt, am 3'-Ende wurde mit *EcoRI* geschnitten. Das Fragment wurde in pYES/NT2-C ligiert; der Vektor wurde zuvor mit *BamHI* geschnitten, der 5'-Überhang wurde aufgefüllt, anschließend wurde mit *EcoRI* geschnitten.

Für die Gewinnung des *GPT2* wurden genspezifische Oligonukleotide hergestellt (G2for1 und G2rev1, Sequenz siehe Anhang). Mit diesen wurde eine RT-PCR mit RNA aus *Arabidopsis thaliana* Blüten durchgeführt, weil frühere RT-PCR Ergebnisse darauf hindeuteten, dass *GPT2* nur in Blüten und Schoten exprimiert ist. Das 1232 bp lange PCR-Fragment wurde in den Vektor pGEM-Teasy kloniert und teilweise sequenziert. Auch hier wurde für die Klonierung in den Hefevektor die Präsequenz entfernt. Die Enzyme der Klonierungsstrategie entsprachen jenen für die *GPT1*-pYES Ligation, nur wurde hier pYES/NT2-A verwendet.

Nach Transformation der Vektoren in *S. cerevisiae* wurden verschiedene Klone daraufhin untersucht, ob sie das Phosphattranslokatorgen exprimieren.

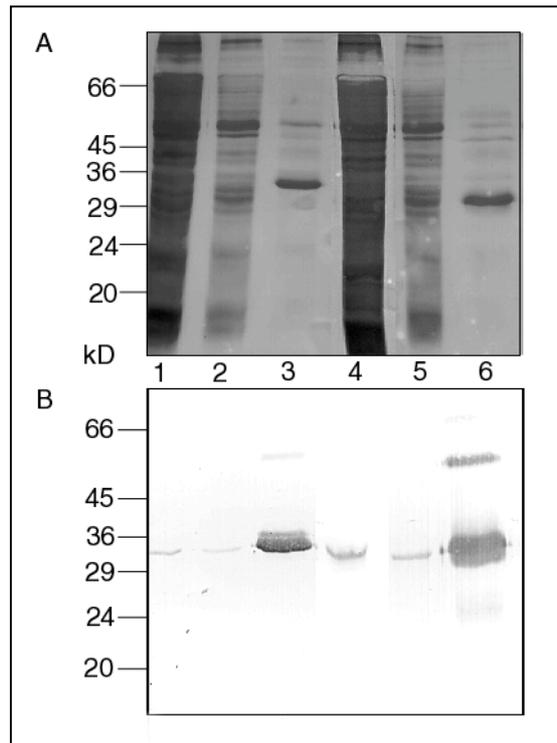


Abb. 3.34: Expression des AtGPT1 und des AtGPT2 in *S. cerevisiae*. A: SDS-Polyacrylamidgel nach Silberfärbung, B: Western-Blot. Detektion des 1. Antikörpers (anti-penta-His) mit Anti-Maus-IgG-Antiserum aus Ziege gekoppelter Alkalischer Phosphatase. 1-3: AtGPT1-Fractionen; 4-6 AtGPT2-Fractionen; 1,4 Membranpellets; 2,5 erste Waschung von Ni^{2+} -NTA-Agarosesäule; 3,6 Elution von Ni^{2+} -NTA-Agarosesäule.

Zunächst wurde die Transportaktivität des AtGPT1 in einem Versuch im Vergleich mit dem bereits beschriebenen Erbsenwurzel-GPT (Kammerer et al., 1998) bestimmt. In Abb. 3.35 sieht man einen deutlichen Transport von Glk6P mit beiden Proteinen, ein erster Hinweis darauf, dass das für den AtGPT1 kodierende Gen tatsächlich für einen Glukose-6-phosphattranslokator kodiert. Nachfolgend wurden die Substratspezifitäten der beiden AtGPTs bestimmt.

Die Substratspezifitäten der beiden GPTs aus *Arabidopsis thaliana* unterscheiden sich bezüglich der getesteten Substanzen hauptsächlich in ihrer Akzeptanz gegenüber Triosephosphat. Hier liegt die Transportrate im Vergleich zu Pi (= 100%) für den GPT1 bei 48%, für den GPT2 bei 106% (Abb. 3.36).

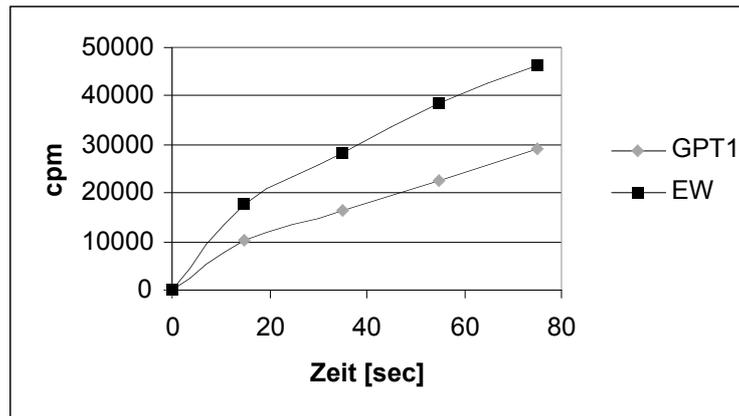


Abb. 3.35: relative Transportraten der gereinigten GPT-His Proteine: EW=GPT aus Erbse (*Pisum sativum*), GPT1=AtGPT1. Gemessen wurde der Glk6P-Transport.

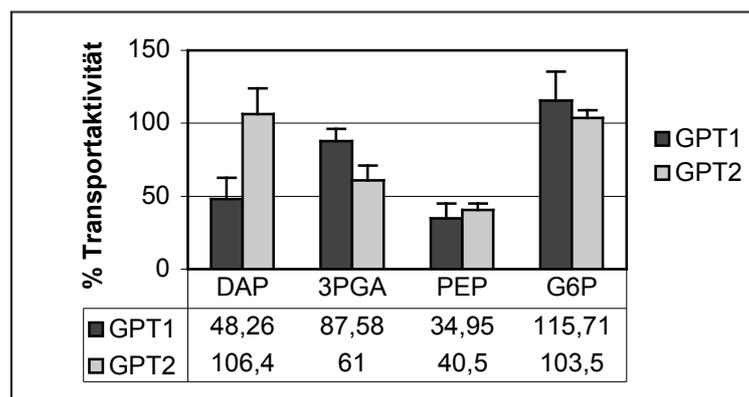


Abb. 3.36: Transporteigenschaften der rekombinanten AtGPTs. Als Austauschsubstrate wurden DAP, 3PGA, PEP und Glk6P verwendet. Die Transportkapazität für P_i wurde gleich 100% gesetzt. n=4

3.3.3. Messungen der Glk6P-Transportaktivität in Blättern und Blüten

Da RT-PCR Experimente und die transgenen *GPT1::Promotor-GUS* Pflanzen auf eine Expression des *AtGPT1*-Gens in grünen Geweben (Blättern) schließen lassen, wurde versucht, eine Glk6P Transportaktivität in Blättern nachzuweisen. Außerdem wurde die Transportaktivität in Blüten gemessen. In diesem Gewebe sind nach *Northern Blot*/RT-PCR beide *GPTs* aus *Arabidopsis thaliana* exprimiert.

200 mg Pflanzenmaterial wurden als Ausgangsmaterial für drei Kinetiken eingesetzt. Im Vergleich zur Kontrolle (Beladung der Liposomen mit Kaliumglukonat) konnte

man in Blüten und Blättern einen deutlichen Phosphattransport beobachten. Jedoch konnte nur in Blüten ein eindeutiger Transport von Glk6P festgestellt werden (Abb. 3.37).

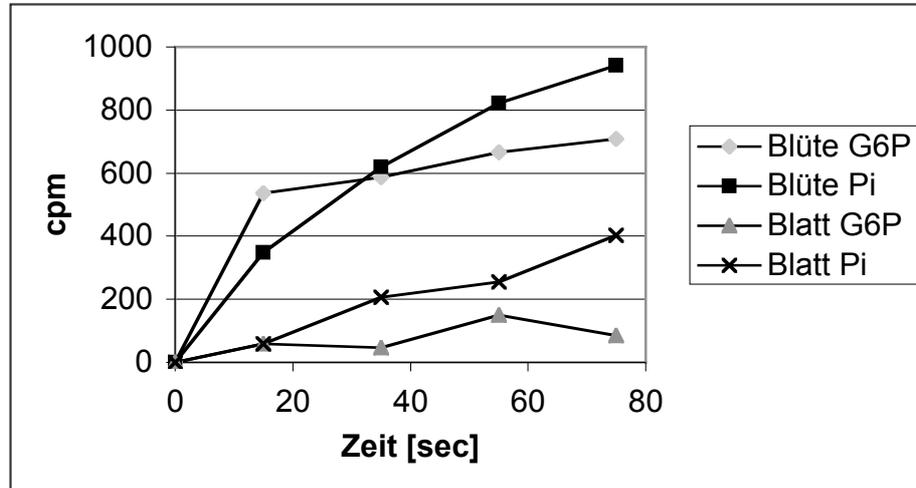


Abb. 3.37: Relative Transportraten von Phosphat und Glk6P (G6P) in Blättern und Blüten im zeitlichen Verlauf.

3.3.4. Transformation einer *pgi*-Mutante mit *EW4*, *AtGPT1* und *AtGPT2*

Die *Arabidopsis thaliana pgi-1* Mutante wurde 2000 von Yu et al. beschrieben. Sie enthält eine Punktmutation in der plastidären Phosphoglucose-Isomerase (PGI, EC 5.3.1.9). Die PGI ist ein dimeres Enzym, welches die reversible Isomerisierung von Fruktose-6-Phosphat und Glukose-6-Phosphat katalysiert (Smith und Doolittle, 1992). Es gibt in *Arabidopsis thaliana* eine zytosolische und eine plastidäre PGI (Caspar et al., 1985). Bei der *pgi-1* ist die Stärkesynthese in den Blättern betroffen, nicht jedoch in Wurzelspitzen.

Für Erbsenwurzeln wurde ein Import von Glukose-6-Phosphat in Plastiden nachgewiesen (Borchert et al., 1989). Dafür verantwortlich ist der GPT, der hauptsächlich in heterotrophen Geweben exprimiert ist (Kammerer et al., 1998). Der nahezu stärkefreie Blatt-Phänotyp der *pgi-1* wird damit begründet, dass einerseits kein Glukose-1-phosphat in die Chloroplasten importiert werden kann und außerdem im Blatt kein funktionsfähiger GPT existiert (Yu et al., 2000).

Die Restaktivität der PGI in den Mutanten soll 2-6.5% betragen. Da bei den in dieser Arbeit durchgeführten Stärkefärbungen im Gegensatz zu denen in der Veröffentlichung von Yu et al. signifikante Stärkemengen festgestellt wurden, wurde das *pgi*-Gen der erhaltenen Mutante aus einer Blatt-cDNA-Präparation heraus

amplifiziert und sequenziert (Oligonukleotide *pgi-for* und *pgi-rev*, siehe Anhang). Dabei konnte der beschriebene Nukleotidaustausch von C zu T an Position 834, der zu dem Aminosäureaustausch Ser166Phe führt, bestätigt werden.

Zunächst wurde untersucht, ob eines der Gene aus der Gruppe der plastidären Phosphattranslokatoren eine veränderte Expression im Vergleich zum Wildtyp (*Col-O*) aufwies. Dazu wurden RT-PCR Experimente mit cDNA aus Rosettenblättern von Wildtyp und Mutante durchgeführt. Außer einer leichten Reduktion der *TPT*-Expression in der *pgi1-1* konnten keine signifikanten Veränderungen in der PT-Expression festgestellt werden (Abb. 3.38). Auch die *GPT1*-Expression stieg nicht an.

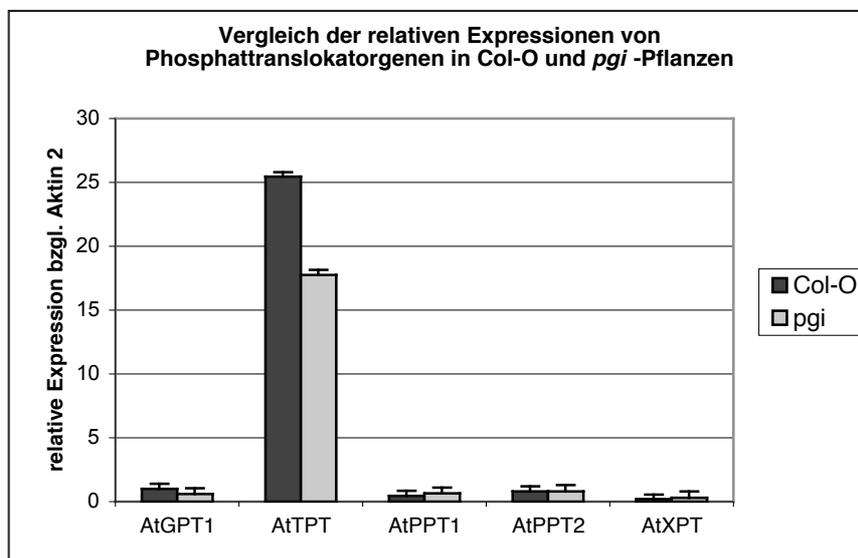


Abb. 3.38: Relative Expression der Phosphattranslokatorgene in der *pgi1-1*-Mutante im Vergleich zur Expression im WT. RT-PCR mit Rosettenblättern von drei Wochen alten Pflanzen.

Es wurde versucht, den nahezu stärkefreien Blattphänotyp der *pgi1-1* Mutante durch Überexpression eines *GTPs* zu komplementieren. Durch einen funktionellen GPT sollte ein Import von Glk6P aus dem Zytosol möglich sein, so dass die Reaktion der plastidären PGI umgangen wird und die komplementierten Mutanten wieder Stärke in den Blättern akkumulieren könnten. Zunächst wurde dieser Komplementationsversuch mit der cDNA eines GPT aus Erbse durchgeführt, später auch mit beiden *AtGPTs*.

Die Transporteigenschaften des GPT aus Erbse (*Pisum sativum*) wurden bereits analysiert, und das Gen wurde kloniert (Kammerer et al., 1998). Ein existierendes Konstrukt, welches die cDNA des Erbsen-*GPT* (*PsGPT* – Q31 EW4.2) unter der Kontrolle des 35S-Promotors (Franck et al., 1980) enthielt (zur Verfügung gestellt von K. Fischer), wurde in *pgi1-1* transformiert. Der Stärkegehalt von Pflanzen der T1-Generation wurde anschließend analysiert. Der Stärkegehalt in Blättern transformierter Pflanzen wurde durch enzymatische Hydrolyse der Stärke und anschließende Messung des Glukosegehaltes bestimmt (Abb. 3.39). Die Werte der Komplementante erreichen hier annähernd WT-Niveau.

Zusätzlich wurde eine Stärkefärbung von Rosettenblättern, die am Ende der Lichtperiode geerntet wurden, durchgeführt (Abb. 3.40). Um einen Vergleich zwischen einer völlig stärkefreien Mutante und der *pgi1-1* (Abb. 3.40 B) zu zeigen, wurde der Stärketest auch mit Blättern einer *pgm*-Mutante (Kofler et al., 2001) durchgeführt (Abb. 3.40 D). Diese Mutante besitzt einen Defekt in der plastidären PGM und kann daher kein G1-P und damit auch keine Stärke bilden. Die Blätter der mit 35S::*PsGPT* transformierten Pflanzen enthalten offensichtlich wieder signifikante Mengen an Stärke (Abb. 3.40 C), jedoch nicht ganz so viel wie der Wildtyp (Abb. 3.40 A).

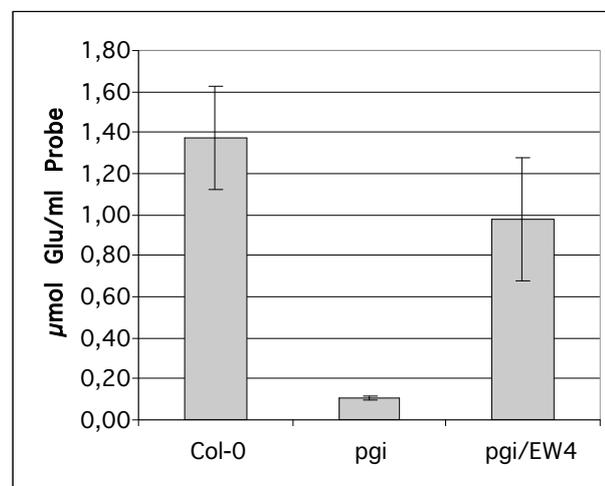


Abb. 3.39: Messung des Glukosegehaltes nach Stärkehydrolyse. Es wurde der Glukosegehalt von je 3 Blattscheiben (Durchmesser 0.5 cm) von Wildtyp (Col-O), *pgi*-Mutanten und komplementierten Pflanzen (*pgi/EW4*) nach Stärkehydrolyse gemessen. Blätternte nach 8 h Belichtung. n=6.

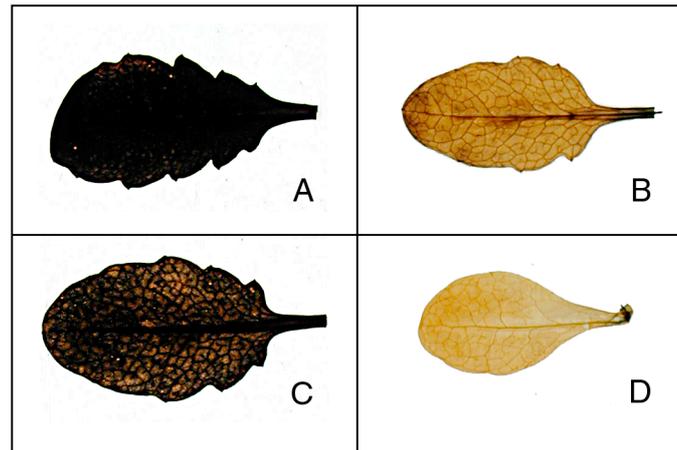


Abb. 3.40: In Jod-Kaliumjodid gefärbte Rosettenblätter. Erntezeitpunkt: Ende der Belichtungsphase. A: Col-O, B: *pgi*-Mutante, C: *pgi*/EW4, D: *pgm*-Mutante (*stf1*)

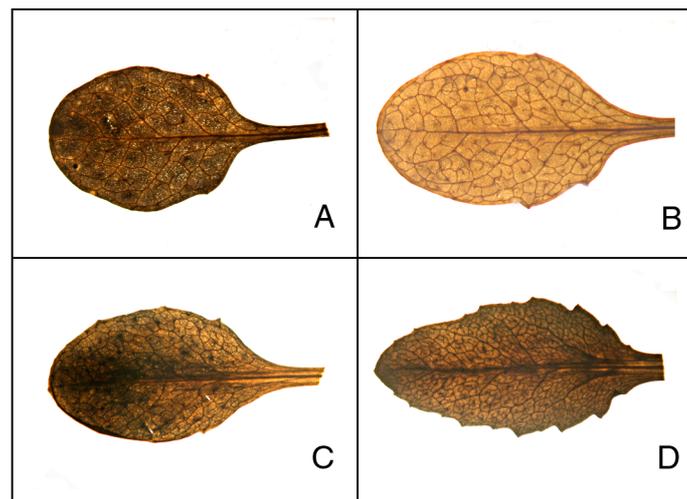


Abb. 3.41: In Jod-Kaliumjodid gefärbte Rosettenblätter. Erntezeitpunkt: Ende der Belichtungsphase. A: Col-O, B: *pgi*-Mutante, C: *pgi*/GPT1, D: *pgi*/GPT2

In den Blättern der *pgi1-1*-Mutante wird das *GPT1*-Gen offensichtlich exprimiert. Durch die Expression der beiden *GPTs* aus *Arabidopsis thaliana* in Hefe und anschließende Transportexperimente wurde nachgewiesen, dass beide *GPTs* Glukose-6-phosphat *in vitro* als Substrat akzeptieren. Trotzdem akkumulieren die *pgi*-Mutanten nur wenig Stärke. Diese Tatsache kann jedoch auch auf die geringe Konzentration oder eine Regulation des Proteins zurückzuführen sein. Daher wurde die cDNA der beiden *GPTs* aus *Arabidopsis thaliana* in den *pgi*-Pflanzen unter der Kontrolle des 35S-Promotor im Pflanzenvektor pBinAR-Kan überexprimiert. Dazu

wurde die über PCR amplifizierte und in den pGEM-*Teasy* ligierte GPT2-cDNA mit *SacII* geschnitten, aufgefüllt, mit *SalI* geschnitten und in den mit *SmaI* und *SalI* geschnittenen Pflanzenvektor ligiert. Die Klonierungsstrategie für das GPT1-Konstrukt war identisch, nur wurde hier der zuvor beschriebene *GPT1*-cDNA Klon aus Ausgangsplasmid verwendet.

Die Folgegeneration der vakuuminfiltrierten Pflanzen wurde durch PCR auf Vorhandensein des Konstruktes überprüft (Abb. 3.42). Durchgeführte Stärkefärbungen am Ende der Belichtungsphase weisen auf eine Wiederherstellung der Stärkeakkumulation in den komplementierten Pflanzen hin (3.41). Damit wurde indirekt gezeigt, dass beide GPTs aus *Arabidopsis thaliana* eine Funktion als Glukose-6-phosphat-Transporter in der Pflanze erfüllen können. Warum der endogene GPT, der jedoch als Protein bisher nicht nachzuweisen war, diese Funktion nicht erfüllt, konnte nicht geklärt werden.

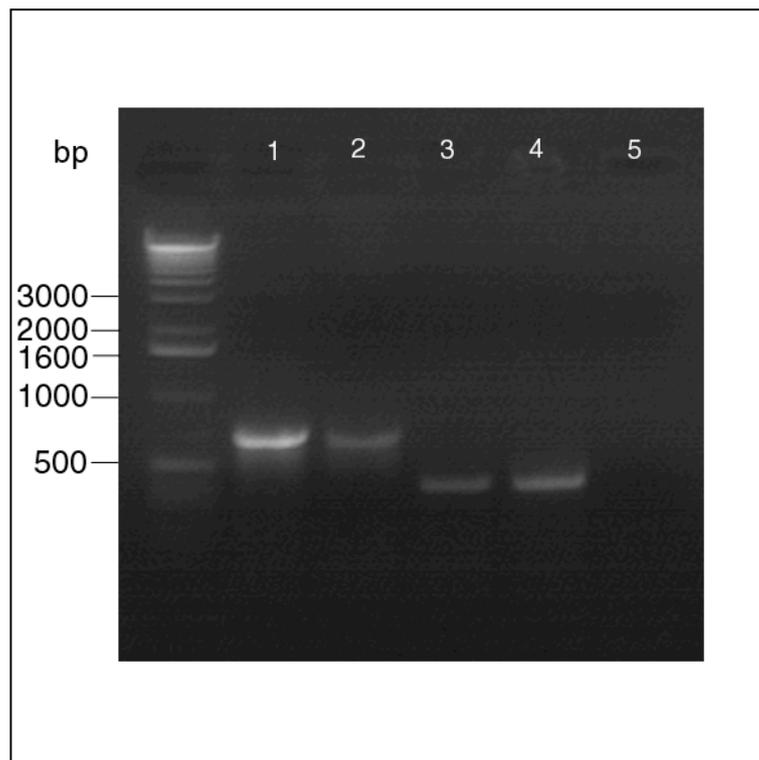


Abb. 3.42: Agarosegel einer PCR mit genomischer DNA: *pgi/GPT1*- (Spur 1 und 2) und *pgi/GPT2*- (Spur 3 und 4) Pflanzen. 5: H₂O. Es wurden die Linien G1-1 (Spur 1), G1-2 (Spur 2), G2-2 (Spur 3) und G2-4 (Spur 4) getestet. Als Primer wurde der 35Sfor Primer in Kombination mit den Primern GPT1-617R für die GPT1-Komplementanten bzw. GPT2R-280 für die GPT2-Komplementanten verwendet.

3.3.5. Mögliche Regulation des GPT1

Da *AtGPT1*, wie gezeigt, exprimiert wird und das Protein in der Lage ist, Glukose-6-Phosphat zu transportieren, aber trotzdem in der *pgi1-1*-Mutante keine für eine normale Stärkesynthese ausreichende Mengen an Glk6P in die Plastiden importiert, besteht die Möglichkeit, dass dieser Transporter posttranslational reguliert wird. Für die GPT-Proteine von Plastiden aus Erbsenwurzeln und *Brassica napus* Embryos wurde gezeigt, der Glk6P-Import durch langkettige Acyl-CoA Fettsäuren inhibiert wird (Fox et al., 2001). Diese Acyl-CoA Fettsäuren können jedoch durch Acyl-CoA Bindeproteine oder auch BSA, welches bei den geschilderten Versuchen stets im Präparationsmedium enthalten war, gebunden und damit unwirksam gemacht werden.

Eine andere beschriebene Regulationsmöglichkeit ist die Phosphorylierung von Proteinen. Um mögliche für Phosphorylierung zugängliche Aminosäurereste herauszufinden, wurden die GPT-Proteinsequenzen mit einem entsprechenden Programm (NetPhos2) analysiert (Abb. 3.43).

Es fällt auf, dass alle Proteine im Transitpeptid mehrere mögliche Phosphorylierungsziele für Serinkinasen bieten. Die Phosphorylierung von Präsequenzen plastidärer Proteine hat eine wichtige Funktion für den Import des Proteins in die Plastiden (May und Soll, 2000).

Innerhalb des reifen Proteins enthalten die beiden GPT-Proteine mehr mögliche Phosphorylierungsstellen als beispielsweise der TPT aus *A. thaliana*, GPT1 wiederum eine höhere Anzahl als GPT2. Ob diese vorgeschlagenen Phosphorylierungsstellen *in vivo* tatsächlich phosphoryliert werden, bleibt durch entsprechende Experimente nachzuweisen.

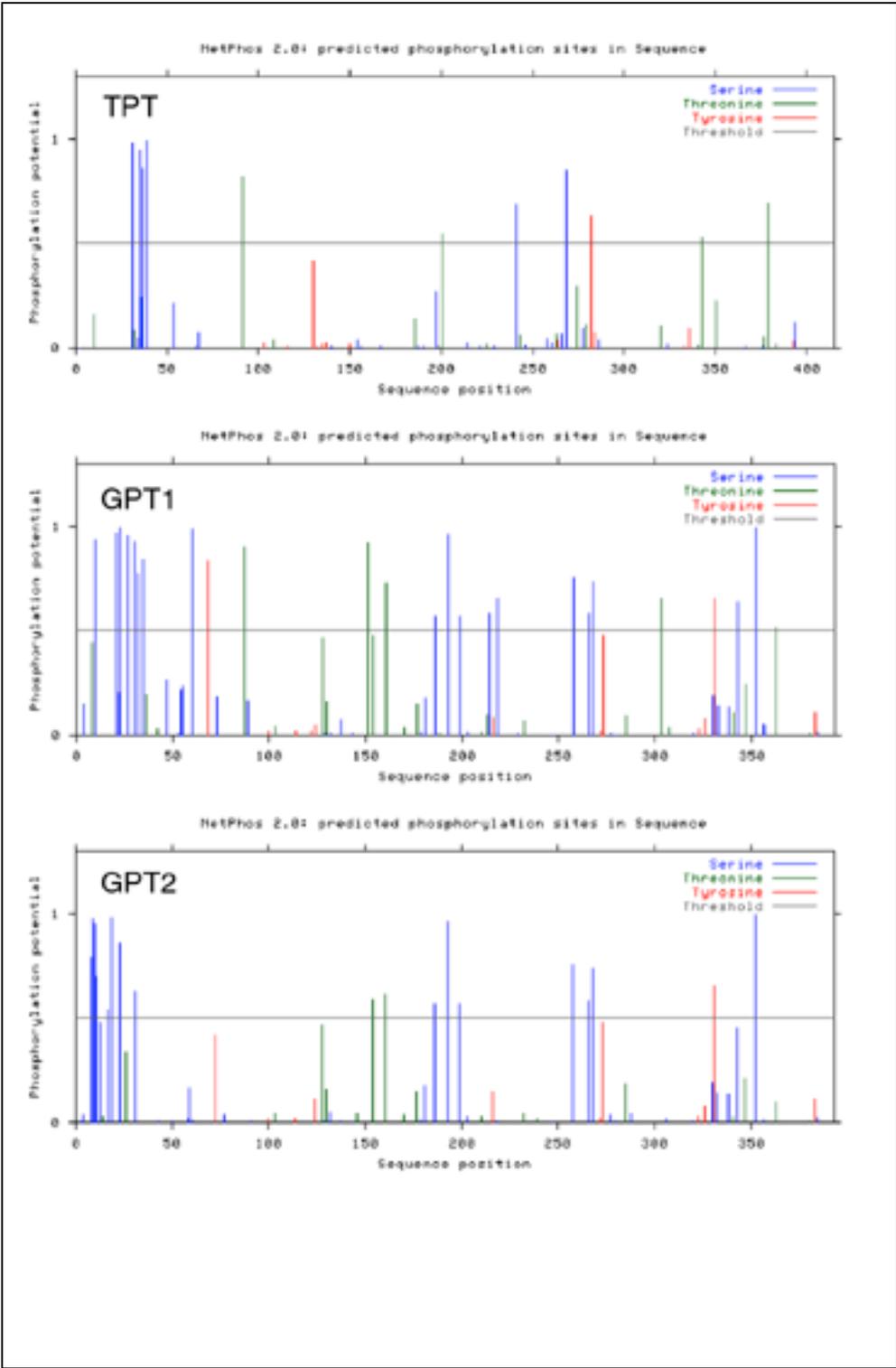


Abb. 3.43: NetPos2-Vorhersage von möglichen Phosphorylierungsstellen in PT-Proteinen.

3.3.6. Komplementierung einer *AtPPT1*-Mutante mit *AtPPT1* und *AtPPT2*

Die *cue1*-Mutante (*CHLOROPHYLL a/b BINDING PROTEIN (CAB) UNDEREXPRESSED 1 (CUE1)*) wurde während einer genetischen Durchmusterung nach veränderter *CAB* Expression (Li et al., 1995) isoliert. Sie zeichnet sich durch einen retikulierten Phänotyp aus: die Interkostalfelder erscheinen fahl grün, die Leitbündelregion dagegen sieht normal grün aus. Insgesamt sind die *cue1* Pflanzen in der Entwicklung verzögert und haben eine geringere Biomasse. Verschiedene *cue1* Allele (*cue1-1* bis *cue1-8*) sind bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass CUE1 dem PPT1-Protein entspricht (Streatfield et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit *cue1-6* (im Col-O Hintergrund) gearbeitet (Streatfield et al., 1999). Die Blattmorphologie der Mutante ist verändert, die Anzahl der Palisadenparenchymzellen ist reduziert, die Mesophyllzellen besitzen Chloroplasten, die kleiner sind als bei WT-Pflanzen. Die Chloroplasten der Bündelscheidenzellen unterscheiden sich dagegen nicht von WT-Chloroplasten.

Da bisher keine Transportstudien mit den beiden PPTs aus *Arabidopsis thaliana* durchgeführt wurden, kann man nur aufgrund der Sequenzhomologie zu bereits charakterisierten PPT-Proteinen (Fischer et al., 1997) auf ihre mögliche Funktion als PEP-Transporter schließen. Hier wurde getestet, ob beide *AtPPTs* bei Überexpression in der Lage sind, den *cue*-Phänotyp aufzuheben. Dazu wurden die *PPT*-cDNAs unter der Kontrolle des 35S-Promotors in *cue1-6* exprimiert.

Für die Klonierung der *PPT1*-cDNA wurde die aus einer Phagenbankdurchmusterung stammende *AtPPT1*-cDNA (Fischer et al., 1997) mit *EcoRV* und *XbaI* aus dem Plasmid (pBSC-KS) herausgeschnitten und in den mit *SmaI* und *XbaI* geöffneten Pflanzenvektor (pBinAR-KAN) ligiert. Die *PPT2*-cDNA wurde mit Oligonukleotiden, die eingebaute Schnittstellen enthielten (5' *EcoRV* und 3' *XbaI*, siehe Anhang), aus Blatt-cDNA amplifiziert und ebenfalls in den *SmaI/XbaI* geschnittenen Pflanzenvektor ligiert.

Beide Konstrukte wurden zunächst in Agrobakterien (GV3101) transformiert, die anschließend für die Vakuuminfiltration von *cue1-6* Mutanten verwendet wurden. Kanamycinresistente T1-Pflanzen wurden über PCR daraufhin getestet, ob sie das entsprechende Konstrukt enthielten (Abb. 3.45).

Die transgenen *cue1-6/PPT1*-Pflanzen zeigen eine vollständige Reversion des Phänotyps, die Pflanzen sind nicht von WT-Pflanzen zu unterscheiden. Die *cue1-6/PPT2*-Pflanzen sind zwar fast so groß wie Col-O WT-Pflanzen, aber die jüngeren Rosettenblätter zeigen noch eine leicht retikuliert Blattmorphologie. Die äußeren Rosettenblätter weisen keine Unterschiede zum WT auf, auch die Gesamtentwicklung der Pflanze ist nicht verzögert (Abb. 3.44).

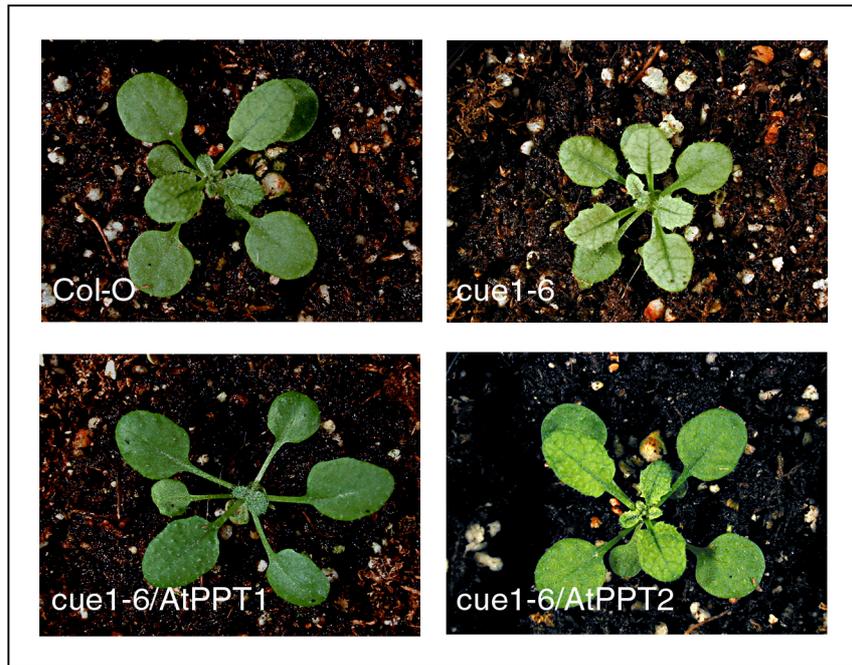


Abb. 3.44: Komplementation der *cue1-6* Mutante. Die oberen beiden Abbildungen zeigen den Wildtyp (Col-O) und die *cue1-6* Mutante, unten links eine mit dem 35S::*AtPPT1* Konstrukt transformierte *cue1-6* Pflanze, rechts eine mit 35S::*AtPPT2* transformierte *cue1-6* Pflanze.

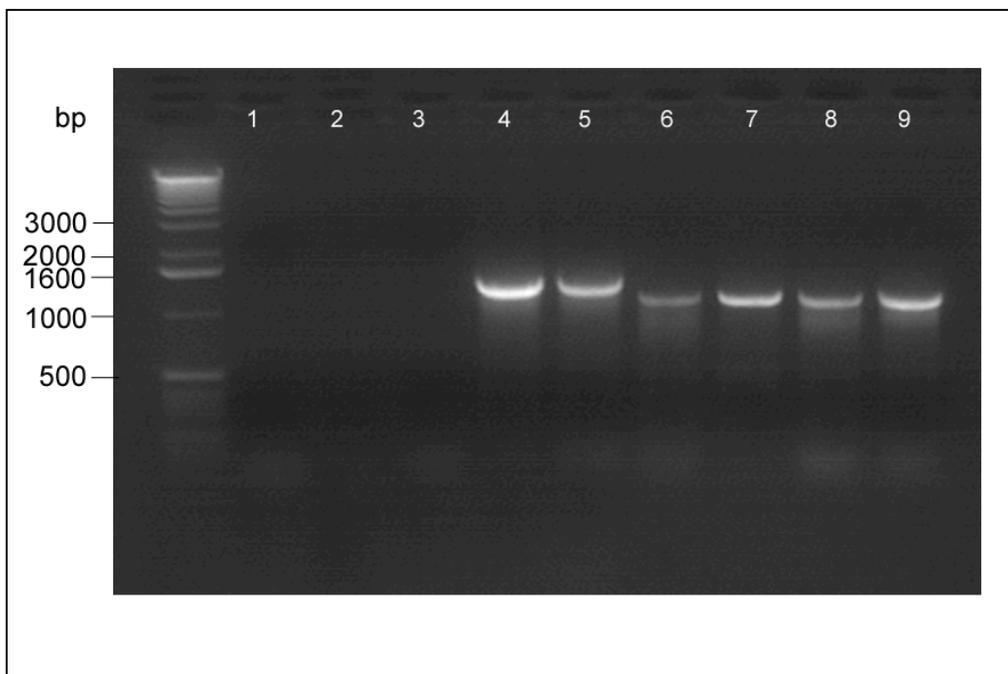


Abb. 3.45: Agarosegel einer PCR mit genomischer DNA von *cue1-6* Komplementanten: Spur 1: H₂O-Kontrolle, 2: neg. Kontrolle mit *cue1-6* genomischer DNA und 35S/PPT1 Primern, 3: neg. Kontrolle mit *cue1-6* genomischer DNA und 35S/PPT2 Primern, 4: Linie P1-4, 5: Linie P1-5, 6: Linie P2-3, 7: Linie P2-4, 8: Linie P2-8, 9: Linie P2-1. Als Test-Primer wurde der 35Sfor Primer in Kombination mit den Primern PPT1-1207R für die PPT1-Komplementanten bzw. PPT2R-1007 für die PPT2-Komplementanten verwendet.

4. Diskussion

4.1. Plastidäre Phosphattranslokatoren in *Arabidopsis thaliana*

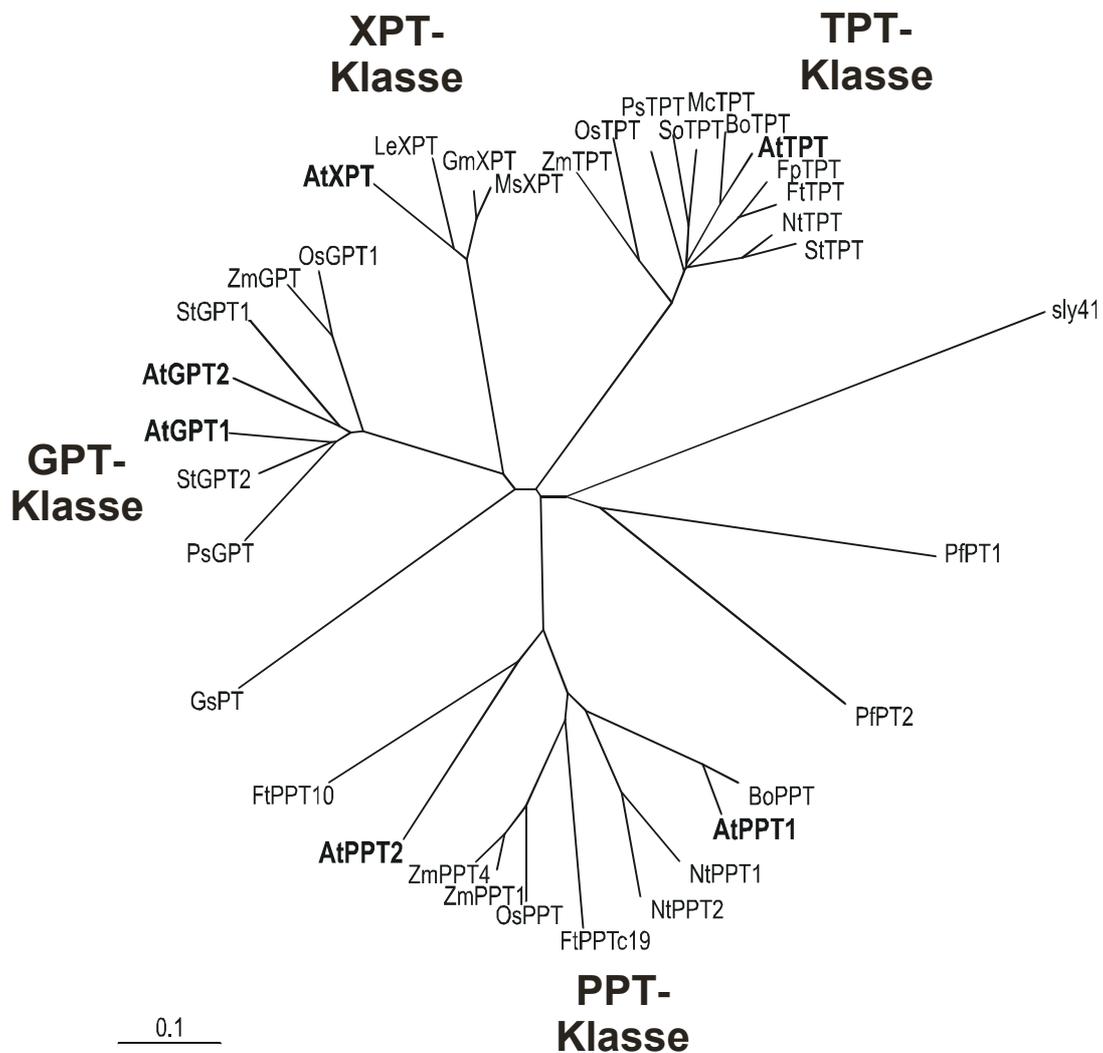


Abb. 4.1: Unverwurzelter phylogenetischer Stammbaum der plastidären Phosphattranslokatoren aus verschiedenen Pflanzen. Erstellt mit ClustalX, Phylip 3.5.72, Tree View PPC. Dargestellt sind Proteine aller vier PT-Klassen. Folgende Abkürzungen wurden für die unterschiedlichen Spezies gewählt: At: *Arabidopsis thaliana*, Bo: *Brassica oleracea*, Fp: *Flaveria pringlei*, Ft: *Flaveria trinervia*, Gm: *Glycine max*, Gs: *Galdieria sulfuraria*, Le: *Lycopersicon esculentum*, Mc: *Mesembryanthemum crystallinum*, Ms: *Medicago sativum*, Nt: *Nicotiana tabaccum*, Pf: *Plasmodium falciparum*, Ps: *Pisum sativum*, Os: *Oryza sativa*, St: *Solanum tuberosum*, Zm: *Zea mays*. sly41: Hefe PT-Homolg. Die PTs aus *A. thaliana* sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Mitglieder der Phosphattranslokator-Genfamilie wurden in den letzten Jahren aus verschiedenen Pflanzen isoliert (Fischer et al., 1994a; Fischer et al., 1997, Kammerer et al., 1998; Eicks et al., 2002). Mit der Fertigstellung des *A. thaliana* Genomprojektes (AGI, 2000) ergab sich zum ersten Mal die Möglichkeit, einen Überblick über sämtliche Mitglieder der vier verschiedenen Phosphattranslokator-Klassen innerhalb einer Pflanze zu erhalten. Durch Analyse der Datenbank (TAIR) stellte sich heraus, dass es in *A. thaliana* sechs Phosphattranslokator-Gene gibt, je zwei *GPT*- und zwei *PPT*-Gene sowie ein *TPT*- und ein *XPT*-Gen. Die Proteinsequenzen gruppieren im dargestellten phylogenetischen Stammbaum mit den Proteinsequenzen der jeweiligen Klassen aus anderen Pflanzen (Abb. 4.1). Dabei ist auffällig, dass *PPT2* sehr weit entfernt von den übrigen *PPT*-Sequenzen steht. Die Homologie von Proteinen beträgt innerhalb einer Klasse normalerweise zwischen 75 und 85%, für *PPT2* beträgt die Aminosäure-Identität zu anderen *PPT*-Sequenzen nur 52%.

Die Frage, ob alle PTs in *A. thaliana* für die Integrität der Pflanze wichtig sind, lässt sich einerseits durch die Analyse von Mutanten, andererseits durch Studien zur Expression und Funktion der Phosphattranslokatoren beantworten. Unklar ist bisher, ob die Anzahl an PT-Genen für alle Pflanzen gleich ist, ob also stets zwei *GPT*s und zwei *PPT*s benötigt werden. Bisher wurden in *Solanum tuberosum* zwei *GPT*s und in Tabak und Mais zwei *PPT*s identifiziert (unveröffentlichte Ergebnisse).

4.2. Expressionsanalysen mittels RT-PCR

Viele Gene sind zu niedrig exprimiert, als dass man routinemäßig *Northern Blot* Analysen durchführen könnte. Zu solchen Genen zählen auch die PT-Gene aus *Arabidopsis thaliana* - mit Ausnahme des *AtTPTs*. Signale auf *Northern Blots* waren häufig kaum zu detektieren. Eine empfindlichere Methode stellt die RT-PCR dar (Kawasaki und Wang, 1989). Für die Unterscheidung nahe verwandter Mitglieder einer Genfamilie hat diese Methode den zusätzlichen Vorteil, dass die Amplikons so kurz und spezifisch gewählt werden können, dass zuverlässig zwischen den Genen unterschieden werden kann.

Allerdings birgt die Tatsache, dass man die Transkripte nicht mehr direkt nachweist, sondern den Zwischenschritt der cDNA-Synthese durch reverse Transkription einführt, zusätzliche Fehlerquellen. Daher sind stets Kontrollen und die Verwendung geeigneter Standards nötig. Es ist umstritten, welche Technik für die Präparation der cDNA und die folgende PCR die geeignetste ist (Sellner und Turbett, 1998). Unterschieden wird zwischen völlig getrennten Reaktionen mit zwei verschiedenen Enzymen (wie sie in dieser Arbeit stets durchgeführt wurden), *one-tube* Reaktionen mit zwei verschiedenen Enzymen und *one-tube* Reaktionen, welche nur ein Enzym enthalten. Die *Tth*-Polymerase besitzt beispielsweise sowohl eine Reverse Transkriptase- als auch eine DNA-Polymerase-Aktivität. Durch die möglichst

geringe Anzahl von Schritten bis zum Endprodukt vermeidet man zwar Kontaminationen, es hat sich aber herausgestellt, dass Reaktionen, welche nur ein Enzym verwenden, weniger empfindlich sind und häufig zu schlechteren Ergebnissen führen (Sellner und Trubett, 1998).

Zu Beginn dieser Arbeit war die Zahl der *GPT*- und *PPT*-Gene in *A. thaliana* nicht bekannt. Die Oligonukleotide für die Amplifikation der Transkripte waren daher nicht spezifisch für eines der Gene. Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR führten deswegen nur zu der Aussage, dass Gene beider Klassen in allen getesteten Geweben exprimiert sind. Durch das Testen unterschiedlicher Zykluszahlen und die anschließende Überprüfung der Signalstärke des PCR-Produktes über Agarosegele und *Southern Blot* bekommt man außerdem Informationen über die Expressionshöhe der Gene (Abb. 3.11).

Mit der semiquantitativen Methode verbundener technischer Aufwand - wie das wiederholte Abstoppen der Reaktionen und die Durchführung von *Southern Blots* und Hybridisierungen - lässt sich durch die sogenannte *real time* PCR vermeiden (Bustin, 2000; Abb. 4.6). Über Fluoreszenz-Zunahme lässt sich nach unterschiedlichen Methoden die Amplifikation des PCR-Produktes verfolgen. Um dann Aussagen über die ursprüngliche Transkriptmenge treffen zu können, muss im Falle einer absoluten Quantifizierung eine Standardgerade erstellt werden, und zwar am besten mit dem klonierten zu amplifizierenden Fragment. Für eine relative Quantifizierung reicht es, wenn man die erhaltenen Werte auf einen internen Standard bezieht, der parallel zu dem zu testenden Gen für jede Probe mit amplifiziert wurde. Die Reaktion kann in verschiedenen Gefäßen oder in einem einzigen Gefäß durchgeführt werden; letzteres bezeichnet man als Multiplex-RT-PCR. Als interne Standards kommen Gene in Frage, die konstitutiv und möglichst gleichmäßig in allen Geweben exprimiert sind. Ihre Expression sollte durch Versuche mit dem Material, aus welchem die RNA stammt, nicht beeinflusst werden (Thellin et al, 1999); meist handelt es sich um *housekeeping* Gene. Zu Beginn wurde in dieser Arbeit *Aktin2* als Referenzgen gewählt. Da die Expression von *Aktin2* allerdings nicht in allen Geweben von *A. thaliana* gleich stark ist (An et al., 1996), kann das Gen nur beim Vergleich unterschiedlicher Gene aus einem einzigen Gewebe als Standard dienen. Für tierische Systeme gibt es mehrere getestete Vorschläge für Referenzgene, meistens werden β -Actin und GAPDH genutzt (Suzuki et al., 2000), in pflanzlichen Systemen wird außer Aktin häufig 18S rRNA verwendet. Da die Expression der 18S rRNA relativ gleichmäßig erscheint (Goidin et al., 2001), auch im direkten Vergleich mit *Aktin2*, wurde diese als Standard verwendet (Abb. 3.14). Ein Nachteil bei der Nutzung von 18S rRNA als Referenzgen ist der ausgesprochen hohe Anteil an revers transkribierter rRNA in der cDNA-Präparation. Diese Tatsache führt dazu, dass man den Ansatz mindestens 1:300 verdünnen muss, um die Expression mit der Expression anderer Gene vergleichen zu können. Der zusätzliche Verdünnungsschritt bringt natürlich wieder eine Ungenauigkeit mehr in den Gesamt Ablauf des Versuches.

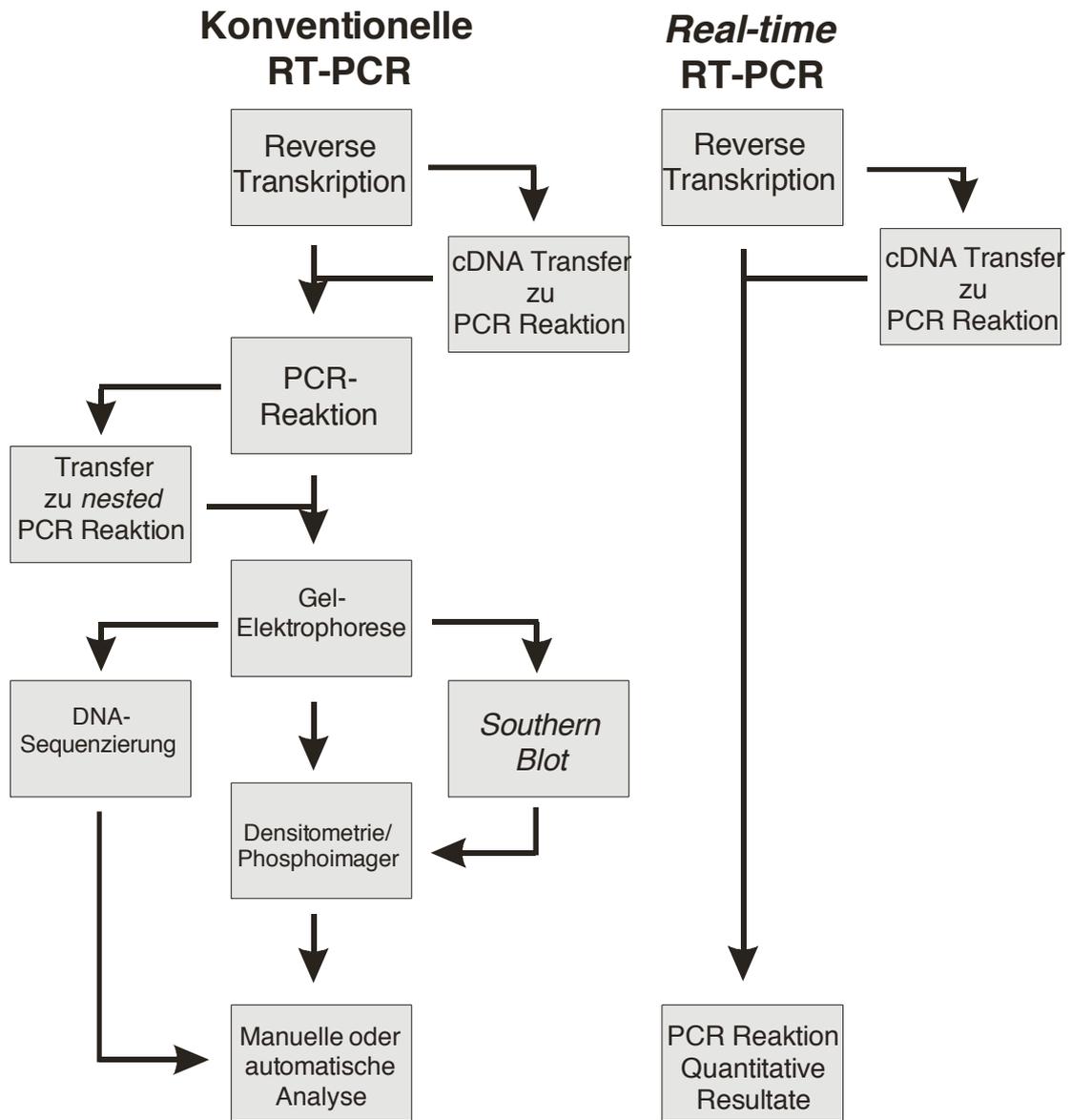


Abb. 4.6: Vergleich von konventioneller und real time RT-PCR (nach Bustin, 2000). Die für eine Auswertung bzw. Quantifizierung nötigen Schritte sind in diesem Flussdiagramm links für die konventionelle und rechts für die real time RT-PCR dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche mit zwei verschiedenen *real-time* Systemen durchgeführt, die hier kurz verglichen werden sollen. Der LightCycler® der Firma Roche ist ein System, welches mit Luft kühlt und heizt. Die PCR-Reaktionen finden in Glaskapillaren statt, die in einem rotorartigen Karussell untergebracht sind. Das Karussell dreht sich vor einer blauen, Licht emittierenden Diode; die Fluoreszenz wird durch drei Photodetektionsdioden mit Filtern unterschiedlicher Wellenlänge detektiert (Wittwer et al., 1989; Wittwer und Garling, 1991). Die Dauer eines Laufes beträgt etwa 20 Minuten. Da das Karussell nur 32 Stellplätze besitzt, ist die Messung von Doppelproben kaum möglich, wenn man z. B. die Expression von mehreren Mitgliedern einer Genfamilie in verschiedenen Geweben untersuchen möchte.

Beim GeneAmp5700® *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) handelt es sich um einen aufgerüsteten konventionellen Thermozykler (PE9600) mit 96 PCR-Stellplätzen. Statt Glaskapillaren werden hier Kunststoffreaktionsgefäße mit einem dünnen Deckel verwendet. Während der PCR wird Laserlicht in alle 96 Proben durch eine Multiplex-Anordnung optischer Fasern verteilt, die resultierende Fluoreszenzemission wird durch eine CCD-Kamera analysiert. Die Durchführung einer PCR dauerte ca. zwei Stunden. Da das Fortschreiten des PCR-Laufes erst nach Beendigung der Reaktion analysiert werden kann, ist der vom Ausdruck *real time* hier nicht ganz korrekt.

Teilweise wurden relative Quantifizierungen mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt (siehe Anhang). Diese Methode ist nur zuverlässig, wenn die Effizienzen der Amplifikation von Ziel- und Referenzgen ungefähr gleich sind. Um dies zu gewährleisten, wurden die Oligonukleotide für die Amplifizierung der PT-Gene so ausgewählt, dass sie die gleiche Schmelztemperatur (60°C) und die Amplikons die gleiche Länge (100-150bp) besaßen. Ein weiterer Test für die Vergleichbarkeit der Effizienz zweier Reaktionen besteht darin, dass man unterschiedliche Verdünnungen der cDNA für verschiedene RT-PCR Reaktionen mit beiden Primer-Kombinationen einsetzt, wobei das resultierende Verhältnis der beiden Gene zueinander immer gleich bleiben sollte. Ergebnisse, welche mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode erhalten wurden, entsprachen ungefähr den Ergebnissen aus der Standardgeradenmethode. Man musste jedoch weniger Reaktionen durchführen und sparte dadurch Zeit und Material (Abb. 3.15). Daher war die Durchführung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode immer dann sinnvoll, wenn keine absoluten Werte benötigt wurden, und es ausreichte, Informationen über die Verhältnisse der unterschiedlichen Transkripte zu erhalten.

Ein Problem der verwendeten SybrGreen²-Methode ist, dass jegliche Art doppelsträngiger DNA, also auch beispielsweise Primer-Dimere, detektiert wurde. Daher wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen, um festzustellen, ob das Fragment die erwartete Größe besaß. Zusätzlich wurden stets Schmelzkurven erstellt, die Aufschluss über die Spezifität des Produktes gaben. Mittlerweile wurde

das System der *real-time* PCR durch die Entwicklung von Systemen, die auf spezifischen Sonden statt auf Interkalatoren basieren, verbessert (Bustin, 2000).

Auf die durch die RT-PCR erhaltenen Resultate bzgl. der *GPT*- und *PPT*-Expression wird in den folgenden Kapiteln eingegangen. Die hergestellten Promotor::GUS-Fusionen bestätigten die Expressionsdaten, und die genaue Lokalisation des Signals innerhalb eines Gewebes wurde dadurch möglich.

Das Expressionsmuster des TPT wurde bereits ausführlich untersucht (Deterding, 1998; Schulz et al., 1992). Da in der Promotorsequenz des TPT mehrere putative Lichtregulationselemente enthalten sind (Deterding, 1998), wurde die Expressionshöhe des Gens während einer Licht-Dunkelperiode gemessen. Das Ergebnis zeigte, dass die Transkriptmenge schon vor Beginn der Lichtphase anstieg, einen Höhepunkt mittags erreichte, um dann kontinuierlich abzunehmen. Dieses Muster deutet eher auf eine tageszeitliche Regulation hin. Bezüglich der Lichtabhängigkeit der *TPT*-Expression existieren bereits unterschiedliche, sich widersprechende Daten. Während Schulz et al. (1992) eine Lichtinduktion der Expression in Blättern der Kartoffelpflanze nachweisen konnten, beobachteten Knight und Gray (1994) nach 24 Stunden Belichtung keinen signifikanten Anstieg der Transkriptmenge.

Da möglicherweise sowohl zirkadiane als auch Licht-Effekte die Expression des Gens beeinflussen, müssten die Faktoren durch entsprechende Experimente getrennt untersucht werden, wobei *real-time* RT-PCR sicher eine materialsparende und geeignete Methode zum empfindlichen Nachweis von Unterschieden in der Transkriptmenge wäre.

Für das *XPT*-Gen sind die RT-PCR Daten die einzigen im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Expressionswerte. Studien mit transgenen Pflanzen, die eine Promotor::GUS-Fusion des Gens enthalten (Eicks et al., 2002), bestätigen das Vorhandensein des XPTs in allen Geweben von *A. thaliana*. Da bisher keine Mutante mit einem Defekt in diesem Gen existiert, ist unklar, welche Folgen ein Fehlen des XPTs für die Pflanze hätte. Die Hauptsubstrate des Translokators - Phosphat, Triosephosphat, 3-PGA und Xylulose-5-Phosphat - können auch von anderen Transportern der Phosphattranslokatorfamilie, z. B. einem GPT, über die Plastidenmembran transportiert werden.

4.3. Sequenzanalyse der plastidären Phosphattranslokatoren

4.3.1. Die Exon-Intronstruktur der Phosphattranslokatorgene

Introns sind intervenierende Sequenzen nichtkodierender DNA innerhalb eines Gens. Häufig haben Introns einen höheren Anteil an der Gensequenz als kodierende Bereiche. In Vertebratengenen sind Exons eher kurz (<300 bp) und Introns lang (>1000 bp). Pflanzliche Introns sind meistens ca. 200 bp lang und entsprechen damit ungefähr der Länge typischer Pflanzenexons (Lewin, 1994). Die durchschnittliche Intronlänge dikotyler Pflanzen beträgt 80-290 bp (Hawkin, 1998). Die Längen der meisten Introns der Phosphattranslokatorgene fallen in diesen Bereich. Auffällige Ausnahmen bilden die ersten Introns von *AtPPT1* (502 bp) sowie *AtGPT1* (380 bp) und *AtGPT2* (390 bp). Es sind einige Fälle bekannt, in denen innerhalb von Introns Sequenzen lokalisiert sind, die für die Genexpression eine Rolle spielen. Solche Introns, welche durch die Steigerung der Expressionshöhe von Reporter genen charakterisiert wurden (Köhler et al., 1996), liegen meist im 5'-Bereich der Gene und sind oft länger als für Pflanzen üblich. Ein Beispiel hierfür ist das 609 bp *salT*-Intron aus Mais (Rethmeier et al., 1997). Ob die genannten *PT*-Gene in ihren ersten Introns regulatorische Sequenzen enthalten, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Bei dikotylen Pflanzen sind Exons ca. 15% GC-reicher als Introns, die wiederum eine Zunahme von Thyminresten in der gleichen Größenordnung aufweisen, was für den Vorgang des Spleißens von Bedeutung ist (Baynton et al., 1996; Merrit et al., 1997). Der AT-Gehalt der Introns des *AtTPT* beträgt 66%, in den Exonbereichen sind es nur 54% (Deterding, 1998). Die Werte für die übrigen Phosphattranslokatorgene sind ähnlich.

Die Anzahl der Introns innerhalb der einzelnen *PT*-Klassen ist in *A. thaliana* konserviert, variiert aber zwischen Mitgliedern der Genfamilie, die nicht der gleichen Klasse angehören. Das *AtTPT*-Gen besitzt elf Introns, die beiden *AtPPT*-Gene acht, die zwei *AtGPT*-Gene vier und das *XPT*-Gen keines (Abb. 4.2). Vergleicht man die Genstruktur mit bekannten genomischen *PT*-Sequenzen aus anderen Spezies, stellt man fest, dass sich die Positionen innerhalb einer Klasse auch hier gleichen. Beispiele hierfür sind der *TPT* aus Reis, *OsTPT* Acc.-Nummer AP002855, genomische Klone des *PPT* aus Tabak und des *GPT* aus Kartoffel (unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Evolution der *PT*-Gene könnte auf ein einziges gemeinsames Vorläufergen zurückgehen. Da keine *PT*-homologen Sequenzen in ursprünglicheren Pflanzen wie Gymnospermen oder Moosen und Farnen gefunden wurden, ist die Frage nach der Anzahl der Introns in einem Ursprungsgen schwer zu beantworten. Hatte ein ursprüngliches Phosphattranslokator-Vorläufergen viele Introns und gingen diese im Verlauf der Evolution verloren? Oder war das Vorläufergen intronfrei, und die

verschiedenen Klassen akkumulierten während ihrer Differenzierung Introns in unterschiedlicher Zahl und an verschiedenen Positionen?

Es ist umstritten, ob die Evolution von Genstrukturen eher durch Verlust von Introns oder Intronerwerb gekennzeichnet ist. Vertreter der *introns-early*-Theorie (IE, auch "*exon theory of genes*" genannt) schlagen vor, dass Introns schon Bestandteile der frühesten Gene waren (Gilbert und Glynias, 1993). Proteine sollen sich durch die Kombination von ursprünglichen „Minigenen, heute repräsentiert durch Exons, entwickelt haben. Die Bereiche zwischen den Minigenen überlebten als Intronpositionen (Gilbert, 1987; Doolittle, 1978). Der entgegengesetzte Standpunkt, die *introns-late* (IL)-Theorie, behauptet, dass Introns in voll entwickelte Gene inserierten, und zwar durch einen Mechanismus, welcher der reversen Transkription ähnlich ist.

Die Diskussion zwischen IE und IL beschränkt sich auf Gruppe III- oder spleißosomale Introns. Diese sind auf ein Spleißosom angewiesen, im Gegensatz zu Gruppe I-Introns, bei denen die RNA selbst den Spleißvorgang katalysiert (Copertino und Hallick, 1993).

Eine Schwierigkeit der Argumentation der IE Theorie besteht darin, dass Prokaryoten keine Introns besitzen, obwohl in diesen Organismen Introns existiert haben sollten. Nach der IE Theorie ist die Abwesenheit von Introns in Bakterien auf einen Verlust derselben im Laufe der Evolution zurückzuführen, was diesen Organismen den Vorteil eines verkleinerten Genoms und damit einer kürzeren Replikationszeit einbringen würde. Die IL Theorie dagegen nimmt das Fehlen von Introns als Hinweis darauf, dass diese erst später inseriert wurden. Cho und Doolittle (1997) untersuchten die Frage nach der Ursprünglichkeit von Introns anhand paraloger Gene (der α - und β - Untereinheit der ATP-Synthase), welche offensichtlich schon vor der Prokaryoten-Eukaryoten-Trennung divergierten, und kamen zu dem Schluss, dass die Verteilung der Introns in diesem Fall besser mit der IL Theorie übereinstimmt.

Das IE-Szenario kombiniert zur Erklärung der heutigen Intronverteilungen Mechanismen wie *intron slippage* und Deletionen von Introns. Der wahrscheinlichste Mechanismus, durch den Introns präzise deletiert werden können, ist Genkonversion mit einer intronlosen, revers-transkribierten cDNA-Kopie des Gens oder eines nahe verwandten Gens (Drouin und de Sa, 1997). Beispielsweise wurde in Tieren gezeigt, dass das Fehlen eines Introns in der kodierenden Region des Präproinsulin I-Gens aus der Ratte das Resultat eines RNA-vermittelten Duplikations-Transpositions Vorgangs ist, bei dem ein Transkript des Präproinsulin III eine Rolle spielte (Soares et al., 1985). Das Vorkommen eines prozessierten Aktinpseudogens im Kartoffelgenom wurde als Beweis für das Vorkommen von reverser Transkription in Pflanzen angenommen (Dornburg und Temin, 1990; Luan et al., 1993). Es wurden auch *copia-like* und *gypsy-like* Retrotransposonsequenzen gefunden, die Quelle eines solchen Enzyms sein könnten (Wessler et al., 1995).

Transposable elements (TE) spielen eine zentrale Rolle in Struktur, Funktion und Evolution von Pflanzengenomenen; sie werden auch als „genomische Parasiten“ bezeichnet und in diesem Zusammenhang mit Intronsequenzen und anderer *selfish* DNA verglichen (Palmer und Logsdon, 1991). In Pflanzen kommen zwei Sorten von Transposons vor. Klasse-I-Transposons werden auch als Retrotransposons gezeichnet. Sie sind mit Retroviren verwandt und führen eine replikative Transposition durch, d. h. das Element wird nicht ausgeschnitten, sondern es wird eine neue Kopie gebildet und an anderer Stelle inseriert. Klasse-II-TEs (oder *short inverted repeat elements*) benötigen kein RNA-Intermediat, sondern die Transposition findet von DNA zu DNA statt und ist an das Ausschneiden der Sequenz gekoppelt. Trotzdem können auch sie die Kopienzahl erhöhen, indem ein Element-enthaltender DNA-Strang als Vorlage bei einer Doppelstrang-Lückenreparatur dient (Clegg et al., 1997). Ein Beispiel eines solchen Klasse-II-TE ist das *Ac/Ds*-System aus Mais.

Wenn man einen Verlust von Introns über reverse Transkription und Reinsertion in das Genom für die Phosphattranslokatoren als Mechanismus annimmt, könnte das intronlose XPT-Gen Resultat eines solchen Vorgangs sein. Da hier außerdem eine auffallend hohe Homologie zu GPT-Sequenzen besteht (42% zu AtGPT1 und 44% zu GPT2, Tab. 3.1), ist es vorstellbar, dass der XPT ein prozessierter Ableger eines GPT-Vorläufergens darstellt, dessen Sequenz in der folgenden Zeit der Evolution von der GPT-Sequenz divergierte.

Keine Intronposition ist in allen drei intronhaltigen PT-Klassen konserviert. Es existieren nur zwei Intronpositionen, die zwischen TPT- und PPT-Klasse konserviert sind, sowie eine konservierte Position zwischen PPT- und GPT-Klasse (Abb. 3.2; Abb. 4.2).

Sich unterscheidende Intronpositionen in homologen Genen verwandter Spezies sind kaum ausschließlich durch Intronverlust zu erklären (Drouin und de Sa, 1997). Als mögliche Ursachen für sich leicht unterscheidende Intronpositionen werden die Mechanismen des Intron-*slippage* und Intron-*sliding* vorgeschlagen. Bei ersterem wird das aus der prä-mRNA gespaltene Intron nach reverser Transkription an anderer Stelle inseriert (Cho und Doolittle, 1997; Kersanach et al., 1994). Unter Intron-*sliding* versteht man das Verrutschen einer einzelnen Introngrenze durch Veränderung einer Spleißstelle, was zu Insertionen oder Deletionen führt. Dieser Vorgang ist eine der Erklärungsgrundlagen der IE-Theorie für nicht exakt gleiche Intronpositionen. Allerdings sollte das Intron-*sliding* zu einem Verlust der Sequenzidentität in den betroffenen Regionen zwischen den Genen führen. Nach Stoltzfus et al. (1997) ist das jedoch kaum zu beobachten.

Beide Theorien, IE und IL, beschreiben den Vorgang des *exon shuffling*, d. h. die Kombination bestehender Exons zu neuen Proteinen. Während dies bei der IE Theorie die Grundlage für die Entstehung von Proteinen aus Modulen ist, geht die IL Theorie von langen ursprünglichen Genen aus, das *exon shuffling* taucht erst spät in der Evolution während der Entwicklung komplexer eukaryotischer Gene auf.

Eine Korrelation zwischen der Position von Introns und der Lage von Protein-Modulgrenzen wurde z.B. für die Triosephosphatisomerase vorgeschlagen (Marchionni und Gilbert, 1986). Es gibt jedoch auch viele Ausnahmen, wo Introns innerhalb von Proteindomänen vorkommen.

Neuere Analysen zeigen, dass nur Introns, die in Phase 0, also zwischen zwei Kodons, liegen, eine Korrelation mit Modulgrenzen aufweisen (Souza et al., 1998, Roy et al., 1999). Interessanterweise liegen die beiden konservierten Intronpositionen zwischen den *TPT*- und *PPT*-Genen zwischen zwei Kodons, also in der 0-Phase (Tab. 3.2). Außerdem umschließen sie genau zwei Membranspannen, was möglicherweise als zusammenhängendes strukturelles „Modul“ angesehen werden kann.

Es wurde gezeigt, dass es wahrscheinlich zwei verschiedene Arten von Phase-0-Introns gibt. Solche, die eher ursprünglich sind und zwischen verschiedenen phylogenetischen Reichen an gleicher Position vorkommen, korrelieren mehr mit Modulgrenzen als die übrigen Phase-0-Introns (Roy et al., 1999). Federov et al. (2001) konnten für eine Untergruppe von Phase-0-Introns ohne prokaryotischen Gegenpart keine Korrelation von Intronposition und 3D-Struktur finden, jedoch eine Antikorrelation von Phase-1-Intronpositionen mit Modulgrenzen: solche Introns zeigten eine Präferenz für die Mitte von Modulen. Erklärbar ist dieses Phänomen mit der Präferenz von Phase-1-Introns für die Lage innerhalb Glyzin-Kodons bzw. zwischen GG Sequenzen. Long und Rosenberg (2000) fanden heraus, dass GG oder AGG-Sequenzen die besten Kandidaten für sog. Protospleißstellen sind. Daher sind viele Phase-1-Introns oder „moderne Introns“ nach der IL Theorie in für Glyzin (GGN) kodierende GG-Protospleißstellen inseriert. Dass diese innerhalb von Modulen liegen, hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass Glyzin als kleinste der Aminosäuren eine besondere Bedeutung für die Proteinfaltung besitzt und Glyzine daher häufig mitten innerhalb von strukturellen Einheiten liegen (Federov et al., 2001). Tatsächlich sind alle Phase-1-Introns, welche in *AtPT*-Genen vorkommen (Introns 5, 6 und 10 des *AtTPT*, Intron 8 der *AtPPTs* und Intron 2 der *AtGPTs*), nach dem ersten G einer GGN Nukleotidfolge lokalisiert.

Mittlerweile gehen Tendenzen dahin, IE und IL nicht mehr als getrennte, sich widersprechende Theorien anzusehen, sondern als unterschiedliche Stationen der Exon-Intronstrukturentwicklung (Trotman, 1998). Während IE eher versucht, den Ursprung von Introns zu erklären, wobei durch die Limitation der weiterlaufenden Evolution ein Beweis für die ursprüngliche Genstruktur schwierig zu ermitteln ist, konzentrieren sich die Erklärungsversuche der IL-Theorie mehr auf die Mechanismen von Intronerwerb und -deletion. Wenn man die Vorgänge von *exon shuffling* über Modulgrenzen von Phase-0-Introns, Deletionen durch Genkonversion, *slippage*- und *sliding*- Vorgänge und die Insertion neuer Introns zusammennimmt, ist die Koexistenz ursprünglicher und neu erworbener Introns durchaus denkbar.

Endgültige Aussagen über die Herkunft und Entwicklung von PT-Introns lassen sich aufgrund unvollständiger Daten, hauptsächlich wegen des Fehlens von Daten zur Exon-Intron-Stuktur von ursprünglichen PT-homologen Genen, hier nicht treffen.

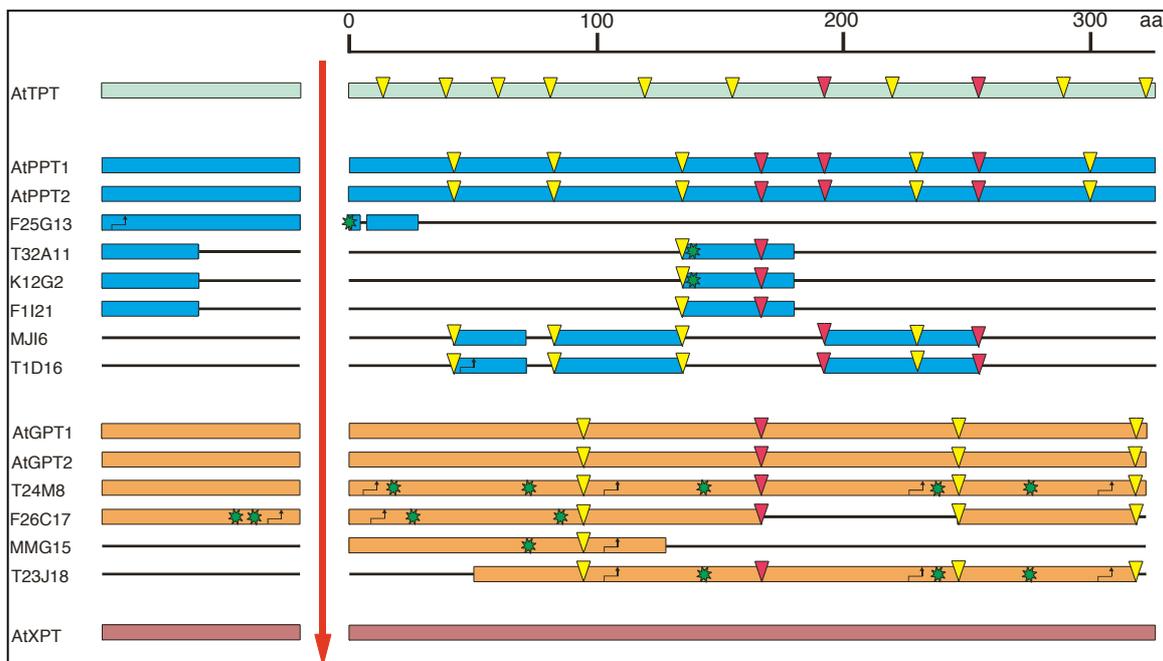


Abb. 4.2: Vergleich der Exon- und Intronstrukturen der Phosphattranslokatorgene sowie der PT-Pseudogene. Intronpositionen sind durch Dreiecke symbolisiert, rote Dreiecke bedeuten, dass die Intronpositionen zwischen zwei Klassen konserviert sind. Die zu den funktionellen PTs homologen Bereiche sind in den Pseudogenen durch durchgehende Balken dargestellt. Versetzte Pfeile bedeuten Leserasterverschiebungen, Sterne stehen für Stoppcodons. Der senkrechte rote Pfeil markiert die Stelle, an der das Transitpeptid abgespalten wird.

4.3.2. Die PT-Pseudogene

In *A. thaliana* liegen nur 35% aller Proteine als Einzelproteine vor. Der Anteil an Proteinen, die zu Genfamilien mit mehr als fünf Mitgliedern gehören, ist mit 37% signifikant höher als z. B. in *Drosophila* (12.1%) oder *C. elegans* (24%) (AGI, 2000).

Entscheidend verantwortlich für die hohe Mitgliederzahl der Genfamilien dürfte die segmentale Duplikation des Arabidopsisgenoms sein. Ein *Alignment* der fünf Chromosomen untereinander ergab 24 große duplizierte Segmente von 100 kb und mehr; das entspricht 65.6 Mb oder 58% des Genoms. Viele der Duplikationen durchliefen weitere Veränderungen wie z. B. lokale Inversionen nach dem Duplikationsvorgang. Das Ausmaß der Sequenzkonservierung der 17–193 duplizierten Gene variiert stark. 37% der Sequenzen sind mit $E < 10^{-30}$ streng konserviert, weitere 10% mit $E < 10^{-5}$ ebenfalls fast identisch erhalten (AGI, 2000). In vielen Fällen unterscheidet sich die Kopienzahl eines Gens und seiner duplizierten Version, so dass beispielsweise nur eine Kopie auf einem Chromosom liegt, auf einem anderen dagegen mehrere. Gründe dafür könnten Tandemduplikationen oder Genverlust nach der segmentalen Duplikation sein.

Nach Duplikation eines Gens bestehen für die weitere Evolution der Sequenz mehrere Möglichkeiten. Die homologe Kopie kann durch *silencing* stillgelegt werden (Li, 1980); dies scheint jedoch relativ selten zu passieren (Force, 1999). Stattdessen beobachtet man einen Langzeiterhalt beider Kopien während der Evolution (Nadeau und Sankoff, 1997). Getrennte Kopien können entweder in gleichen oder mit verschiedenen Raten evolvieren, letzteres eventuell wegen funktioneller Divergenz oder Pseudogenisierung eines redundanten Locus. Duplizierte Gene können auch durch einen konzertierten evolutionären Mechanismus wie Interlocusrekombination oder Genkonversion interagieren (Cronn et al., 1999).

Wenn man die PT-Gene und ihre nichtfunktionellen homologen Sequenzen betrachtet, fällt zunächst die große Anzahl an Pseudogenen innerhalb der Phosphatranslokator-Genfamilie auf: Sechs Genen stehen zehn Pseudogene gegenüber. Diese lassen sich zwei der Phosphatranslokator-Klassen zuordnen: Es gibt vier GPT-Pseudogene sowie sechs PPT-Pseudogene. In anderen beschriebenen Genfamilien liegt das Gewicht des Verhältnisses funktioneller Gene zu Pseudogenen mehr auf der Seite der echten Gene (Baumbusch et al., 2001; Johanson et al., 2001). Generell wird für *A. thaliana* eher eine geringe Anzahl von Pseudogenen angenommen (Blanc et al., 2000). Dabei ist es allerdings möglich, dass bei genauer Analyse die Anzahl der Pseudogene nach oben korrigiert werden muss, weil z. B. Leserasterverschiebungen nicht unbedingt von Generkennungsprogrammen identifiziert werden können oder Stoppkodons häufig automatisch in „Introns“ verlegt werden. So sind z. B. bei Jack et al. (2001) die PT-Pseudogene z. T. als *orf* (*open reading frame*) innerhalb der sog. TPT-Genfamilie, welche hier sämtliche

Phosphattranslokatorgenklassen umfasst, bezeichnet und nicht als Pseudogene erkannt worden.

Die vier verschiedenen Klassen der Phosphattranslokatoren entstanden wahrscheinlich schon vor der Aufspaltung der Angiospermen, da sie in den unterschiedlichsten Pflanzen vorkommen und die Homologie zwischen Proteinen einer PT-Klasse aus unterschiedlichen Pflanzen mit bis zu 85% wesentlich höher ist als die Aminosäure-Identität von PT-Proteinen verschiedener Klassen innerhalb einer Pflanze. Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass auch in anderen Pflanzen mindestens je zwei GPT- und PPT-Proteine exprimiert werden (Fischer und Ludewig, unveröffentlichte Ergebnisse). Die beiden *AtPPT*- und *AtGPT*-Gene sind daher wahrscheinlich nicht durch Duplikationsvorgänge innerhalb des *A. thaliana*-Genoms entstanden, sondern bereits zuvor. Ob dies auch für die Pseudogene gilt, ist unklar. Bisher wurden kaum *PT*-Pseudogene in anderen Pflanzen identifiziert; in *Solanum tuberosum* wurde ein mögliches Pseudogen gefunden (Ludewig, unveröffentlichte Ergebnisse). Die ungewöhnlich hohe Anzahl an *PT*-Pseudogenen, welche nicht in Tandemduplikationen vorliegen und die untereinander sehr homolog sind sowie über alle Chromosomen verteilt liegen (Abb. 4.3), legt nahe, dass eventuell TEs an ihrer Entstehung beteiligt sein könnten.

Das *A. thaliana*-Genom enthält mit ca. 10% des Genoms eine vergleichsweise geringe Anzahl an TEs (AGI, 2000), während bei Mais TEs 50% des Genoms ausmachen (Gaut et al., 2000). Damit sind Retrotransposons eine Hauptursache für die enorme Größenvariation von Pflanzengenomen, die von 10^8 bp bei *A. thaliana* bis zu 10^{11} bp bei manchen Lilienarten reicht (San Miguel et al., 1996).

Die Klasse II-TEs oder Retrotransposons lassen sich unterteilen in LTR (*long terminal repeat*)-Retrotransposons und non-LTR-Retrotransposons. Zu ersteren gehören die bereits erwähnten *Ty1-copia* und *Ty3-gypsy* Elemente, welche Strukturen besitzen, die jenen der Retroviren ähnlich sind (Flavell, 1992; Kumar und Bennetzen, 1999). Kürzlich wurde von Witte et al. (2001) eine neue Gruppe von LTR-Transposons, die in Monokotylen und Dikotylen vorkommt, beschrieben. Diese sog. TRIM-Elemente (*terminal-repeat retrotransposon in miniature*) besitzen an ihren Enden ca. 100 bis 250 bp lange Sequenzwiederholungen, die eine interne Domäne von 100-300 bp umschließen. Die TRIM-Elemente sind nicht autonom mobil. Interessanterweise wurde hier ein Fall beschrieben, in dem ein zelluläres Gen an eine neue Stelle auf einem Chromosom transduziert wurde. Innerhalb eines *Katydid-At1*-Elements, welches zu den TRIMs zählt, wurde die Sequenz eines NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*)-Gens gefunden. Die NMD-Sequenz ist homolog zu einem funktionellen NMD-Gen in *A. thaliana*, es fehlen aber Fragmente des ersten und des zweiten Exons, und die Sequenz enthält keine Introns mehr. Wahrscheinlich entstand diese Struktur durch Rekombination eines *Katydid*-Elements mit einer NMD mRNA während des Transpositionsprozesses (Witte et al., 2001). Die Transduktion eines zellulären Gens wurde in Pflanzen bisher nur in einem anderen Fall beschrieben, und zwar für das *Bs1* Element aus Mais (Elrouby und Bureau, 2001). Beim *Bs1* Element handelt es sich

entweder um ein LTR-Retrotransposon oder ein defektes Retroviruselement. Durch *Bs1* wurden Segmente von mindestens drei zellulären Genen transduziert. Dabei wiesen die Genfragmente im Vergleich zu ihren funktionellen Homologen große Deletionen auf und besaßen keine Introns. Die Homologie zu den zellulären Genen betrug zwischen 81% und 88%.

Non-LTR-Retrotransposons, denen die terminalen Sequenzwiederholungen fehlen, unterteilen sich in LINEs (*long interspersed nuclear elements*) und SINEs (*short interspersed nuclear elements*). LINEs werden als die ursprünglichsten Retrotransposons in Pflanzengenomen angesehen. Sie sind zur autonomen Transposition in der Lage, im Gegensatz zu SINEs, welche auf den reverse Transkription durch Enzyme anderer Retrotransposons angewiesen sind. Es wurde gezeigt, dass non-LTR-Retrotransposons zur Biodiversität der Organismen beigetragen haben können. Die Sequenz LINE L1 des Menschen kann Sequenzen, die in ihrem 3'-Bereich liegen, an andere Stellen im Genom transferieren. Dadurch, dass LINE L1 so als Vehikel genomische Sequenzen wie Exons oder Promoter an neue Positionen bzw. in existierende Gene befördert, trägt es zur Evolution neuer Gene - oder zur Bildung von Pseudogenen - bei (Moran et al., 1999).

In der unmittelbaren Nachbarschaft des *PPT1* wurde ein Element mit LINE Homologie identifiziert. Von *PPT1* stammen wahrscheinlich alle *PPT*-Pseudogene ab, da die Homologie der *PPT*-Pseudogene zu diesem Gen signifikant höher ist als zu *PPT2* (Tab. 3.5). Angrenzend an *PPT2* wurden keine Transposonsequenzen gefunden. Besonders die *PPT*-Pseudogene sind untereinander auffallend homolog. Die Sequenzen F1I21 (Chromosom 1), T32A11 (Chromosom 3) und K12G2 (Chromosom 5) sind nicht nur auf Aminosäureebene zu über 95% identisch (Abb. 4.2, Tab. 3.3), sie gehören auch strukturell zu einer Gruppe (Abb. 4.1). Da sie sich nicht sehr weit auseinander entwickelt haben, fand der Duplikationsvorgang wahrscheinlich erst vor relativ kurzer Zeit statt. Die Sequenzen enthalten Introns, was für Transpositionsvorgänge, in die LTR-Elemente involviert sind, bisher nicht beschrieben wurde. Wahrscheinlicher ist daher eventuell eine Transposition durch ein non-LTR Element, z B. ein LINE-Element (s.o.).

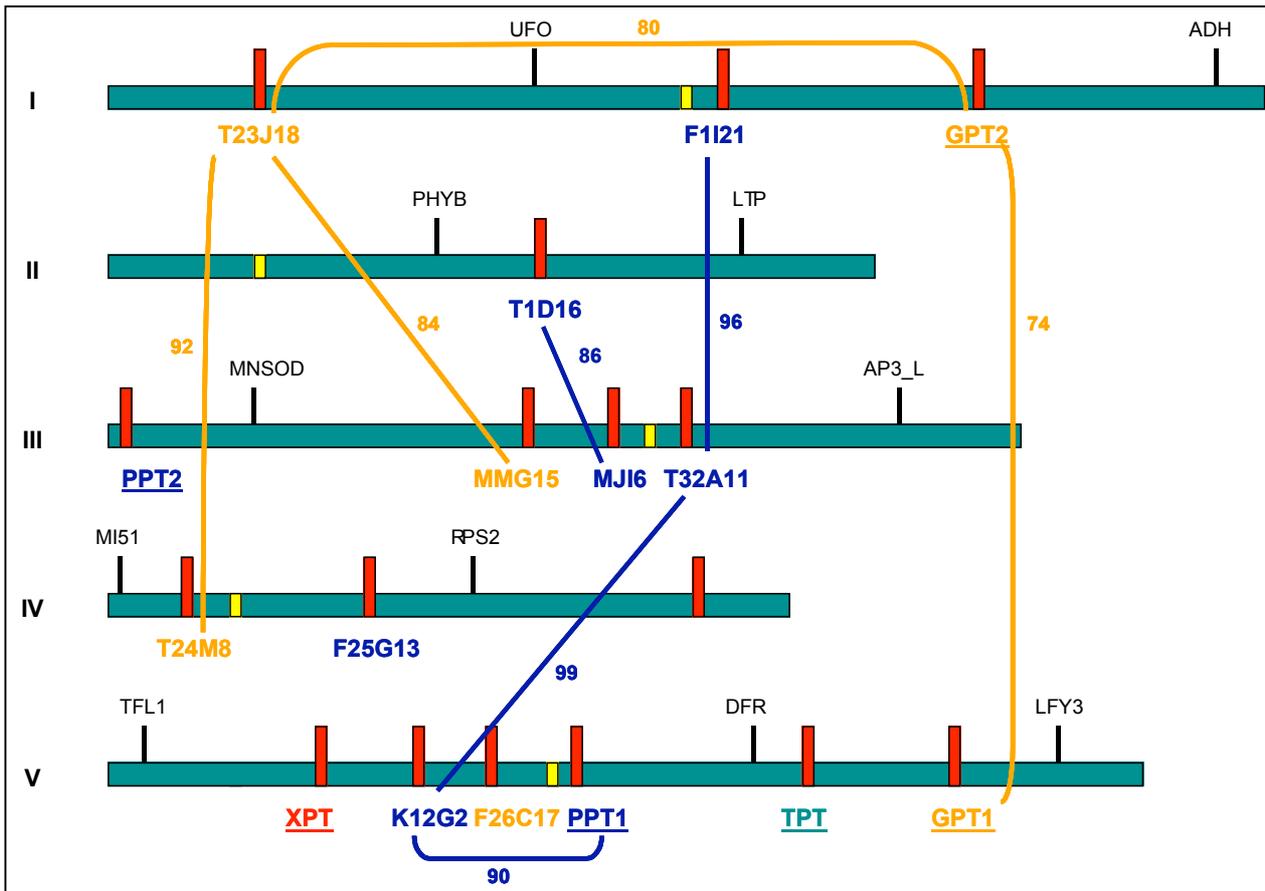


Abb. 4.3: Darstellung der Lage der Phosphattranslokatorgenen und -pseudogene auf den *A. thaliana*- Chromosomen. Die Zentromere der Chromosomen sind gelb markiert. Positionen, an denen ein PT-Gen oder -Pseudogen lokalisiert ist, sind durch rote Balken hervorgehoben. Untereinander sehr homologe Sequenzen sind durch Striche verbunden, an denen die Homologie in % angegeben ist. Gene und Pseudogene einer Klasse sind in der gleichen Farbe dargestellt: TPT: grün, XPT: rot, GPT und entsprechende Pseudogene: orange, PPT und PPT-Pseudogene: blau.

4.4. Funktionen der Phosphattranslokatoren

4.4.1. Die Funktion des GPT in *A. thaliana*

4.4.1.1. Charakterisierung des AtGPT1 als Glukose 6-Phosphattransporter

Eine Expression des *AtGPT1*-Gens konnte in allen Gewebetypen von *A. thaliana* detektiert werden. Transkripte ließen sich sowohl über *Northern Blot* Analysen als auch durch RT-PCR nachweisen. *GPT1*-Prom::GUS-Pflanzen zeigten eine gleichmäßige Färbung der Blätter. In der Wurzel war die Färbung in den Wurzelspitzen und sich entwickelnden Seitenwurzeln ausgeprägt (Abb. 3.21).

Messungen der Transporteigenschaften der heterolog exprimierten und gereinigten AtGPTs ergaben, dass beide Translokatoren Glk6P zu transportieren vermögen

(Abb. 3.36). Die Substratspezifitäten der AtGPTs ähneln denen des zuvor charakterisierten GPTs aus Erbsenwurzeln (PsGPT, Kammerer et al., 1998). Auffällig ist nur die wesentlich geringere Affinität des AtGPT1 zu Triosephosphaten. Trotzdem sind beide GPT-Proteine aus *A. thaliana* offensichtlich funktionelle GPTs (Tab. 4.1).

Dies führt zu der Frage, wie man sich den Phänotyp der *pgi1*-Mutante erklären kann. Das Fehlen der plastidären PGI führt hier zu einem Defekt in der Stärkeakkumulation der Blätter (Yu et al., 2000). Allerdings weisen die Blätter nach Belichtung einen sehr geringen Stärkegehalt auf. Da das Gen in der Mutante nur eine Punktmutation besitzt, hat die plastidäre PGI noch eine Restaktivität von 2-6.5% (Yu et al., 2000). Es ist andererseits auch möglich, dass die leichte Stärkeakkumulation auf die Aktivität eines endogenen GPT (AtGPT1) zurückzuführen ist. Ob dies tatsächlich der Fall ist, könnte durch eine *pgi*-Mutante geklärt werden, in der die plastidäre PGI vollständig inaktiv ist. Das Unvermögen, innerhalb des Plastiden für eine normale Stärkesynthese ausreichende Mengen Glk6P aus Fruk6P bereitzustellen, kann durch einen funktionellen GPT, welcher Glk6P aus dem Zytosol importiert und damit die Reaktion der PGI umgeht, kompensiert werden (Abb. 4.4). Dass sowohl der Erbsenwurzel-GPT als auch die beiden *A. thaliana* GPTs bei Überexpression hierzu in der Lage sind, wurde durch die Komplementation der Mutante gezeigt (Abb. 3.38-3.40).

	PsGPT	AtGPT1	AtGPT2
P_i	100	100	100
DAP	112 +/- 5	48 +/- 14	106 +/- 17
3PGA	50 +/- 1	88 +/- 9	61 +/- 10
PEP	20 +/- 1	35 +/- 10	41 +/- 4
G6P	90 +/- 9	116 +/- 20	103 +/- 5

Tab. 4.1: Bestimmung der Substratspezifitäten rekombinanter, in Hefe exprimierter GPTs.
Angaben in %.

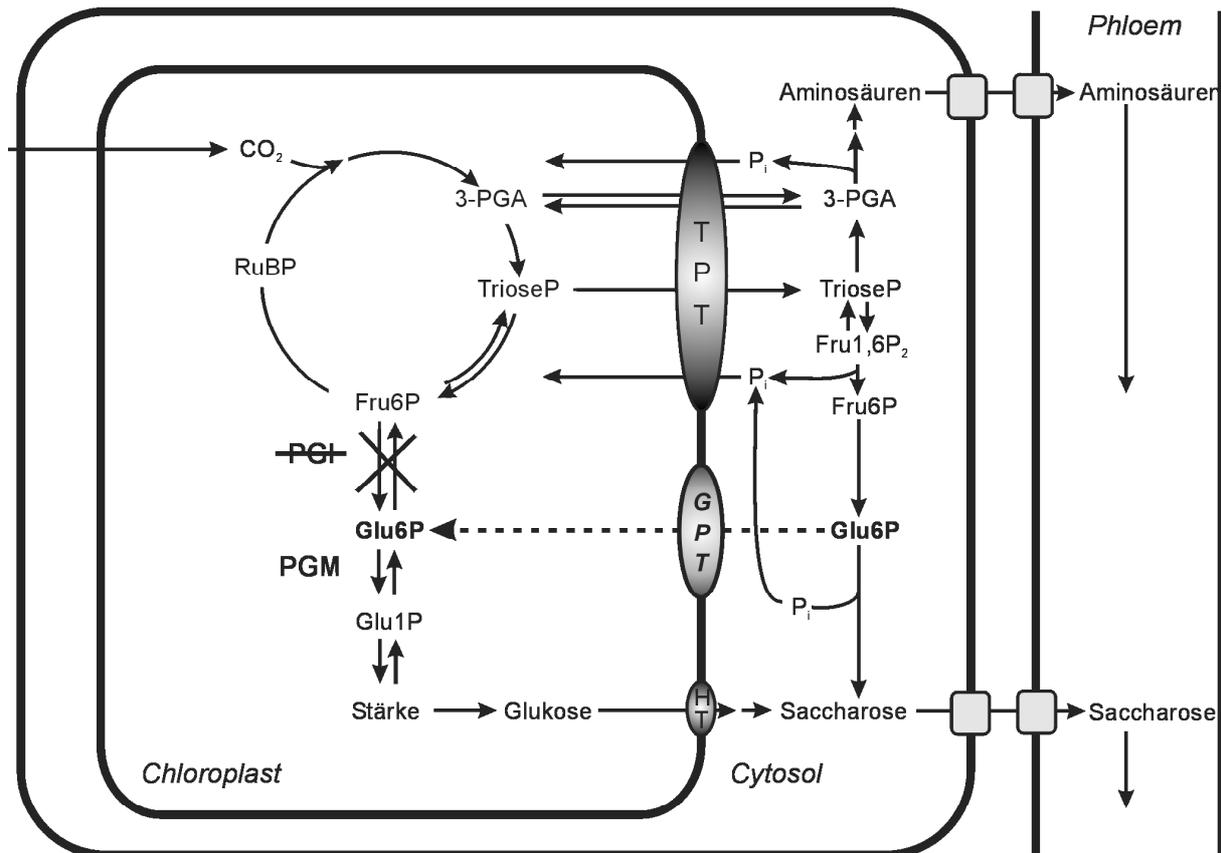


Abb. 4.4: Komplementation der *pgi1-1* Mutante durch Überexpression eines GPTs. Fru_{1,6}P₂: Fruktose-1,6-bisphosphat, Fru₆P: Fructose-6-phosphat, Glu₁P: Glukose-1-phosphat, Glu₆P: Glukose-6-phosphat, HAT: Hexosetransporter, PGA: 3-Phosphoglycerat, RuBP: Ribulose-1,5-bisphosphat, TrioseP: Triosephosphat.

4.4.1.2. Möglichkeiten der Regulation

Obwohl der endogene GPT1 in *A. thaliana* in Blättern des Wildtyps und der *pgi1-1* Mutante exprimiert ist, können die Chloroplasten offenbar nicht genügend Glk6P aus dem Zytosol aufnehmen, was durch den annähernd stärkefreien Blatt-Phänotyp der *pgi1-1* Mutante gezeigt wird. Auch ist in Plastiden von Blättern keine Glk6P Transportaktivität messbar (Abb. 3.37). Dies kann verschiedene Ursachen haben.

Eine Möglichkeit stellt die **metabolische Regulation** dar. Quick et al. zeigten, dass Plastiden abgetrennter Blätter von Spinat- und Kartoffelpflanzen neue Transporteigenschaften aufweisen, wenn die Blätter zuvor in Glukoselösung inkubiert wurden (Quick et al., 1995). Während in unbehandelten Kontrollblättern kein Glk6P in die Chloroplasten importiert werden konnten, waren die Glukosegefütterten Blätter nun dazu in der Lage. Dies deutet darauf hin, dass Plastiden dieser Blätter prinzipiell die Fähigkeit besitzen, Glk6P aufzunehmen, die Aktivität des entsprechenden Transporters aber durch äußere Bedingungen induziert werden muss. Daraus ergibt sich, dass ein entsprechendes Gen existieren muss, welches im Blatt exprimiert werden kann.

Aus heterotrophen Plastiden ist noch ein weiteres Beispiel für die Regulation des Glukose-6-Phosphat/Phosphattranslokators bekannt. Die Glk6P-Aufnahme von Plastiden aus *Brassica napus* wird durch geringe Konzentrationen langkettiger Acyl-Coenzym A Thioester inhibiert (Fox et al., 2000; Johnson et al., 2000). In *in vitro* Versuchen mit Plastiden aus *Brassica napus* Embryonen führte die Inkubation mit Acyl-CoAs zu niedrigeren Flüssen durch einige metabolische Wege. Die Fettsäuresynthese wurde um 74%, die Stärkesynthese und die oxidativen Reaktionen des OPP-Weges um 70% reduziert. Dies kann auf eine Inhibition des GPTs zurückgeführt werden. Der Effekt konnte durch Zugabe Acyl-CoA-bindender Proteine aufgehoben werden (Fox et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse wurden für Erbsenwurzelplastiden erhalten. Auch hier wurde der Glk6P Transport durch Acyl-CoAs einer Kettenlänge $>C_{12}$ drastisch reduziert (Fox et al., 2001). Außerdem wurde beobachtet, dass die Konzentrationen von Acyl-CoA bindendem Protein (ACBP) den Konzentrationen der Acyl-CoAs in späten Entwicklungsstadien von *B. napus* Embryonen entsprechen. Aus diesem Experiment wurde gefolgert, dass in Pflanzen die Balance der Konzentrationen von ACBP und Acyl-CoAs einen Mechanismus zur Regulation des Kohlenstoff-Flusses in Plastiden darstellen könnte (Fox et al., 2001). Für Chloroplasten wurden entsprechende Messungen bisher nicht durchgeführt. Als Erklärung dafür, dass in *A. thaliana* Blättern kein Glk6P Transport zu messen ist, scheidet diese Art von Inhibition allerdings wahrscheinlich aus, da im Präparationsmedium stets mindestens 1% BSA enthalten war, welches in der Lage ist, langkettige Acyl-CoAs zu binden und somit eine mögliche inhibitorische Wirkung auf den GPT in den Blättern auszuschließen (2.26.9.).

Da bisher nur die *GPT* mRNA, nicht jedoch das Protein nachgewiesen wurde, könnte es sich auch um **translationale Kontrolle** handeln. Die Degradationsraten von mRNAs höherer Pflanzen variieren stark und können durch eine Anzahl endogener und exogener Faktoren reguliert werden (Abler und Green, 1996). Besonders wurde dabei die Bedeutung AU-reicher Elemente (*AU-rich elements*, AREs) hervorgehoben. Ein anderes Element, *DSE* (*downstream element*), scheint exklusiv in Pflanzen wirksam zu sein (Johnson et al., 2000). Die Translation der mRNA an den Ribosomen ist eine weitere wichtige Möglichkeit der Genregulation in Pflanzen (Bailey-Serres, 1999). Sequenzelemente im 5'- oder 3'-nichttranslatierten Bereich können die Translation der mRNA beeinflussen. Entwicklung oder Umwelteinflüsse modulieren die Phosphorylierung von Komponenten der mRNA-bindenden 5'-Kappe, Ribosomen oder mRNA-bindender Proteine. Diese Modifizierungen können die Hierarchie der mRNAs, die um die Translation konkurrieren, verändern (Dinkova et al., 2000; Heilman et al., 2001; Proud, 2001).

Die **Stabilität des Proteins** hängt ebenfalls von verschiedenen Faktoren ab. Sawant et al. (2000) zeigten, dass Sequenzen stromabwärts des Initiator-ATGs bzw. die korrespondierenden Aminosäuren, eine Rolle für posttranslationale Vorgänge, d.h. für die Stabilität des Proteins, spielen können.

Die Bedeutung von Proteindegradation als Mechanismus, die zelluläre Proteinmenge zu regulieren, ist seit langem bekannt (Schimke und Doyle, 1970; Dice und Goldberg, 1975). Ein Ubiquitin/Proteasom-vermittelter Proteinabbau ist an vielen zellulären Prozessen, wie z. B. Zellzyklus, Wachstum sich entwickelnder Gewebe und Substratfluss durch metabolische Wege, entscheidend beteiligt (De Martino und Slaughter, 1999). Wie Ubiquitin können auch andere Polypeptidmarkierungen mit regulierender Funktion posttranslational durch verschiedene Konjugasen an Zielproteine fusioniert werden (Vierstra und Callis, 1999).

Ein weiterer Kontrollmechanismus ist die **Phosphorylierung**, ein Vorgang, der auch für pflanzliche Transporter beschrieben wurde (Delrot et al., 2000). Auf die Phosphorylierung kann die Bindung von 14-3-3 Proteinen folgen (Sehnke und Ferl, 2000; Kaiser und Huber, 2001), welche eine große Gruppe von Bindeproteinen mit vielfältigen Funktionen in Eukaryoten darstellen (Kaiser und Huber, 1994). Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist die Nitratreduktase (NR), die post-translational durch Bindung von inhibitorischen 14-3-3 Proteinen an die phosphorylierte Form der NR reguliert wird. Es kommt so z. B. als Antwort auf niedrige Lichtintensitäten zur schnellen Inaktivierung des Enzyms (MacKintosh, 1992). 14-3-3 Proteine konnten auch innerhalb von Plastiden gefunden werden und sind dort wahrscheinlich mit der Stärkesynthase (SS) III assoziiert (Sehnke et al., 2001). Mey und Soll (2000) berichteten kürzlich, dass 14-3-3 Proteine mit phosphorylierten plastidären Vorstufenproteinen interagieren. Es ist bekannt, dass eine Proteinkinase aus Erbsen-Mesophyllzellen sowie aus Weizenkeimlingen die Transitpeptide plastidärer Vorläuferproteine phosphoryliert, nicht aber solche mitochondrialer oder peroxisomaler Proteine (Waegemann und Soll, 1996). Phosphorylierte Proteine können nicht über die Plastidenmembran transloziert werden, so dass der Import nach der Erkennung durch einen Rezeptor bis zur Dephosphorylierung des Proteins gestoppt wird. Auf die Phosphorylierung der Proteine folgt die Assoziation zu einem hochmolekularen Komplex aus plastidärem Vorläuferprotein, 14-3-3 Proteinen und zytosolischem Hsp70; dies bringt kernkodierte Plastidenproteine in einen „Import-kompetenten“ Zustand (May und Soll, 2000), der allerdings eine Dephosphorylierung der Vorstufenproteine vor dem Translokationsschritt einschließt.

Die Phosphattranslokatoren enthalten in ihren Transitpeptiden mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen, AtGPT: acht, AtGPT2: sieben, AtTPT dagegen nur vier (Abb. 3.42). Möglicherweise wird die Aktivität des AtGPT1 im Mesophyll dadurch verhindert, dass er nicht in die Plastiden importiert wird. An diesem Prozess könnten die Phosphorylierung des Transitpeptids und das Fehlen oder Vorhandensein daran bindender 14-3-3 Proteine beteiligt sein. In *A. thaliana* wurden bereits viele 14-3-3 Protein-Isoformen gefunden (Wu et al., 1997), denen unterschiedliche, zum größten Teil noch nicht näher untersuchte Funktionen zugeordnet werden können. Zusätzliche potentielle Phosphorylierungsstellen sind

auch im reifen GPT-Protein enthalten; bei GPT1 sind dies wiederum mehr als bei GPT2 oder TPT.

4.4.1.3. Wird ein GPT im Mesophyll benötigt?

Bisher wurde angenommen, dass Glukose-6-Phosphattranslokatoren nur in heterotrophem Gewebe benötigt werden (Kammerer et al., 1998). Die Plastiden solcher Gewebe importieren Kohlehydrate und sind die Orte der Stärke- und Fettsäuresynthese. Da ihnen normalerweise eine Fruktose-1,6-Bisphosphatase-Aktivität fehlt, sind sie auf den Import zytosolischer Hexosephosphate angewiesen. Diese werden aus Saccharose, welche von *source*-Gewebe aus über das Phloem zu *sink*-Gewebe transportiert wird, synthetisiert. Vom Phloem aus gelangt die Saccharose entweder auf symplastischem Weg oder apoplasmatisch in die Zelle; die Spaltung in Hexosen geschieht durch eine Invertase oder die Saccharose Synthase (SuSy). Die Hexosen werden dann durch die Aktivität der Hexokinase in Hexosephosphate umgewandelt und über den GPT in die Plastiden importiert, wo sie in Stärke- oder Fettsäurebiosynthese einfließen oder als Substrat des OPP-Weges dienen (Flügge, 1999; Gerhardt et al., 1987).

Es ist umstritten, ob auch andere Hexosephosphate als Glk6P in Plastiden importiert werden. Einige heterotrophe Plastiden (z.B. aus Tomatenfrüchten und Weizenendosperm, Schünemann und Borchert, 1994; Tetlow et al., 1996) sind möglicherweise in der Lage, Glk1P aufzunehmen; die meisten anderen Plastiden importieren wahrscheinlich nur Glk6P. Für *A. thaliana* zeigte die Analyse einer Mutante, die einen Defekt in der plastidären PGM besitzt (Kofler et al., 2001), dass die Plastiden auf den Import auf Hexosephosphaten in Form von Glk6P angewiesen sind, da die Mutante völlig stärkefrei ist. In Erbsenpflanzen gibt es eine Mutante mit gleichem Defekt und Phänotyp (Harrison et al., 1998).

Der erste Schritt der Stärkesynthese ist die Bildung von ADP-Glukose aus Glukose-1-Phosphat und ATP (Preiss, 1991) durch die ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase). Es sind verschiedene Isoformen dieses Enzyms bekannt (Cognata et al., 1995). In photoautotrophen Geweben ist die AGPase ausschließlich in Plastiden lokalisiert (Okita, 1992). Dies gilt auch für viele heterotrophe Gewebe (Enwistle und ap Rees, 1988; Smith, 1988). Allerdings wurde im Endosperm von Mais und Gerste ein größerer Anteil der AGPase-Aktivität im Zytosol gefunden (Denyer et al., 1996; Thorbjørnsen et al., 1996). Maismutanten, denen die große (*shrunk-2*, *sh2*) oder kleine Untereinheit (*brittle-2*, *bt2*) einer AGPase ohne Transitpeptid fehlt, weisen noch eine Restaktivität der AGPase auf, welche auf die plastidäre AGPase zurückzuführen ist (Giroux und Hannah, 1994). Die beschriebenen Mutanten besitzen stark reduzierte Stärkegehalte. Anscheinend stellt die zytosolische AGPase in Mais und Gerste einen wesentlichen Anteil der ADP-Glukose für die plastidäre Stärkesynthese zur Verfügung. Daher ist auch ein Aufnahmesystem für ADP-Glukose in der Plastidenmembran zu fordern. Pozueto-Romero et al. (1991) und Möhlmann et al. (1997) zeigten, dass externe ADP-Glukose ein effizientes Substrat für die

Stärkesynthese in Ahorn-Zellkulturen bzw. Maisplastiden darstellt, während Glk6P kaum eingebaut wird. Die Funktion des ADP-Glukosetransporters wird in Mais dem Brittle-1 Protein, welches mit plastidären Hüllmembranen assoziiert ist, zugewiesen (Sullivan und Kaneko, 1995). Mutanten im *Brittle-1* Locus zeigen eine deutliche Reduktion der ADP-Glukose-abhängigen Stärkesynthese isolierter Plastiden (Shannon et al, 1998). In den zuletzt genannten Fällen scheint die Hauptfunktion des GPTs also nicht in der Stärkesynthese zu liegen.

Während in Speichergeweben die Stärkesynthese kontinuierlich verläuft, akkumulieren Plastiden der Blätter tagsüber transitorische Stärke, welche dann nachts degradiert wird, um Stroma und Zytosol mit Kohlehydraten für verschiedene anabolische Reaktionen zu versorgen. Der Stärkeabbau kann amylolytisch oder phosphorylytisch verlaufen, dabei entstehen entweder Maltodextrine, Maltose und Glukose oder Hexose- und Triosephosphate. Die Produkte des phosphorylytischen Stärkeabbaus könnten durch einen Phosphattranslokator exportiert werden, der Transport von Glukose läuft über einen Glukosetransporter, für Maltose gibt es wahrscheinlich ebenfalls ein Transportsystem (Rost et al., 1996).

Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass der Kohlenstoff die Plastiden nachts bevorzugt in Form von Hexosen und nicht als Hexosephosphat verlässt. *Antisense-TPT*-Kartoffelpflanzen akkumulieren tagsüber Stärke auf Kosten der Saccharosesynthese, nachts wird die Stärke verstärkt mobilisiert, und die Produkte des Stärkeabbaus werden in Form von Glukose ins Zytosol transportiert (Heinecke et al., 1994; Häusler et al., 1998). NMR-Daten bestätigen, dass beim nächtlichen Abbau transitorischer Stärke Glukose entsteht, die dann exportiert wird (Schleucher et al., 1998). Der dazu notwendige Glukosetransporter wurde in *A. thaliana* mittlerweile identifiziert (Weber et al., 2000).

Um die Eingangsfrage nach der Notwendigkeit des AtGTP1 im Mesophyll zu beantworten, ist festzustellen, dass ein funktionierender GPT augenscheinlich für den Metabolismus im Blatt nicht unbedingt nötig ist. Möglicherweise kommt dem Protein (wenn vorhanden) eine Art „Standby-Funktion“ zu, die unter bestimmten Umwelt- oder Entwicklungsbedingungen „eingeschaltet“ bzw. induziert werden kann (s.o.).

4.4.1.4. Wird ein GPT in Wurzeln benötigt?

Es wird angenommen, dass in Pflanzen die Wurzelspitzen der Ort der Graviperzeption sind (Sack, 1991). Als zentrale Region der Wurzelspitze besitzt die Columella eine besondere Bedeutung bei der Wahrnehmung der Schwerkraft durch die Pflanze. Nach der Stärke-Statolithen-Theorie beginnt die Graviperzeption der Pflanze mit der Positionierung stärkehaltiger Plastiden innerhalb der Columella (Salisbury, 1993) und setzt dann verschiedene Prozesse in Gang. Da die Stärke in den Amyloplasten der Wurzelspitzen synthetisiert wird, müssen aus den oben genannten Gründen Kohlehydrate für die Stärkesynthese importiert werden. In Erbsenwurzeln geschieht dies über den GPT in Form von Glk6P (Kammerer et al., 1998).

Transportmessungen mit *A. thaliana* Wurzeln wurden bisher nicht durchgeführt. Die in den *AtGPT1*-Prom::GUS-Pflanzen sichtbare Expression in Wurzelspitzen weist auf eine Funktion des GPT in diesem Gewebe hin. Wie erwähnt, sind die Blätter der *pgi*-Mutante fast stärkefrei; die Wurzeln sind jedoch von der Mutation in der plastidären PGI nicht betroffen; hier kann die PGI über den GPT umgangen werden (Yu et al., 2000). Warum *AtGPT1* eventuell in Wurzeln, nicht jedoch in Blättern aktiv ist und ob vielleicht bestimmte Interaktionspartner eine Rolle spielen, muss noch untersucht werden.

4.4.1.5. GPT-Aktivität in Schließzellen

Schließzellen fehlt eine Fruktose-1,6-Bisphosphataseaktivität. Wie nicht-grüne Plastiden können sie daher keine Triosephosphate in Hexosephosphate umwandeln und sind auf den Import von Hexosephosphaten für die Stärkesynthese angewiesen. In Chloroplasten aus Schließzellen von *Pisum sativum* konnte eine Glk6P-Transportaktivität gemessen werden (Overlach et al., 1993). Während der Öffnung der Stomata wird die in den Plastiden gespeicherte Stärke mobilisiert und in Malat umgewandelt, welches als Gegenion für Kalium fungiert.

Transgene Pflanzen, die das *GPT1*-Prom::GUS Konstrukt exprimierten, zeigten zwar eine Färbung von Schließzellenchloroplasten, Plastiden des Mesophylls waren aber ebenfalls gefärbt. Um auszuschließen, dass die Färbung im Gesamtblatt auftrat, weil das verwendete Promotorfragment ein für die spezifische Expression wichtiges Element nicht enthielt, Transkripte des endogenen *AtGPT1* aber eigentlich nur in Schließzellen vorhanden sind, wurde ein Protokoll zur Anreicherung von Schließzellen-RNA für RT-PCR Experimente genutzt. Die Ergebnisse zeigten eine etwas höhere Expression des *GPT1* in Schließzellen im Vergleich zum Gesamtblatt (Abb. 3.16). Verwendet man mRNA aus gereinigten Schließzellen und mRNA aus Mesophyllprotoplasten für die RT-PCR, wird eine zwei- bis dreifach höhere *GPT1*-Expression in Schließzellen beobachtet (Ache, unveröffentlichte Ergebnisse). Da trotzdem signifikante Transkriptmengen im Mesophyll nachgewiesen werden konnten, kann die Regulation nicht ausschließlich auf die Transkriptionsebene beschränkt sein.

4.4.1.6. Die Funktion des GPT in Bündelscheidenzellen

Bei Färbungen der *AtGPT1*-Prom::GUS Pflanzen fiel auf, dass sich stets zuerst die Region um die Leitbündel blau färbte, ehe die Färbung nach längerer Inkubation auf das gesamte Blatt überging. Es ist bekannt, dass nicht nur C₄-Pflanzen unterschiedliche Plastiden im Mesophyll und den das Leitgewebe umgebenden Zellen, der Bündelscheide, besitzen (Kinsman und Pyke, 1998). Den Bündelscheidenzellen werden verschiedene Funktionen zugeschrieben, die vom Transport von Wasser und Assimilaten über Speicherung bis zur mechanischen Unterstützung reichen (van Bel, 1993). Die Zellen sind schmaler und länglicher als Mesophyllzellen, sie enden mit Zell-Zellkontakt. In ihnen befinden sich 15% aller

Chloroplasten des Blattes (Pyke et al., 1991). Diese Plastiden sind kleiner als Mesophyllchloroplasten, und ihre Anzahl innerhalb einer Zelle ist geringer (Kinsman und Pyke, 1998). Außerdem bilden die Bündelscheidenzellen in C_3 -Pflanzen eine physiologische Stärkescheide (Williams, 1989; Franceschi und Giaquinta, 1983; Müller-Röber et al., 1994): die Plastiden enthalten mehr Stärke als die benachbarten Mesophyllzell-Chloroplasten. Diese Stärke wird in *A. thaliana* auch nachts nicht vollständig abgebaut (eigene Beobachtungen).

Da der Stoffwechsel der Bündelscheidenzellen noch nicht eingehend untersucht wurde, sich aber mit Sicherheit von dem des Mesophylls unterscheidet, ist eine Funktion für den GPT als Hexosephosphat Im- oder Exporter nicht auszuschließen. Solche Vorgänge wären mit der eingesetzten Methode der Rekonstitution von Membranproteinen aus dem Gesamtblatt nicht unbedingt messbar, da die Konzentrationen an aus Bündelscheiden stammenden Proteinen zu gering sein dürften.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass AtGPT1 wahrscheinlich in Wurzeln und Schließzellen für den Import von Glc6P verantwortlich zu sein scheint, seine Funktion bzw. Funktionalität im Mesophyll aber weiterhin erklärungsbedürftig ist.

Um festzustellen, ob ein GPT-Protein in *A. thaliana* Pflanzen in Blättern vorhanden ist, wurde ein Konstrukt hergestellt, in welchem der *GPT1*-Promotor mit der *GPT1*-cDNA fusioniert ist; vor dem Stoppkodon wurde die Sequenz für ein HA-Epitop (Chen et al., 1993) dreifach eingefügt. So ist es möglich, über einen HA-Antikörper ein eventuell gebildetes Fusionsprotein direkt in der Pflanze durch Immunlokalisation nachzuweisen. Das Konstrukt wurde bislang nicht in Pflanzen transformiert, daher liegen noch keine Ergebnisse vor.

4.4.2. Phosphattranslokatoren in sich entwickelnden Samen

Wie gezeigt (3.2.), sind alle sechs PT-Gene in Blüten und Schoten exprimiert, *AtGPT2* sogar ausschließlich in diesen Geweben. Offensichtlich besitzen die Phosphattranslokatoren eine entscheidende Bedeutung für die Embryo- und Samenentwicklung in *A. thaliana*. Bei Datenbanksuchen wurde als einziger EST des *GPT2*-Gens der Klon M9G1 gefunden, welcher aus einer cDNA-Bibliothek von sich entwickelnden *A. thaliana* Samen stammt (White et al., 2000).

Nach der Befruchtung senesziert die Blüte und differenziert sich zu einer Frucht, die verantwortlich für die Verteilung der Samen (reifen Embryos) ist. Während der Ovulenenwicklung verwandeln sich Embryosack, Endosperm und Zygote in den Samen. Frucht-, Samen-, Endosperm- und Embryoentwicklung benötigen unterschiedliche, exakt koordinierte genetische Programme, die essentiell für die folgende Entwicklung der neuen Sporophytengeneration sind (Goldberg et al., 1989). Es gibt verschiedene Ansätze, den Metabolismus während der Samenentwicklung zu

entschlüsseln. Eine Möglichkeit ist die Suche nach Mutanten, wobei man nach anormalen Samen oder nach Phänotypen sucht, die auf einen Defekt in der Embryogenese schließen lassen (McElver et al., 2001; Meinke 1994). Da die Plastiden der Ort der Speicherung in den Samen sind, geben Transportmessungen Aufschluss über die innerhalb des Plastiden verwendeten Substrate und die damit verbundenen Stoffwechselwege (Kang und Rawsthorne, 1994; Eastmond und Rawsthorne, 2000). White et al. (2000) stellten eine cDNA Bibliothek aus sich entwickelnden *A. thaliana* Samen her. Durch den Vergleich der gefundenen Sequenzen mit solchen aus Gesamtpflanzen-cDNA-Bibliotheken kann man Rückschlüsse auf die Bedeutung der einzelnen Gene für die Samenentwicklung ziehen. Die Analysen der Expression einer großen Anzahl von Genen wird durch die *Microarray*-Technik erleichtert. Ein von Girke et al. (2000) beschriebener *Microarray*-Chip basiert auf 10500 ESTs der zuvor erwähnten Samen-cDNA-Bibliothek.

Der sich entwickelnde Embryo muss mit Kohlehydraten versorgt werden. Saccharose ist die Transportform des durch die Photosynthese fixierten Kohlendioxids und muss in den Embryo importiert werden. Saccharose- und Hexosetransporter in der Epidermis des Embryos sind in diesen Vorgang involviert (Weber et al., 1997). In *A. thaliana* wurden zwei Saccharosetransporter in sich entwickelnden Samen gefunden, SUC1 und SUC2 (Sauer und Stolz; 1994, White 2000). *A. thaliana* gehört zu den Pflanzen, die Öle in den Samen akkumulieren. In reifen *A. thaliana* Samen sind Lipide in Form von Triacylglycerol die Hauptspeicherform des Kohlenstoffs und machen 30-40% des Trockengewichts aus (White, 2000). Die Samenentwicklung lässt sich in unterschiedliche Phasen einteilen, während derer es zu einem Wandel von anfänglicher Stärke- zur späteren Öllakkumulation kommt (Focks und Benning, 1998). An der Änderung der Verteilung von Öl und Stärke sind Veränderungen von Transportaktivitäten über die Plastidenmembran sowie der intraplastidäre und der zytosolische Metabolismus beteiligt.

Aufgaben des GPTs

Kang und Rawsthorne (1994) zeigten, dass neben Pyruvat auch Glk6P Kohlenstoffgerüste für die Fettsäuresynthese, die Stärkesynthese und den OPP-Weg in *B. napus*, ebenfalls ölspeichernd, liefert. Demnach muss in den Plastiden ein Transporter für Glk6P aktiv sein. Tatsächlich sind in *A. thaliana* beide GPTs in Schoten exprimiert (Abb. 3.10 und 3.21). Nach anfänglich hohen Aufnahmeraten von Glk6P beobachteten Kang und Rawsthorne (1994) eine 19-fache Zunahme der Aktivität eines plastidären Pyruvattransporters und gleichzeitig eine 25-fache Zunahme der Nutzung von Pyruvat für die Fettsäuresynthese. Über den gleichen Zeitraum sank die Fähigkeit der isolierten Plastiden, Glk6P als Substrat für die Fettsäuresynthese zu verwenden.

In der zuvor beschriebenen *A. thaliana* Samen-cDNA-Bibliothek wurden mehrere *GPT*-ESTs gefunden, allerdings kein EST mit Ähnlichkeiten zu einem bekannten Pyruvat- oder Monocarboxylattransporter. Daher wurde vorgeschlagen, dass in

A. thaliana der PPT die Plastiden mit PEP versorgt (Fischer et al., 1997), für den mehrere ESTs gefunden worden waren (White et al., 2000) (s.u).

Nach der ersten Entwicklungsphase der Samen sinkt die Transportaktivität des GPT sowie die Aktivität der glykolytischen Enzyme Aldolase, Phosphoglukomutase und Enolase; dies korreliert mit der Verringerung der Nutzung von Glk6P für die Fettsäure-Biosynthese. Insgesamt scheint die Funktion des AtGPT1 jedoch essentiell für die Embryogenese zu sein, da bisher keine homozygoten GPT1-Mutanten in *A. thaliana* erhalten werden konnten. Es wurde außerdem beobachtet, dass ein Viertel der Samen in Schoten heterozygoter Mutanten sind verkümmert waren (Anja Schneider, unveröffentlichte Ergebnisse). Offensichtlich kann der ebenfalls in Blüten und Schoten vorhandene AtGPT2 das Fehlen des AtGPT1 in sich entwickelnden Samen nicht kompensieren. Mit der Funktion in der Samenentwicklung erhält AtGPT1 hier neben möglichen Aufgaben in Wurzeln und Schließzellen eine zusätzliche Bedeutung.

In ölspeichernden Samen sollten Enzyme, die im Zusammenhang mit der Fettsäuresynthese stehen, mindestens so häufig vertreten sein wie Enzyme des Stärkemetabolismus. Die Analyse der Samen-EST-Bibliothek ergab, dass dies für die Ketoacyl-Acyl-Carrierproteinsynthase und die Acetyl-CoA-Carboxylase zutrifft; das Vorkommen anderer mit der Fettsäuresynthese in Zusammenhang stehender Enzyme unterscheidet sich aber nicht von Nicht-Samen-EST-Banken. Möglicherweise kommt es in Samen nur zu einem erhöhten Fluss durch diesen Weg anstelle einer Expressionsänderung. Dies zeigt, dass Expressionsanalysen allein unzureichend für eine Aufschlüsselung der Vorgänge sind. Da die Fettsäurebiosynthese in den *A. thaliana* Samen eine so ausgeprägte Rolle spielt, ist es weiterhin denkbar, dass der von Fox et al. (2000) beschriebenen Regulation von GPT-Proteinen durch langkettige Acyl-CoAs (s.o.) eine Aufgabe bei der Lenkung der Substratflüsse zukommt.

Aufgaben des PPTs

Pflanzen verfügen normalerweise über eine komplette Enzymausstattung für den glykolytischen Weg von Glukose zu Pyruvat im Zytosol (Plaxton, 1996). Auch in den Plastiden von Ölsamen konnte eine komplette Glykolyse beobachtet werden (Dennis und Miernyk, 1982; Kang und Rawsthorne, 1994). Es ist jedoch unklar, welchen Anteil beide Kompartimente an der Umsetzung von Kohlehydraten zu Vorläufern der Fettsäurebiosynthese haben. ESTs der plastidären Formen wurden nicht für alle der glykolytischen Enzyme gefunden, der zytosolische Weg scheint also aktiver zu sein (White et al., 2000). Eine hohe Expression der plastidären Pyruvatkinase und eine starke Expression eines PPTs (wobei aus den Daten von White et al. (2000) nicht hervorgeht, ob es sich um PPT1 oder PPT2 handelt) weisen auf eine Route des Kohlenstoffs ausgehend von Saccharose zu den Vorläufern der Fettsäurebiosynthese über den zytosolischen Glykolyseweg bis zum PEP hin, welches dann in die Plastiden importiert und in Pyruvat umgewandelt wird. Dazu passend wurden in der Samen-EST-Bibliothek zweimal mehr plastidäre Isoformen der Pyruvat-DH im

Vergleich zur mitochondrialen gefunden, während in Gesamtpflanzen-EST-Datenbanken die Anzahl beider Isoformen ungefähr gleich ist (White et al., 2001).

Für einen PPT in heterotrophen Geweben wurde noch eine weitere Aufgabe vorgeschlagen: Da gezeigt wurde, dass in Chloroplasten von C₃-Pflanzen eine PPDK vorhanden ist (Schnabl, 1981), kann die kombinierte Aktion von PPDK und PEP-Carboxylase zur Zurückgewinnung von CO₂ dienen, welches durch die Respiration verloren geht (Fischer et al., 1997).

Beide *AtPPTs* sind in sich entwickelnden Schoten exprimiert. Auch in Pollenkörnern konnte in den entsprechenden *PPT*-Prom::GUS-Pflanzen eine Expression detektiert werden. Da der Ausfall des *AtPPT1* in den *cue*-Mutanten nicht letal ist und sich keimfähige Samen bilden, ist dieses Protein entweder nicht essentiell für die Embryogenese, oder seine Funktion kann durch einen anderen Transporter, z.B. den *AtPPT2*, übernommen werden.

Vorkommen des TPTs in Samen von *A. thaliana*

Außer Kohlenstoffgerüsten wird für die Fettsäurebiosynthese noch pro Molekül Fettsäure die doppelte Menge an reduziertem NADPH benötigt (Ohlrogge et al., 1993). In heterotrophen Plastiden können diese durch die Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion, die Anfangsreaktionen des Oxidativen Pentosephosphat(OPP)-Weges oder, da Plastiden aus sich entwickelnden *A. thaliana* Samen transient grün sind, durch das Photosystem II hergestellt werden. Für die photosynthetische Aktivität von Blüten und Schoten spricht auch die in dieser Arbeit beobachtete Expression des *AtTPT* in diesen Geweben. White et al. (2000) fanden in ihrer Samen-cDNA-Bibliothek ebenfalls einen TPT-EST.

Mögliche Funktion des XPTs in der Samenentwicklung

In *B. napus* Embryonen wurden Hinweise auf die Funktion des OPP-Weges für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten gefunden. So steigen die Aktivität des OPP-Weges und der Fluss von Glk6P in diesen Weg mit der Rate der Speicherölkumulation in den Embryonen an. Werden Plastiden in einem Glk6P-haltigen Medium inkubiert, wird die Aktivität des plastidären OPP-Weges durch die Anwesenheit von Pyruvat stimuliert. Dies gilt allerdings nur für Stadien, in denen der Wechsel von der Stärke- zur FS-Synthese schon vollzogen ist.

Da Transkripte des kürzlich entdeckten *XPTs* ebenfalls in Samen detektiert wurden (Eicks et al., 2002), könnte dieses Protein einen zusätzlichen Weg eröffnen, den OPP-Weg mit Kohlenstoffgerüsten aus dem Zytosol (in Form von Xylulose 5-Phosphat) zu versorgen und so die Bildung von Reduktionsäquivalenten fördern.

Insgesamt stellt die Samenentwicklung damit ein Beispiel für entwicklungspezifische Änderung der Nutzung von Metaboliten in Plastiden eines Speicherorgans dar. Von diesen Änderungen sind, wie dargestellt, auch die Funktionen der Phosphattranslokatoren der inneren Plastidenhüllmembran

betroffen. Ihre genaue Rolle während der unterschiedlichen Phasen bedarf noch der detaillierten Untersuchung.

4.4.3. Mögliche Funktionen der AtPPTs

Der PPT versorgt die Plastiden mit Phosphoenolpyruvat, einem Substrat, welches sie nicht selber herstellen können, denn den meisten grünen Plastiden fehlt eine Phosphoglyzerat-Kinase- und/oder Enolase-Aktivität, sie können daher kein PEP aus 3-PGA bilden (Stitt und ap Rees, 1979; van der Straeten et al., 1991). Eine Ausnahme bilden, wie oben erwähnt, fettspeichernde Plastiden (Miernyk und Dennis, 1982). Innerhalb der Plastiden dient PEP zusammen mit Erythrose-4-Phosphat als Vorläufer der Biosynthese aromatischer Aminosäuren über den Shikimatweg. Dieser Stoffwechselweg ist bei Pflanzen ausschließlich in Plastiden lokalisiert (Herrmann und Weaver, 1999) und führt zur Synthese einer großen Anzahl von Sekundärmetaboliten wie Lignin, Alkaloiden, Flavonoiden und Anthozyanen (Schmid und Amrhein, 1995; Herrmann, 1995). Auf die mögliche Bedeutung des PPT im Rahmen des Fettsäurestoffwechsel wurde bereits eingegangen (4.4.2.). Zusätzlich zu Pyruvat kann PEP auch als Kohlenstoffgerüst für die Synthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin und Leucin dienen (Singh und Shaner, 1995).

4.4.3.1. Funktion des PPT1 in der Wurzel

Genau wie bei den *GPT1*-Prom::GUS Pflanzen stellt man auch bei *PPT1*-Prom::GUS und *PPT1*-Prom::GFP-Pflanzen ein starkes Expressionssignal in Wurzelspitzen fest (Abb. 3.22 und 3.24). Da diese Zellen stärkespeichernde Plastiden besitzen, kann man den Stoffwechsel der Columellazellen als den eines heterotrophen Speichergewebes verstehen. Eine mögliche Funktion des PPT ist hier neben der Produktion von Aminosäuren und Sekundärmetaboliten über den Shikimatweg möglicherweise auch in der Bereitstellung von ATP durch die Pyruvatkinase-Reaktion zu sehen (Qui et al., 1994).

4.4.3.2. Funktionen des PPT1 im Blatt und Komplementation einer PPT1 Mutante

Aufschlüsse über die Funktion eines Proteins erhält man zudem durch Analyse von Mutanten (Thornecroft et al., 2001; Bouché und Bouchez, 2001). Die zum PPT1 korrespondierende *cue1*-Mutante wurde ausführlich auf physiologischer und biochemischer Ebene untersucht (Streatfield et al., 1999; Voll, 2001). Dabei stellte sich heraus, dass die Gehalte an Anthozyanen und phenolischen Stoffen gegenüber Wildtyp-Pflanzen stark vermindert sind. Der Phänotyp der *cue1*-Mutanten konnte durch eine Fütterung mit aromatischen Aminosäuren komplett aufgehoben werden (Streatfield et al., 1999), was auf die zentrale Bedeutung eines funktionellen PPTs für

die Bildung von aromatischen Aminosäuren durch den Shikimatweg hinweist. Die *cue1*-Mutanten besitzen einen geringeren Gehalt an Phenylalanin als Wildtyp-Pflanzen (Voll, 2001). Diese Tatsache hat Auswirkungen den Sekundärstoffwechsel in den *cue1*-Mutanten. Die Gehalte an Plastochinon und Polyaminen sind reduziert (Voll, 2001); letzteren kommt eine Schutzfunktion für den Photosyntheseapparat (Subhan und Murphy, 2001) und eine Bedeutung für die Blühinduktion zu (Applewhite et al., 2000).

Beide AtPPTs wurden bisher nicht funktionell charakterisiert, etwa durch Transportmessungen mit rekombinanten, heterolog exprimierten Proteinen. Aufgrund der starken Homologien zu beschriebenen PEP-Translokatoren und der eindeutig gezeigten Lokalisation in Plastiden, kann man für den AtPPT1 davon ausgehen, dass es sich in jedem Fall um einen plastidären PEP-Transporter handelt (Abb.3.22).

Die *cue1-6* Mutante konnte durch Überexpression beider AtPPTs phänotypisch komplementiert werden. Die Komplementation durch PPT1 war dabei vollständig, es war kein Unterschied zu Wildtyp Col-O Pflanzen erkennbar. Dagegen zeigten junge Rosettenblätter der Pflanzen, die das *AtPPT2*-Konstrukt enthielten, einen an die *cue1-6* Mutanten erinnernden retikulierten Blattphänotyp und waren insgesamt etwas kleiner. Die Entwicklung der *cue1-6*/PPT2-Pflanzen war jedoch nicht verzögert gegenüber Wildtyp-Pflanzen (Abb.3.43). Die unvollständige Komplementation der *cue1-6* Mutanten durch AtPPT2 kann mehrere Ursachen haben.

1. Durch Sequenzierung wurde festgestellt, dass bei der Erstellung des Konstruktes über die erfolgte PCR-Reaktion eine Mutation eingefügt wurde. Diese ist im AtPPT2-Transitpeptid lokalisiert und führt zu einem Aminosäureaustausch (Threonin in Isoleucin), was möglicherweise zu einem fehlerhaften Import führt. Um diese Vermutung zu testen, müsste man ein neues, fehlerfreies Konstrukt herstellen und in *cue1-6* Mutanten transformieren.

2. Da der endogene *AtPPT2* laut RT-PCR und GUS-Expressionsdaten in allen Teilen des Blattes exprimiert, aber trotzdem nicht in der Lage ist, den *cue1*-Phänotyp zu verhindern, besteht auch die Möglichkeit, dass der Transporter vorzugsweise ein anderes Substrat als PEP transportiert und nur bei Überexpression nahezu ausreichende Mengen PEP in die Plastiden importiert. Dies müsste durch Transportexperimente mit heterolog exprimiertem AtPPT2-Protein geklärt werden. Die Funktion des AtPPT2 als PEP-Translokator wird zudem durch seine geringe Homologie zu AtPPT1 (nur 52%) und anderen bekannten PPTs aus verschiedenen Pflanzen in Frage gestellt.

3. Ein wesentlicher Unterschied zwischen der *AtPPT1*- und der *AtPPT2*-Expression ist die fehlende Expression des *AtPPT2* in der Wurzel. Daher könnte die Ursache für den retikulierten Blattphänotyp und die Komplementation des Phänotyps durch Überexpression eines PPT in der Mutante möglicherweise auch den Verhältnissen in der Wurzel und nicht in der fehlenden Expression eines der beiden PPT-Gene im Blatt zu suchen sein. Die Expression des *PPT1* in der Wurzel ist

besonders ausgeprägt entlang des Leitgewebes. Wurzeln sind in den *PPT1*-Prom::GFP-Pflanzen das Organ mit der stärksten Fluoreszenz. Eventuell ist die Expression durch den 35S-Promotor in dem *AtPPT2*-Konstrukt nicht stark genug in den leitgewebenahen Wurzelzellen für eine vollständige Komplementation. Es wurde bereits gezeigt, dass der 35S-Promoter nicht für eine gleichmäßig starke Expression in allen Gewebetypen und zu allen Entwicklungsstadien sorgt (Benfey und Chua, 1990). Daher ist unklar, ob z.B. vergleichbar viele *PPT2*-Transgen-Transkripte wie normalerweise *PPT1*-Transkripte beispielsweise im Xylem-Parenchym der Wurzel zu finden sind. Um diese Hypothese zu testen, müsste man *AtPPT2* unter der Kontrolle des *PPT1*-Promotors exprimieren und feststellen, ob die Komplementation dann vollständig ist.

4. Wenn man die Präsequenzen der beiden AtPPTs vergleicht, stellt man fest, dass sie sich sehr stark unterscheiden. Die Präsequenz des AtPPT2 ist mit ca. 50 Aminosäuren ungewöhnlich kurz. Alle anderen PTs aus *A. thaliana* besitzen Transitpeptide, die ungefähr 70-80 Aminosäuren lang sind. Verschiedene Vorhersageprogramme schlagen für die AtPPT2-Sequenz eine mitochondriale Lokalisation vor. So sagt z.B. das Programm „Predotar“, welches zwischen Lokalisation in Plastiden und Mitochondrien unterscheidet, für PPT1 mit 87% Wahrscheinlichkeit ein plastidäres Transitpeptid voraus, für PPT2 jedoch mit 98% Wahrscheinlichkeit ein mitochondriales Transitpeptid. Außerdem konnte man bei transgenen Pflanzen, die eine *PPT1*-Prom::GUS Fusion exprimieren, klar die Lokalisation des GUS-Signals in den Plastiden beobachten (Abb. 3.22), nicht aber bei *PPT2*-Prom::GUS-Pflanzen, obwohl das entsprechende Konstrukt ebenfalls die Sequenz für das putative Transitpeptid enthielt.

Es gibt Hinweise darauf, dass Proteine teilweise sowohl in Plastiden als auch in Mitochondrien geleitet werden (Peeters und Small, 2001). Die Präsequenzen kernkodierter Proteine beider Kompartimente ähneln sich. Es bestehen Mechanismen, die eine Fehl-Sortierung verhindern; dazu zählt beispielsweise die Phosphorylierung plastidärer Transitpeptide (s.ö.) und die Spezialisierung des Importapparates pflanzlicher Mitochondrien. Im Gegensatz zum TOM-Komplex der Hefe-Mitochondrien ist der pflanzliche Komplex in der Lage, zwischen plastidärem und mitochondrialem Transitpeptid zu unterscheiden (Macasev et al., 2000). Wird ein Protein stark exprimiert, wie das bei Überexpression für eine Komplementation geschieht, könnte möglicherweise ein signifikanter Anteil der Proteine in die Membran des falschen Organells integriert werden.

Zieht man die Möglichkeit einer mitochondrialen Lokalisation des PPT2 in Betracht, stellt sich die Frage nach der Funktion eines solchen Transporters in der Membran dieses Organells. Es ist bekannt, dass ein Pyruvattransporter das aus der Glykolyse stammende Pyruvat in die Mitochondrien transportiert, wo es durch die Pyruvatdehydrogenase in Acetyl-CoA umgewandelt und in den Zitronensäurezyklus eingespeist wird. Pyruvattransporter wurden u. a. aus den Mitochondrien von Hefe (Nalecz et al., 1991) und Rattenleber (Nalecz et al., 1992)

isoliert. Diese Transporter katalysieren jedoch wahrscheinlich keinen Austausch von PEP. Allerdings sind sowohl ein Import als auch ein Export von Phosphoenolpyruvat an Mitochondrienmembranen beschrieben worden. So zeigten Wiese et al. (1996), dass Mitochondrien aus der Leber von Ratte oder Kaninchen exogenes PEP und Acylcarnetin in Citrat umwandeln können. Und für Mitochondrien aus braunem Fettgewebe von Hamstern und Ratten wurde ein PEP-Efflux beschrieben (Drahota et al., 1983): In Gegenwart von Ketoglutarat und Malat wird PEP in der Matrix gebildet und aus den Mitochondrien exportiert. Die Autoren schlagen vor, dass Pyruvat-Carboxylase und PEP-Carboxykinase zusammen einen Phosphoenolpyruvat-*shuttle* bilden, durch welchen Energie, die im Zitronensäurezyklus der Mitochondrien gebildet wird, ins Zytosol exportiert werden kann. Es scheint nicht völlig geklärt zu sein, ob für den PEP-Transport ein Monocarboxylat-Transporter wie der Pyruvat-Carrier (Nalecz et al., 1991), ein Tricarboxylat-Transporter (Kaplan et al., 1993) oder ein eigenes Transportsystem verantwortlich ist. Für Pflanzen liegen diesbezüglich ebenfalls keine entsprechenden Daten vor. Eine Lokalisation oder Ko-Lokalisation des PPT2 in Mitochondrien ist allerdings nicht auszuschließen. Aufschlüsse darüber könnten beispielsweise die Untersuchung des Transitpeptids auf Phosphorylierung oder Importexperimente geben.

Vergleich des Expressionsmusters des PPT1 mit dem Phänotyp der *cue1*-Mutante:

Wenn man den Blattphänotyp der *cue1*-Mutanten mit dem *PPT1*-Expressionsmuster vergleicht, fällt auf, dass die Expression des *PPT1* in der Leitbündelregion sehr ausgeprägt ist, während sich sein Fehlen in der *cue1*-Mutante gerade darin äußert, dass die Interkostalfelder blassgrün aussehen, die Leitbündelregion aber normal grün bleibt. Das bedeutet zum einen, dass der Ausfall des PPTs nicht nur Auswirkungen auf die Zellen hat, in denen er normalerweise vorhanden ist, sondern zu weitreichenden Veränderungen im Gesamtblatt führt, und zum anderen, dass jene Zellen, in denen der PPT1 fehlt, davon zumindest phänotypisch nicht betroffen sind. Diese Aussagen gelten allerdings nur, wenn man davon ausgeht, dass das verwendete *PPT1*-Promotor-Fragment alle zur korrekten Expression des *PPT1*-Gens nötigen Elemente enthält und somit die Expression des *uidA*-Gens im Leitgewebe die tatsächliche Lokalisation des PPT1 im Blatt widerspiegelt. In jedem Fall ist es lohnenswert, sich mit dem Stoffwechsel der Zellen in der Leitbündelregion näher zu beschäftigen.

C₄-Stoffwechsel in Leitbündeln von C₃-Pflanzen und mögliche Aufgaben eines PPTs im Leitgewebe:

Eine Besonderheit der dem Leitgewebe benachbarten Zellen ist die kürzlich entdeckte Fähigkeit, Reaktionen des sogenannten C₄-Stoffwechsels durchzuführen (Hibberd und Quick, 2002). Die meisten Landpflanzen sind C₃-Pflanzen, sie fixieren CO₂ direkt aus der Atmosphäre mittels der RubisCO. C₄-Pflanzen dagegen besitzen einen CO₂-Konzentrierungsmechanismus, der über einen

Dicarboxylatweg läuft; die kontraproduktive Oxygenasereaktion der RubisCO wird dadurch minimiert. Fixierung des atmosphärischen Kohlenstoffs durch die PEP-Carboxylase und die Freisetzung des CO₂ aus der C₄-Säure über C₄-Decarboxylasen in Nähe der RubisCO des C₃-Wegs sind räumlich getrennt. Bisher wurde angenommen, dass dies stets durch die Kooperation von zwei Typen von Photosynthesegewebe geschieht: den Mesophyllzellen, in denen die Fixierung des CO₂ in C₄-Säuren stattfindet, und den Bündelscheidenzellen, in welchen das CO₂ wieder freigesetzt wird. C₄-Typ-Pflanzen besitzen einen weiteren PEP-Translokator-Typ: PEP, das als primärer CO₂-Akzeptator durch die Reaktion der PEP-Carboxylase dient, kann hier in Plastiden des Mesophylls aus Pyruvat durch die PPDK synthetisiert werden und wird dann in das Zytosol exportiert. Damit läuft der Transport hier in umgekehrter Richtung zu den bisher geschilderten Fällen (Fischer und Flügge, unveröffentlichte Ergebnisse). Neuerdings gibt es Hinweise dafür, dass der C₄-Photosynthesetyp nicht an die sog. Kranz-Anatomie aus Mesophyll- und Bündelscheidenzellen gebunden ist. Voznesenskaya et al. (2001) berichteten von einer sukkulenten Pflanze aus der Familie der Chenopodiaceen, *Barczowia aralocaspica*, in der die räumliche Trennung der verschiedenen Reaktionen der C₄-Photosynthese durch Lokalisation von PPDK und RubisCO in unterschiedlichen Plastidentypen innerhalb einer Zelle vollzogen ist. Morphologische Heterogenität zwischen Plastiden eines Organs wurde bereits früher z. B. für Blätter (Larsson et al., 1971) und Wurzeln (Läuchli et al., 1974) beschrieben. Nun zeigt sich, dass die verschiedenen Plastiden teilweise auch unterschiedliche Enzymausstattungen besitzen.

Außerdem wurde berichtet, dass auch typische C₃-Pflanzen wie Tabak oder Sellerie eine C₄-Photosynthese durchführen können. Hibberd und Quick (2002) wiesen hohe Aktivitäten von C₄-typischen Enzymen in Zellen der Leitbündelregion von Stängeln und Petiolen dieser Pflanzen nach. Sie beobachteten, dass Fütterung mit markiertem Kohlenstoff zu einer Akkumulation von unlöslichen Kohlenhydraten, meist in Form von Stärke, führte. Die das Xylem umgebenden Zellen in der Wurzel fixieren nach dem Modell der Autoren Kohlendioxid, welches aus der Respiration oder dem umgebenden Medium stammt und dann in Form von Malat weiter über das Xylem bis zu den Leitbündeln der Blätter transportiert wird. In Stängeln und Petiolen findet dann die Decarboxylierung statt. Damit entsprechen Stängel- und Petiolenzellen den Bündelscheidenzellen, und das vaskuläre System den CO₂-fixierenden Mesophyllzellen einer C₄-Pflanze. Die Aktivitäten decarboxylierender Enzyme waren in Leitbündelpräparationen im Verhältnis zum Gesamtblatt angereichert: außer PPDK- wurden auch NAD-ME-, NADPH-ME- und PEPCK-Aktivitäten gemessen.

Die Möglichkeit, dass ein C₄-Photosyntheseweg auch in *A. thaliana* existieren könnte, wirft möglicherweise ein neues Licht auf die Expression des *PPT1* in der Leitbündelregion. Es könnte, wie in C₄-Pflanzen, in den Plastiden (hier allerdings in der Wurzel) PEP für die CO₂-Fixierung gebildet und dann über den PPT exportiert werden. PEP könnte allerdings auch durch die zytosolische Glykolyse bereitgestellt

werden. Nach erfolgter Decarboxylierung in den Blättern entstandenes PEP könnte dann wiederum die Plastiden importiert werden und in den Shikimatweg einfließen. Das aus diesem Weg entstehende Lignin könnte dann in unmittelbarer Nachbarschaft des Bestimmungsortes hergestellt werden.

4.4.3.3. Mögliche Funktion des PPT1 in der Signaltransduktion

Mit den möglichen Erklärungen für die starke Expression des *PPT1* in der Leitbündelregion und besonders im Xylem-Parenchym bleibt trotzdem die Frage offen, warum die Folge eines Fehlens des Translokators der beschriebene Blattphänotyp der *cue1*-Mutanten ist. Hierzu könnten transgene Tabakpflanzen Hinweise geben, in denen die Funktionalität eines Myb-Transkriptionsfaktors durch Überexpression zweier *Myb*-Gene aus *Anthirrhinium* eingeschränkt ist. Der Phänotyp ähnelt dem der *cue1*-Mutanten, hier ist ebenfalls die Leitgeweberegion noch grün, während der Rest der Blattspreite blassgrün erscheint. Untersuchungen ergaben, dass es in diesen Pflanzen zu einer transkriptionellen Repression von Enzymen des Phenylpropanstoffwechsels kommt. Als Folge davon enthalten sie weniger Lignin und andere Sekundärmetabolite. Außerdem wurde ein Mangel an Dehydrodiconiferyl-Glykosiden (DCGs) festgestellt, einer Substanz, die als wachstumsfördernd beschrieben wurde (Binns et al., 1987; Lynn et al., 1987) und die eine Rolle in der Cytokinin-Signaltransduktion spielt (Teutonico et al., 1991). In den *cue1*-Mutanten könnte ein fehlendes Signal, welches von Zellen des Leitgewebes ausgeht, und das im Zusammenhang mit Produkten des Shikimatwegs und damit dem PPT steht, dazu führen, dass die Plastidenentwicklung im Mesophyll blockiert wird.

Dass die leitbündelnahen Regionen von einem fehlenden Signal bzw. dem Ausfall des PPT1s nicht betroffen sind, kann verschiedene Gründe haben:

1. Das aus dem Shikimatweg abgeleitete Signal wird möglicherweise für die vollständige Entwicklung und Funktion der leitbündelnahen Chloroplasten gar nicht benötigt, da ihre Entwicklung anders reguliert wird. Darauf weist u. a. die Entstehung aus unterschiedlichen Zelllinien des Blattprimordiums hin (Poethig, 1989).
2. Die unmittelbaren Auswirkungen des Fehlens des PPT1s können möglicherweise nur in den leitbündelnahen Zellen auf andere Weise kompensiert werden. Da eine Stärkescheide vorhanden ist (s. Ⓐ.), könnte das aus der Glykolyse stammende Pyruvat durch die PPDK in PEP umgewandelt und in den Shikimatweg geleitet werden. PPDK-Aktivität wurde in Plastiden von C₃-Pflanzen und in einigen Fällen auch im Zytosol festgestellt (Aoyagi und Bassham, 1984; Nomura et al., 2000; Rosche et al., 1994), sie ist jedoch sehr gering (Ishimaru et al., 1997; Ishimaru et al., 1998). Denkbar wäre auch eine Versorgung mit Kohlenstoffgerüsten in Form von Malat über das Xylem, nach dem beschriebenen leitbündelspezifischen C₄-Metabolismus. Da die Differenzierung der Chloroplasten des Mesophylls in den

cue1-Mutanten vermutlich zu einem früheren Zeitpunkt der Blattdifferenzierung blockiert war (da ein Stoff/Signal ausgehend von der Leitbündelregion, welches im Zusammenhang mit dem Shikimatweg steht, fehlte), können diese keine ausreichende Photosynthese durchführen, um PEP für den Shikimatweg bereitzustellen.

Die endgültige Bedeutung der beiden PPT-Proteine für den Stoffwechsel von *A. thaliana* Pflanzen lässt sich aus den bisher vorliegenden Daten nicht ableiten. Dargestellte Erklärungsansätze, warum zumindest das Vorhandensein des PPT1 für die normale Entwicklung der Pflanze essentiell ist, müssen durch die entsprechenden Experimente überprüft werden.

4.5. PT-homologe Sequenzen: Nukleotid-Zuckertransporter?

Viele der PT-homologen Sequenzen werden als mögliche NSTs annotiert (3.1.3.1., 3.1.3.2). NSTs werden in unterschiedlichen Zusammenhängen von der Pflanze benötigt.

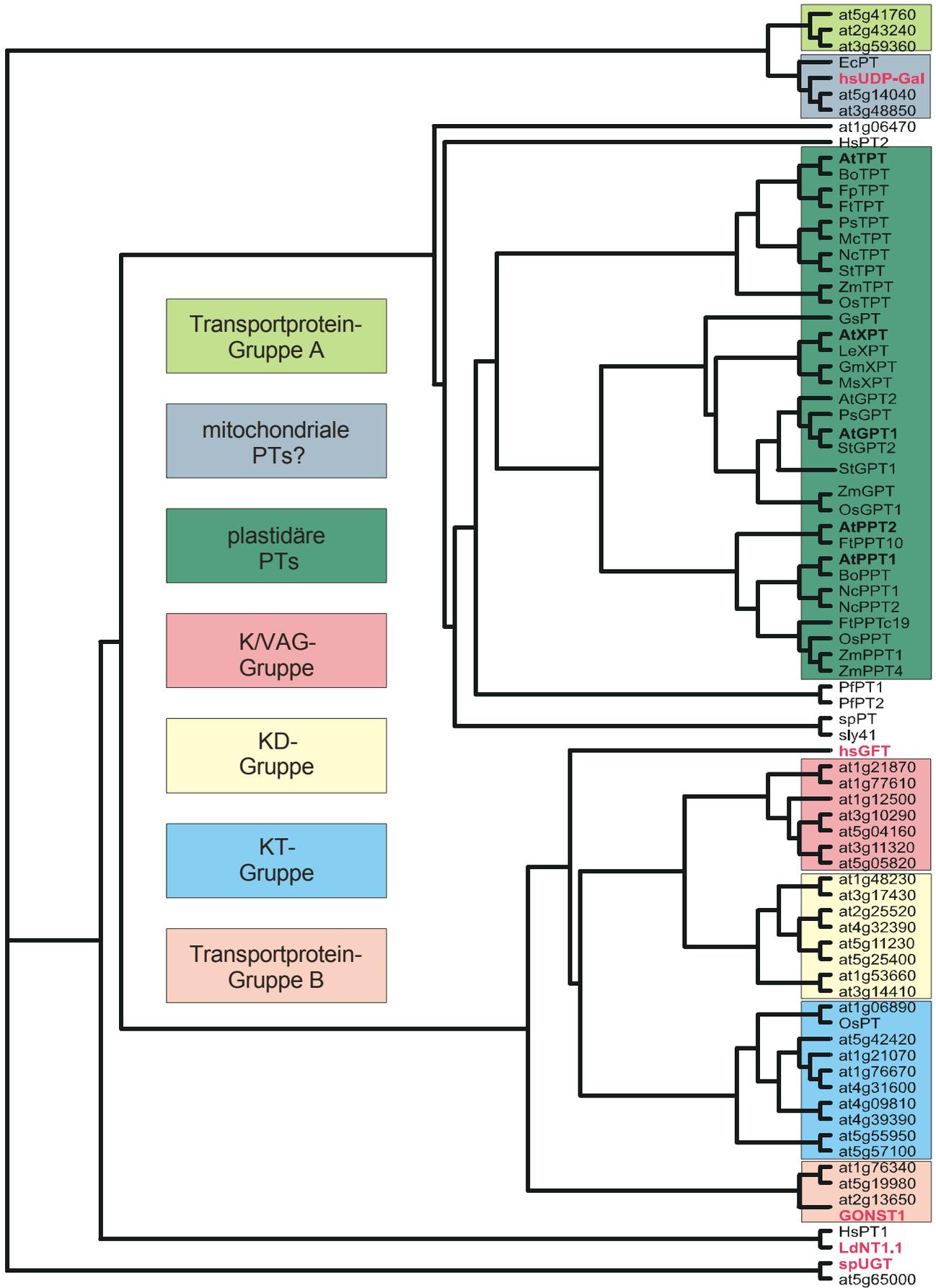
Der Hauptanteil des von der Pflanze fixierten Kohlenstoffs wird für die Synthese von Stärke und dem Zellwandmaterial Zellulose genutzt. Ein kleinerer Teil wird in eine Reihe von Glykokonjugaten eingebaut, zu denen Glykoproteine, Proteoglukane und Glykolipide gehören (Carpita und Gibeaut, 1993; Reiter, 1998)

Glykosyltransferasen sind die für die Synthese von Pflanzenglukanen verantwortlichen Enzyme. Sie nutzen Nukleosid-5'-diphosphozucker (Zuckernukleotide oder NDP-Zucker) als Donorsubstanz. Zwei Hauptwege der direkten Synthese von NDP-Zuckern aus phosphorylierten Monosacchariden sind bekannt: die Bildung von GDP-D-Mannose aus GTP und Mannose-1-Phosphat sowie die Produktion von UDP-D-Glukose aus UTP und Glk1P (Reiter und Vanzin, 2001). An einem Alternativweg für die Synthese von UDP-Glukose ist die Saccharosesynthase beteiligt, die UDP und Saccharose in UDP-Glukose und Fruktose umwandelt. Dieser Weg wurde für die Bereitstellung hoher UDP-Glukosekonzentrationen für die Zellulosebiosynthese an der Plasmamembran vorgeschlagen (Amor et al., 1995). Die Bildung der meisten anderen Nukleotid-Zucker geschieht durch die Modifizierung von UDP-Glukose oder GDP-Mannose durch Oxidation, Reduktion, Epimerisierung und/oder Decarboxylierung. Diese Reaktionen führen zu Substraten, die direkt von den Glykosyltransferasen verwendet werden können (Reiter und Vanzin, 2001).

Glykosylierungsreaktionen finden hauptsächlich im Golgi-Apparat (GA) statt. Nukleotid-Zucker, welche die Substrate der im GA lokalisierten Glykosyltransferasen sind, werden jedoch im Zytosol bzw. im Fall von CMP-Sialylsäure im Kern synthetisiert und müssen daher ins Lumen des entsprechenden

Kompartiments transportiert werden (Bonin et al., 1997). Für diesen Transport sind die NSTs (*nucleotide sugar transporter*) zuständig (Gerady-Schahn et al., 2001). Einige Transporter wurden in der Golgi-Apparat(GA)-Membran identifiziert, andere auch im ER. UDP-Glukose wurde z.B. hauptsächlich in ER-Vesikeln gefunden (Perez und Hirschberg, 1985; Abeijon und Hirschberg, 1987). Als Gegentauschsubstrat der NSTs dient Nukleotid-Monophosphat, welches kontinuierlich im Lumen des Kompartiments durch die Hydrolyse von Nukleotid-Diphosphaten, die aus den laufenden Glykosyltransferreaktionen entstehen, bereitgestellt wird. Die NST-Proteine sind aus 320-400 Aminosäuren aufgebaut und besitzen eine Aminosäure-Identität von 40-60% untereinander. Es handelt sich um sehr hydrophobe Proteine, welche 5-10 membrandurchspannende Regionen enthalten (Kawakita et al., 1998).

Abb. 4.5 (folgende Seite): Phylogenetischer Baum aller PT- und PT-homologen Sequenzen und ausgewählter Nukleotid-Zuckertransporter (rot). At: *Arabidopsis thaliana*, Bo: *Brassica oleracea*, Ec: *Escherichia coli*, Fp: *Flaveria pringlei*, Ft: *Flaveria trinervia*, Gm: *Glycine max*, Gs: *Galdieria sulfuraria*, Hs: *Homo sapiens*, Ld: *Leishmania donowani*, Le: *Lycopersicon esculentum*, Mc: *Mesembryanthemum crystallinum*, Ms: *Medicago sativum*, Nt: *Nicotiana tabaccum*, Pf: *Plasmodium falciparum*, Ps: *Pisum sativum*, Os: *Oryza sativa*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*, St: *Solanum tuberosum*, Zm: *Zea mays*. sly41: Hefe PT-Homolg. Rot: Bereits charakterisierte Transporter. Weitere Erklärungen im Text.



Um zu überprüfen, ob die putativen NST-Sequenzen tatsächlich mit charakterisierten NST-Sequenzen gruppieren, wurde ein phylogenetischer Stammbaum aus allen PT- und PT-homologen Sequenzen und einer Auswahl bekannter NST-Sequenzen erstellt (Abb. 4.4).

Einer der dargestellten NSTs ist ein menschlicher GDP-Fukose-Transporter. Er wurde identifiziert und charakterisiert durch Komplementation von Fibroblasten mit einem Defekt im *LADII*-Gen. Zellen von Patienten mit diesem Gendefekt können keine Fukosylierung von Glykoproteinen durchführen (Lühn et al., 2001; Lübke et al., 2001). Der beschriebene GDP-Fukosetransporter (hsGFT) gruppiert von allen abgebildeten NSTs am ehesten mit den plastidären PTs. Insgesamt beträgt die Homologie zwischen diesem Protein und beispielsweise dem AtXPT nur 17%, allerdings gibt es viele homologe Aminosäure-Austausche und auch einige Bereiche mit höherer Homologie. Eine der beiden in allen PTs konservierten Aminosäuren der putativen Substratbindestelle, nämlich Lysin, ist in der hsGFT-Sequenz konserviert. Anstelle des für die PTs charakteristischen Arginins ist die folgende Aminosäure aber ein Alanin. Dies wiederum findet man auch bei den Transportern der K/VGA-Gruppe, zu denen der menschliche NST aber nicht zählt. Mit 351 Aminosäuren im Vergleich zu 417 Aminosäuren (AtXPT) entspricht die Größe des Proteins ungefähr der Größe der reifen Phosphattranslokatoren nach Abspaltung des Transitpeptids.

Zur Transportprotein-Gruppe B zählt at2g13650. Dieses Protein aus *A. thaliana* wurde kürzlich als ein GDP-Mannosetransporter, GONST1, identifiziert (Baldwin et al., 2001) und ist im Golgi-Apparat lokalisiert.

Ein menschlicher UDP-Galaktose Transporter (Pim2h) ist nahe verwandt mit einem *E. coli*-PT (*UhpT*, *Acc.-No.* AAG58865.1) und den beiden als mitochondriale PTs bezeichneten Transporter, daher sollte die Funktion und Lokalisation der letztgenannten überprüft werden. Von den plastidären Phosphattranslokatoren stehen diese Proteine allerdings weit entfernt.

Das Membranprotein at5g65000 weist Homologien zu einem UDP-Galaktosetransporter aus Hefe auf (*Acc.-No.* CAA18638.1) und könnte daher möglicherweise eine ähnliche Funktion besitzen.

Interessanterweise gibt es keine direkten, auf Homologien gestützte Hinweise, dass die Proteine der K/VAG, KD- oder KT-Gruppe ebenfalls Nukleotid-Zuckertransporter sind. Für die KT-Gruppe konnte ein Reis-Homolog identifiziert werden, dessen Funktion nicht experimentell nachgewiesen wurde und hier als „Phosphattranslokator“ angegeben (OsPT) wird.

Ein Charakteristikum von Chloroplastenmembranen ist ihr hoher Gehalt an den Galaktolipiden Monogalactosyldiacyl-Glycerol (MGDG) und Digalactosyldiacyl-Glycerol (DGDG), die zusammen über 80% aller Chloroplastenlipide ausmachen. Galaktolipide erfüllen viele Funktionen; z.B. führt ihre ungewöhnliche chemische Struktur zu Packeigenschaften, die wichtig für die Bildung von Thylakoiden sind (Lee, 2000); sie spielen eine essentielle Rolle für die Chloroplasten-

Membranbiogenese und die Photosynthese und sind nötig für einen korrekt verlaufenden Import in die Plastiden (Chen und Li, 1998). Die MGDG- und DGDG-Synthese-Aktivität ist mit der Chloroplastenmembran assoziiert (Dorne et al. 1985; Keegstra und Cline, 1999). Eine Spinat MGDG-Synthase wurde in der inneren CP-Membran lokalisiert (Miège et al., 1999), eine DGDG-Synthase in der äußeren CP-Membran (Froehlich et al., 2001). Bei einer Synthese an der inneren Membran müssten die entsprechenden Zucker-Nukleotide dorthin gelangen. Da die äußere Chloroplastenhülle eine Ausschlussgröße von etwa 10 kD (Fischer et al., 1994b) besitzt, ist dazu jedoch wahrscheinlich kein Transporter notwendig, es sei denn, die Enzymaktivität ist auf der dem Stroma zugewandten Seite der inneren Chloroplastenmembran lokalisiert.

Das Sulfolipid 6-sulfo- α -D-chinovosyl Diacylglycerol (SQDG) ist ein Lipidart, welche speziell in den photosynthetischen Membranen von Pflanzen und Bakterien vorkommt (Essigmann et al., 1998). Vorläufer der Sulfolipid-Biosynthese ist UDP-Sulfochinovose (UDP-SQ), welche aus UDP-Glukose und einem Intermediat des Sulfat-Reduktionswegs in den Chloroplasten gebildet wird (Heinz et al., 1989; Kleppinger-Sparace et al., 1985). Daher muss für die Synthese ein Import von UDP-Glukose in die Plastiden gefordert werden. Hierfür könnte eines der PT-homologen möglichen NST-Proteine aus der KT- oder K/VAG-Gruppe verantwortlich sein, da für mehrere dieser Proteine ein plastidäres Transitpeptid vorausgesagt wurden (Tab. 3.6).

Insgesamt sind Oligosaccharideinheiten von Glykokonjugaten wichtig für unterschiedliche biologische Prozesse, die von einfacher konformationeller und metabolischer Stabilisierung von Proteinen bis zur aktiven Teilnahme an Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen durch die Bereitstellung von Liganden für eine spezifische Erkennung reichen - letzteres beispielsweise beim menschlichen GDP-Fukosetransporter. In Pflanzen besitzen Glykoproteine als Nicht-Zellulose-Polysaccharide eine hohe Bedeutung für den Aufbau der Zellwand. Außerdem spielen, wie erwähnt, Glykolipide und auch oberflächenassoziierte Glykoproteine eine entscheidene Rolle für die Pflanze. Daher ist es wahrscheinlich, dass die zeitliche und räumliche Koordination der Bildung von Glykokonjugaten nicht zuletzt durch die NST-Transporter, welche das Substrat für die Glykosylierungen an den Ort der Reaktion befördern, reguliert wird. Mit den putativen PT-homologen NST-Sequenzen der verschiedenen identifizierten Gruppen wurden daher RT-PCR-Experimente durchgeführt (Abb. 3.18).

Die ersten Ergebnisse zeigen, dass zumindest einige der PT-homologen Gene relativ hoch exprimiert sind und daher wahrscheinlich eine wichtige Rolle für die Pflanze spielen. Einige der Transporter sind besonders hoch in Blüten exprimiert. Um genauere Aussagen über die Expression und Funktion dieser Gene machen zu können, sind jedoch ausführlichere Studien notwendig.

4.6. Ideen zum Ursprung der NST-TPT-Genfamilie

Wie dargestellt, gibt es vier verschiedene Klassen plastidärer Phosphattranslokatoren. Proteine aller Klassen wurden in verschiedenen Pflanzen identifiziert, und erste Ergebnisse aus anderen Pflanzen (z. B. Reis, Tabak und Kartoffel) deuten darauf hin, dass die Genstruktur einer Klasse nicht nur innerhalb einer Pflanze, sondern auch bei anderen Arten, Mono- wie Dikotylen, erhalten ist. Dies weist darauf hin, dass sich die vier Klassen schon vor der Trennung der Angiospermen gebildet haben. Dafür spricht auch die Tatsache, dass sich Proteine einer Klasse zwischen verschiedenen Arten ähnlicher sind, als Mitglieder unterschiedlicher Klassen innerhalb einer Pflanze.

Wahrscheinlich entstanden die Phosphattranslokatoren aus einem eukaryotischen Vorläuferprotein. In dem Cyanobakterium *Synechocystis* wurde kein Phosphattranslokator gefunden, dafür existiert in der einzelligen Rotalge *Galdieria sulfuraria* eine PT-homologe Sequenz (GsPT), die jedoch nicht einer der Klassen zuzuordnen ist. Darauf, dass es sich bei den PTs um ursprüngliche eukaryotische Gene handelt, weist auch ein homologes Protein aus Hefe hin (sly41, Acc.-No. X54238), sowie das Vorkommen von PT-homologen Sequenzen im menschlichen Genom (AtPT2 und HsGFT). Ein eukaryotischer Transporter mit Ähnlichkeit zu Phosphattranslokatoren war also möglicherweise schon vor Trennung von Pflanzen und Tieren vorhanden. Dieser Vorläufer der PTs könnte gleichzeitig den Urahn des NST-Teils der NST-TPT-Genfamilie darstellen. Später entwickelten sich die möglichen NST- und die PT-Proteine auseinander und spalteten sich in verschiedene Klassen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten auf. Da die meisten PT-homologen Gene keine Präsequenz besitzen, kann man davon ausgehen, dass ein Transitpeptid nachträglich an einige PT-Sequenzen fusioniert wurde. Dafür spricht auch die Heterogenität der Präsequenzen, die zwischen den unterschiedlichen Klassen, manchmal sogar auch innerhalb einer Klasse (bei AtPPT1 und AtPPT2 beispielsweise), kaum Ähnlichkeiten aufweisen. Welche Funktion ein ursprünglicher PT gehabt haben könnte, ist unbekannt. Wahrscheinlich ist aber, dass der Austausch von Photosassimilaten mit einem endosymbiontischen Organell eine später erworbene Eigenschaft darstellt.

5. Zusammenfassung

In *A. thaliana* gibt es sechs funktionelle Phosphattranslokatorgene, und zwar je zwei *GPT*- und zwei *PPT*-Gene sowie ein *TPT*- und ein *XPT*-Gen. Die Exon-/Intronstruktur innerhalb einer Klasse ist konserviert, unterscheidet sich aber zwischen den einzelnen Klassen. Mit sechs *PPT*- und vier *GPT*-Pseudogenen wurde eine für *A. thaliana* ungewöhnlich hohe Anzahl an Pseudogenen innerhalb der *PT*-Genfamilie identifiziert, die nicht auf Tandemduplikationen oder die Lage der Gene und Pseudogene in duplizierten Regionen des *A. thaliana*-Genoms zurückzuführen ist.

Die Datenbanksuche ergab, dass im *A. thaliana*-Genom viele *PT*-homologe Sequenzen vorhanden sind. Die Sequenzen lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen. Die Bezeichnung als K/VAG-, KD- und KT-Gruppe beruht einerseits auf der Änderung des in allen plastidären *PT*s konservierten KR-Motivs der putativen Substratbindestelle, andererseits auf Homologien der einzelnen Proteine untereinander. Einige der homologen Proteine, v.a. aus der KT-Gruppe besitzen möglicherweise plastidäre Transitpeptide. Als Funktion der meisten *PT*-homologen Proteine wird ein Nukleotid-Zuckertransport vorgeschlagen, weswegen diese Proteine auch mit den Phosphattranslokatoren als *TPT-NST*-(*nucleotide sugar transporter*)-Familie zusammengefasst werden.

Aufgrund der relativ geringen Transkriptmenge der meisten *PT*-Gene wurden RT-PCR-Experimente zur Analyse der Expression der unterschiedlichen Gene durchgeführt. Dabei wurden sowohl unterschiedliche Auswertungsmethoden (semiquantitativ und quantitativ) als auch verschiedene sog. *real time*-Thermostyker (GeneAmp[®]5700 *Sequence Detection System*, ABI und LightCycler[®], Roche) genutzt; die Resultate wurden miteinander verglichen.

Zusätzlich wurde das Expressionsmuster der Gene innerhalb der Pflanze durch Promotor-GUS-Fusionen der *PT*-Gene untersucht. Vereinfacht lässt sich zusammenfassen, dass *XPT* und *GPT1* ubiquitär, *PPT2* und *TPT* in allen Geweben außer der Wurzel und *GPT2* nur in Blüten und Schoten exprimiert ist. *PPT1* war in jungen Blättern hauptsächlich in der Leitbündelregion exprimiert, in älteren Blättern wurde das Signal schwächer und ging auf das gesamte Blatt über. Transgene Pflanzen, welche eine *PPT1*-Promotor-GFP Fusion exprimierten, zeigten das stärkste Fluoreszenzsignal im Xylemparenchym.

Es wurde versucht, die Phosphattranslokatoren in *E. coli* als MBP-Fusionsproteine zu exprimieren. Dies führte jedoch, wahrscheinlich durch Integration der Transporter in die Bakterienmembran, zur Lyse der Zellen. Nur ein verkürztes *XPT*-pMAL Konstrukt konnte erfolgreich exprimiert werden. Der durch die Immunisierung eines Kaninchens erhaltene Antikörper ist spezifisch für das AtXPT-Protein und reagiert nicht mit den nahe verwandten AtGPT-Proteinen.

Die beiden AtGPT-Proteine wurden heterolog in Hefe exprimiert. Transportstudien mit den rekombinanten Proteinen zeigten, dass beide Transporter Glk6P neben

Phosphat als bevorzugtes Substrat akzeptieren. Bei Überexpression in der *pgi1-1*-Mutante, deren Blätter nahezu stärkefrei sind, können beide AtGPTs sowie das GPT-Protein aus Erbsenwurzeln den Phänotyp der Mutante komplementieren.

Die *A. thaliana cue1-6* Mutante, welche einen Defekt im *PPT1*-Gen besitzt und retikulierten Blatt-Phänotyp aufweist, wurde durch Überexpression des *AtPPT2* teilweise, durch Überexpression des *AtPPT1* vollständig phänotypisch komplementiert.

6. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
AA	Aminosäuren (<i>amino acids</i>)
A	Ampère
Abb.	Abbildung
Ac.	Acetat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAP	6-Benzyladeninaminopurin
BCIP	5-Bromo-4-chlor-indoylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Aminosäuresequenz
cDNA	von mRNA kopierte DNA
Ci	Curie
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FS	Fettsäure
g	Gramm
Glk1P	Glukose 1-phosphat
Glk6P	Glukose 6-phosphat
h	Stunden
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilo-Basenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
LB	Nährmedium nach Luria Bertani
Lsg.	Lösung
M	molar
MBP	Maltose-Bindeprotein
min	Minuten
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS-Salze	Murashige- und Skoog-Salze
N-Terminus	Amino-Terminus einer Aminosäuresequenz
NADH	Nicotinamidadeninnukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadeninnukleotidphosphat
NBT	p-Nitroblautetrazoliumchlorid
neg.	negativ
NST	Nukleotid-Zuckertransporter (<i>nucleotid sugar transporter</i>)
OD	optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethylsufonylfluorid
PS	Photosystem

Abkürzungen

PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
s, sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylphosphat
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris/EDTA oder <i>transposable element</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units ($\mu\text{Mol}/\text{min}$)
v/v	Volumenverhältnis
WT	Wildtyp
w/v	Verhältnis von Gewicht zu Volumen
w/w	Gewichtsverhältnis
xg	Erdbeschleunigung
μ	mikro: $\times 10^{-6}$

Abkürzung der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	V	Val	Valin
R	Arg	Arginin	L	Leu	Leucin
N	Asn	Asparagin	K	Lys	Lysin
D	Asp	Asparaginsäure	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	F	Phe	Phenylalanin
Q	Gln	Glutamin	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	S	Ser	Serin
G	Gly	Glyzin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	W	Trp	Tryptophan
I	Ile	Isoleucin	Y	Tyr	Tyrosin

7. Literaturverzeichnis

- Abeijon, C., Hirschberg, C.B.** (1987) Subcellular site of synthesis of the *N*-acetylgalactosamine (β1-O) serine (or threonine) linkage in rat liver. *J. Biol. Chem.* 262: 4153-4159.
- Abeijon, C., Mandon E.C., Hirschberg, C.B** (1997) Transporters of nucleotide sugars, nucleotide sulfate and ATP in the Golgi apparatus. *TIBS* 22: 203-207.
- Abler, M.L., Green, P.J.** (1996) Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 32 (1-2): 63-78.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G. et al.** (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287 (5461): 2185-95.
- Altschul, S.F., Stephen, F., Gish, W., Miller, W. Myers, E.W., Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Amor, Y., Haigler, C.H., Johnson, S., Wainscott, M., Delmer, D.P.** (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *PNAS* 92: 9353-9357.
- An, Y-Q, McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, C., Chambliss, S., Meagher, R.B.** (1996) Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis ACT2/ACT8* actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* 10(1): 107-121.
- Aoyagi, K., Bassham, J.A.** (1984) Pyruvate, orthophosphate dikinase mRNA organ specificity in wheat and maize plants. *Plant Physiology* 76: 278-280
- Applewhite, P.B., Kaur-Sawhney, R., Galston, A.W.** (2000) A role for spermidine in the bolting and flowering of *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* 108: 314-320.
- Ausubl, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Snuth, F.A., Seidman, J.G., Struhl, K.** (1997) *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Bailey-Serres, J.** (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends Plant Sci* 4 (4): 142-148.
- Baldwin, T.C., Handford, M.G., Yuseff, M.-I., Orellana, A., Dupree, P.** (2001) Identification and Characterization of GONST1, a Golgi-Localized GDP-Mannose Transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2283-2295.
- Baumbusch, L.O., Thorstensen, T., Krauss, V., Fischer, A., Naumann, K., Assalkhou, R., Schulz, I., Reuter, G., Reidunn, B.A.** (2001) The *Arabidopsis thaliana* genome contains a least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucl. Acids Res.* 29: 4319-4333.

- Baynton, C.E., Potthoff, S.J., McCullough, A.J., Schuler, M.A.** (1996) U-rich tracts enhance 3' splice site recognition in plant nuclei. *Plant J.* 10: 703-711.
- Bechtold, 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.
- Benfey, P.N., Chua, N.-H.** (1990) The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science* 250: 959-966.
- Essigmann B, Guler S, Narang RA, Linke D, Benning C.** (1998) Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQD1*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 95 (4): 1950-5.
- Bergmeyer, H.U.** (1970) *Methoden der enzymatischen Analyse*. 2nd edn, Verlag Chemie Weinheim.
- Bevan, M.** (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* 12, 8711-8721.
- Bibi, E., Gros, P. Kaback, H.R.** (1993) Functional expression of mouse *mdr1* in *Escherichia coli*. *PNAS.* 90 (19): 9209-9213
- Binns, A.N., Chen, R.H., Wood, H.N., Lynn D.G.** (1987) Cell division promoting activity of naturally occurring dehydrodiconiferyl glucosides: do cell wall components control cell division? *PNAS* 84: 980-984
- Blanc, G., Barakat, A., Guyot R., Cooke, R., Delseny, M.** (2000) Extensive Duplication and Reshuffling in the *Arabidopsis* Genome. *Plant Cell* 12: 1093-1101.
- Block, A., Dangl, J.L., Hahlbrock, K., Schulze-Lefert, P.** (1990) Functional borders, genetic fine structure, and distance requirements of cis elements mediating light responsiveness of the parsley chalcone synthase promoter. *PNAS* 87: 5387-5391.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J.** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bölter, B., Soll, J., Schulz, A., Hinnah, S., Wagner, R.** (1998) Origin of a chloroplast importer. *PNAS* 95: 15831-15836.
- Bonin, C.P., Potter, I., Vanzin, G.F., Reiter, W.-D.** (1997) The *MUR1* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the *de novo* synthesis of GDP-L-fucose. *PNAS* 94: 2085-2090.
- Borchert, S., Harborth, J., Schünemann, D., Hoferichter, P., Heldt, H.W.** (1993) Studies of the enzymatic capacities and transport properties of pea root plastids. *Plant Physiol.* 101: 303-312.
- Boutry, M., Michelet, B., Goffeau, A.** (1989) Molecular cloning of a family of plant genes encoding a protein homologous to plasma membrane H⁺-translocating ATPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 567-574.

- Bowsher, C.G., Boulton, E.L., Rose, J., Nayagam, S., Emes, M.J.** (1992) Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic root plastids. *Plant J.* 2: 893-896.
- Brown, T.A.** (1991) Bacteria and Bacteriophages. In: *Molecular biology*. Labfax. Oxford. 1-24-
- Bucher, P.** (1999) Regulatory elements and expression profiles. *Current Opinion in Structural Biology* 9: 400-407.
- Bustin, S.A.** (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25: 169-193
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M.** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1-30.
- Caspar, R., Huber, S.C., Sommerville, C.** (1985) Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol.* 79: 11-17.
- Cavalier-Smith, T.** (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* 5 (4): 174-182.
- Chen, L.-J., Li, H.M.** (1998) A mutant deficient in the plastid lipid DGD is defective in protein import into chloroplasts. *Plant J.* 16 (1): 33-39.
- Chen, Y.T., Holcomb, C., Moore, H.P.** (1993) Expression and localization of two low molecular weight GTP-binding proteins, Rab8 and Rab10, by epitope tag. *PNAS* 90 (14): 6508-6512.
- Chiu, W.-I., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., Sheen, J.** (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* 6 (3): 325-330.
- Cho, G., Doolittle, R.F.** (1997) Intron distribution in ancient paralogs supports random insertion and not random loss. *J. Mol. Evol.* 44:573-584.
- Church GM, Gilbert W.** (1984) Genomic sequencing. *PNAS* 81 (7): 1991-5.
- Clegg, M.T., Cummings, M.P., Durbin, M.L.** (1997) The evolution of plant nuclear genes. *PNAS* 94(15): 7791-7798.
- Cognata, U.L., Willmitzer, L., Müller-Röber, B.** (1995) Molecular cloning and characterization of novel isoforms of potato ADP-glucose-pyrophosphorylase. *Mol. Gen. Genet.* 246: 538-548.
- Copertino, D.W., Hallick, R.B.** (1993) Group II and group III introns of twintrons: potential relationships with nuclear pre-mRNA introns. *Trends Biochem. Sci.* 18: 467-471.

- Cronn, R.C., Randall, L.S., Wendel, J.F.** (1999) Duplicated genes evolve independently after polyploid formation in cotton. *PNAS* 97 (25): 14406-14411.
- Delrot, S., Atanassova, R., Maurousset, L.** (2000) Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochem. Biophys. Acta* 1465 (1-2): 281-306.
- DeMartino, G.N. Slaughter, C.A.** (1999) The Proteasome, a Novel Protease Regulated by Multiple Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274 (32): 22123-22126.
- De Souza, S.J., Long, M., Klein, R.J., Roy, S., Lin, S., Gilbert, W.** (1998) Towards a resolution of the introns early/late debate: only phase zero introns are correlated with the structure of ancient proteins. *PNAS* 95: 5094-5099.
- Dengler, N., Kang, J.** (2001) Vascular patterning and leaf shape. *Curr Opin Plant Biol* 4: 50-56.
- Denyer, K., Dunlap, F., Thorbjørnsen, T., Keeling, P. Smith, A.A.** (1996) The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidal. *Plant Physiol.* 112: 779-785.
- Deterding, S.** (1998) Analyse der Struktur des Triosephosphat/Phosphattranslokator-Gens aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Köln.
- Dice, J.F., Goldberg, A.L.** (1975) Relationship between in vivo degradative rates and isoelectric points of proteins. *PNAS* 72 (10): 3893-3897.
- Dinkova, T.D., Aguilar, R., Sanchez de Jimenez, E.** (2000) Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochem. J.* 351: 825-831.
- Doolittle, W.F.** (1978) Genes in pieces: were they ever together? *Nature*: 272: 581-582.
- Dornburg, R., Temin, H.M.** (1990) Presence of a retroviral encapsidation sequence in nonretroviral RNA increases the efficiency of formation of cDNA genes. *J. Virol.* 64(2): 886-889.
- Dorne, A.J., Joyard, J., Block, M.A., Douce, R.** (1985) Localization of phosphatidylcholin in outer envelope membrane of spinach chloroplasts. *J. Cell Biol.* 100 (5): 1690-1697.
- Dorne AJ, Joyard J, Douce R.** (1990) Do thylakoids really contain phosphatidylcholine? *PNAS* 87(1): 71-74.
- Drahota, Z., Rauchova, H., Mikova, M., Kaul, P., Bass, A.** (1983) Phosphoenolpyruvate shuttle - transport of energy from mitochondria to cytosol. *FEBS Lett.* 157 (2): 347-349.
- Drouin, G., de Sá, M.M.** (1997) Loss of Introns in the Pollen-Specific Actin Gene Subfamily Members of Potato and Tomato. *J. Mol Evol.* 45:509-513.
- Eastmond, P.J., Rawsthorne, S.** (2000) Coordinate changes in carbon partitioning and plastidial metabolism during the Development of oilseed embryos. *Plant Physiol.* 122: 767-774.

- Eggermont, K., Goderis, I.J., Broekaert, W.F.** (1996) High-Throughput RNA Extraction from Plant Samples Based on Homogenisation by Reciprocal Shaking in the presence of an Mixture of Sand and Glass Beads. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14: 273-279.
- Eicks, M.H., Maurino, V.G., Knappe, S., Flügge, U.-I., Fischer, K.** (2001) The plastidic pentose phosphate translocator represents an important link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiol.*
- Elrouby, N., Bureau, T.E.** (2001) A Novel Hybrid Open Reading Frame Formed by Multiple Cellular Gene Transductions by a Plant Long Terminal Repeat. *JBC* 276 (45): 41963-41968.
- Enwistle, G., ap Rees, T.** (1988) Enzymatic capacities of amyloplasts from wheat endosperm. *Biochem. J.* 255: 391-396.
- Federov, A., Cao, X., Saxonov, S., de Souza, S.J., Roy, S.W., Gilbert, W.** (2001) Intron distribution difference for 276 ancient and 131 modern genes suggests the existence of ancient introns. *PNAS* 18(23): 12177-12182.
- Ferreira, G.C., Pedersen, P.L.** (1992) Overexpression of higher eukaryotic membrane proteins in bacteria. Novel insights obtained with the liver mitochondria proton/phosphate symporter. *J. Bio. Chem.* 267 (8): 5460-5466.
- Fischer, K., Arbinger, B., Kammerer, B., Busch, C., Brink, S., Wallmeier, H., Sauer, N., Eckerskorn, C., Flügge, U.-I.** (1994a) Cloning and *in vivo* expression of functional triose phosphate/phosphate translocators from C₃- and C₄-plants: evidence for the putative participation of specific amino acid residues in the recognition of phosphoenolpyruvate. *Plant J.* 5(2): 215-226.
- Fischer, K., Kammerer, B., Gutensohn, M., Arbinger, B., Weber, A., Häusler, R.E., Flügge, U.-I.** (1997) A New Class of Plastidic Phosphate Translocators: A Putative Link between Primary and Secondary Metabolism by the Phosphoenolpyruvate/Phosphate Antiporter. *Plant Cell* 8: 453-462.
- Fischer, K., Weber, A., Brink, S., Arbinger, B., Schünemann, D., Borschert, S., Heldt, H.W., Popp, B., Benz, R., Link, T.A., Eckerskorn, C., Flügge, U.-I.** (1994b) Porins from plants: Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of two new members of the porin family. *J. Biol. Chem.* 269: 25754-25760.
- Flavell, A.J.** (1992) Ty1-copia group retrotransposons and the evolution of retroelements in the eukaryotes. *Genetica* 86(1-3): 203-214.
- Flügge, U.-I.** (1985) Hydrodynamic properties of the Triton X-100 solubilized chloroplast phosphate translocator. *Biochim. Biophys Acta* 502: 232-247.
- Flügge, U.-I.** (1995) Phosphate translocation in the regulation of photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 46: 1317-1323.
- Flügge, U.-I.** (1999) Phosphate Translocators in Plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 27-45.

- Flügge, U.-I.** (2000) Transport in and out of plastids: does the outer envelope membrane control the flow? *Trends Plant Sci.* 5: 135-137.
- Flügge, U.-I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F., Eckerskorn, C.** (1989) The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO J* 8: 39-46.
- Flügge, U.-I., Heldt, H.W.** (1979) Phosphate translocator in chloroplasts: identification of the functional protein and characterization of its binding site. *Dev. Bioenerg. Biomembr.* 3: 373-382.
- Focks, N., Benning, C.** (1998) wrinkled1: a novel, low-seed-oil mutant of Arabidopsis with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol.* 118: 91-101.
- Fox, S.R., Hill, L.M., Rawsthorne, S., Hills, M.J.** (2000) Inhibition of the Glc-6-P transporter in oilseed rape (*Brassica napus* L.) plastids by acyl-CoA thioesters reduces fatty acid synthesis. *Biochem. J.* 352: 525-532.
- Fox, S.R., Rawsthorne, S., Hills, M.J.** (2001) Fatty acid synthesis in pea root plastids is inhibited by the action of long-chain Acyl-Coenzyme As on metabolite transporters. *Plant Physiol.* 126: 1259-1265.
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J.** (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151(4):1531-1545.
- Franceschi, V.R., Giaquinta, R.T.** (1983a) The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. I. Ultrastructure and histochemistry during vegetative development. *Planta* 157: 411-421.
- Franceschi, V.R., Giaquinta, R.T.** (1983b) The paraveinal mesophyll of soybean leaves in relation to assimilate transfer and compartmentation. II. Structural, metabolic and compartmental changes during reproductive growth. *Planta* 157: 422-431.
- Gantt JS, Baldauf SL, Calie PJ, Weeden NF, Palmer JD.** (1991) Transfer of rpl22 to the nucleus greatly preceded its loss from the chloroplast and involved the gain of an intron. *EMBO J.* 10 (10): 3073-3078.
- Gaut, B.S., Le Thierry d'Ennequin, M., Peek, A.S., Sawkins, M.C.** (2000) Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. *PNAS* 97 (13): 7008-7015.
- Gerady-Schahn, R., Oelmann, S., Bakker, H.** (2001) Nucleotide sugar transporters: biological and functional aspects. *Biochimie* 83 (8): 775-782.
- Gerhardt, R., Stitt, M., Heldt, H.W.** (1997) Subcellular metabolite levels in spinach leaves. Regulation of sucrose synthesis during diurnal alterations in photosynthetic partitioning. *Plant Physiol.* 83: 399-407.
- Gilbert, W.** (1987) The exon theory of genes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52: 901-905.

- Gilbert, W., Glynias, M** (1993) On the ancient nature of introns. *Gene* 135:137-144.
- Gilmartin, M.G., Sarokin, L., Memelink, J., Chua, N.-H.** (1990) Molecular Light Switches for Plant Genes. *Plant Cell* 2: 369-378.
- Girke, T., Todd, J., Ruuska, S., White, J., Benning, C., Ohlrogge, J.** (2000) Microarray analysis of developing *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol.*, 124: 1570-1581.
- Giroux, M.J., Hannah, L.C.** (1994) ADP-Glucose pyrophosphorylase in shrunken-2 and brittle-2 mutants of maize. *Mol. Gen. Genet.* 243:400-408.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davies, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jaq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G** (1997) Life with 6000 Genes. *Science* 274 (5287): 563-567.
- Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M.J., Schmitt, D., Berthier-Vergnes, O.** (2001) Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal. Biochem.* 295 (1): 17-21.
- Goldberg, R.B., Barker, S.J., Perez-Grau, L.** (1989) Regulation of Gene Expression during Plant Embryogenesis. *Cell* 56: 149-160.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-579.
- Harper, J.F., Surowy, T.K., Sussman, M.R.** (1989) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1234-1238.
- Harrison, C.J., Hedley, C.L., Wang, T.L.** (1998) Evidence that the rug3 locus of pea encodes plastidial phosphoglucomutase confirms the the imported substrate for starch synthesis in pea amyloplasts is glucose-6-phosphate. *Plant J.* 13: 753-762.
- Haseloff, J., Siemering, R.K., Prasher, D.C., Hodge, S.** (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *PNAS* 91: 2122-2127.
- Hawkins, J.D.** (1988) A survey on intron and exon lengths. *Nucl. Acid Res.* 16, 9893-9908.
- Hebsgaard, S.M., Korning, P.G., Tolstrup, N., Engelbrecht, J., Rouze, P., Brunak, S.** (1996) Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucl. Acids Res.* 24: 3439-3452.
- Hedrich, R., Raschke, K., Stitt, M.** (1985) A role for fructose-2,6-bisphosphate in regulating carbohydrate metabolism in guard cells. *Plant Physiol.* 79: 977-982.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M.** (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.

- Heilmann, I., Shin, J., Huang, J., Perera, I.Y., Davies, E.** (2001) Transient Dissociation of Polyribosomes and Concurrent Recruitment of Calreticulin and Calmodulin Transcripts in Gravistimulated Maize Pulvini. *Plant Physiol.* 127: 1193-1203.
- Heinz E, Schmidt H, Hoch M, Jung KH, Binder H, Schmidt RR.** (1989) Synthesis of different nucleoside 5'-diphospho-sulfoquinovoses and their use for studies on sulfolipid biosynthesis in chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 15;184(2): 445-453.
- Henke, W., Jung, M., Jung, K., Lein, M., Schlechte, H., Berndt, C., Rudolph, B., Schnorr, D., Loening, S.A.** (1997) Increased analytical sensitivity of RT-PCR of PSA mRNA decreases diagnose specificity of detection of prostatic cells in blood. *International Journal of cancer* 70 52-56.
- Herold, A., Leegood, P.H., McNeill, P.H., Robinson, S.P.** (1981) Accumulation of maltose during photosynthesis in protoplasts isolated from spinach leaves treated with mannose. *Plant Physiol.* 67: 85-88.
- Herrmann, K.M.** (1995) The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-11.
- Herrmann, K.M., Waeber, L.M.** (1999) The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* 50: 473-503.
- Herrmann, R.G.** (1997) Eukaryotism, towards a new interpretation. In *Eukaryotism and Symbiosis* (Schenk, H.E.A., Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E., Schwemmler, W., eds.) Springer Verlag, Berlin, S. 73-118.
- Hibberd, J.M., Quick, P.** (2002) Characteristics of C4 photosynthesis in stems and petioles of C3 flowering plants.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R.** (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10: 413-417.
- Hill, L.M., Smith, A.M.** (1991) Evidence that glucose 6-phosphate is imported as the substrate for starch synthesis by the plastid of developing pea embryos. *Planta* 185:91-96.
- Hochuli, E., Bannwart, W., Dögeli, H., Gentz, R., Stüber, D.** (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology* 6: 1321-1325.
- Hod, Y.** (1992) A simplified ribonuclease protection assay. *Biotechniques* 13: 852-854.
- Höfgen, R., Willmitzer, L.** (1990) Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci.* 66, 221-230.
- Hull, R., Covery, S.N.** (1983) Characterisation of cauliflower mosaic virus DNA forms isolated infected turnip leaves. *Nucleic Acids Res.* 11(6): 1881.1895.

- Ishimaru, K., Ishikawa, I., Matsuoka, M., Ohsugi, R. (1997) Analysis of a C₄ maize pyruvate,orthophosphate dikinase expressed in C₃ transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Science* 129: 57-64.
- Ishimaru, K., Okawa, Y., Ishige, T., Tobias, D.J., Ohsugi, R. (1998) Elevated pyruvate,orthophosphate dikinase (PPDK) activity alters carbon metabolism in C₃ transgenic potatoes with a C₄ maize PPDK gene. *Physiol. Plant.* 103: 340-346.
- Israeli, R.S., Miller, W.H. Jr., Su. S.L., Powell, C.T., Fair, W.R., Samadi, D.S, Huryk, R.F., DeBlasio, A., Edwards, E.T., Wise, G.J et al. (1994) Sensitive nested reverse polymerase chain reaction detection of circulation prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate specific antigen-based assays. *Cancer Research* 54: 6306-6310.
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heynecker, H., Bolivar, F., Boyer, H.W. (1977) Expression in *E. coli* of a chemically synthesized gene for hormone somatostatin. *Science* 198: 1056-1063.
- Iwakura, M., Furusawa, K., Kokubu, T., Ohashi, S., Tanaka, Y., Shimura, Y., Tsuda, K. (1992) Dihydrofolate reductase as a new "affinity handle". *J. Biochem.* 111 (1): 37-45.
- Jack, D.L., Yang, N.M., Saier, M.H. Jr. (2001) The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* 268 (13): 3620-3639.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Frysse, L., Weig, A.R., Kjellbom, P. (2001) The Complete Set of Genes Encoding Major Intrinsic Proteins in *Arabidopsis* Provides a Framework for a New Nomenclature for Major Intrinsic Proteins in Plants. *Plant Physiol.* 126: 1358-1369.
- Johnson, M.A., Péres-Amador, M.A., Lidder, P., Green, P.J. (2000) Mutants of *Arabidopsis* defective in a sequence-specific mRNA degradation pathway. *PNAS* 97 (25): 13991-13996.
- Johnson, P.E., Fox, S.R., Hills, M.J., Rawsthorne, S. (2000) Inhibition by long-chain acyl-CoAs of Glc-6-P metabolism in plastids isolated from developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Biochem J.* 348: 145-150.
- Kaiser, W.M., Huber, S.C. (1994) Post-translational regulation of nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*: effects of phosphoprotein phosphatase inhibitors, free Mg²⁺ and 5'-AMP. *Planta* 193: 358-364.
- Kaiser, W.M., Huber, S.C. (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J. Exp. Bot.* 52 (363): 1981-1989.
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A., Flügge, U.-I. (1998) Molecular characterisation of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* 10: 105-117.
- Kampfenkel, K., Möhlmann, T., Batz, O., van Montagu, M., Inzé, D., Neuhaus, H.E. (1995) Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA

- encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants. FEBS Lett. 374: 351-355.
- Kang, F., Rawsthorne, S.** (1994) Starch and fatty acid synthesis in plastids from developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant J. 6: 795-805.
- Kaplan, R.S., Mayor, J.A., Wood, D.O.** (1993) The mitochondrial tricarboxylate transport protein. cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins.
- Kapust, R.B., Waugh, D.S.** (1999) Escherichia coli maltose-binding proteins is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. Protein Sci. 8 (8): 1668-1674.
- Kasahara, M., Hinkle, P.C.** (1977) Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. J. Biol. Chem. 257, 7384-7390.
- Kawakita, M., Ishida, N., Miura, N., Sun-Wada, G.-H., Yoshioka, S.** (1998). Nucleotide sugar transporters: elucidation of their molecular identity and its implication for future studies. J. Biochem. 123: 777-785.
- Kawasaki, E.S., Wang, A.M.** (1989) Detection of gene expression, p. 89-98. In H.A. Erlich (Ed.), PCR Technology. Stockton Press, Hampshire, UK.
- Keegstra, K., Cline, K.** (1999) Protein import and routing systems of chloroplasts. Plant Cell. (4):557-570.
- Keegstra K, Werner-Washburne M, Cline K, Andrews J.** (1984)The chloroplast envelope: is it homologous with the double membranes of mitochondria and gram-negative bacteria? J. Cell Biochem. 24(1):55-68.
- Kersanach, R., Brinkmann, H., Liaud, M.F., Zang, D.X., Martin, W., Cerff, R.** (1994) Five identical intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin. Nature 367: 387-389.
- Kinsman, E.A., Pyke, K.A.** (1998) Bundle sheath cells and cell-specific plastid development in Arabidopsis leaves. Development 125: 1815-1822.
- Kleppinger-Sparace, K.F., Mudd, J.B., Bishop, D.G.** (1985) Biosynthesis of sulfoquinovosyldiacylglycerol in higher plants: the incorporation of ^{35}S by intact chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 240 (2): 859-865.
- Köhler, U., Donath, M., Mendel, R.R., Cerff, R., Hehl, R.** (1996) Intron-specific stimulation of anaerobic gene expression and splicing efficiency in maize cells. Mol. Gen. Genet. 251:252-258.
- Kofler, H., Häusler, R.E., Schulz, B., Gröner, F., Flügge, U.-I., Weber, A.** (2000) Molecular characterization of a new mutant allele of the plastid phosphoglucomutase in *Arabidopsis*, and complementation of the mutant with the wild-type cDNA. Mol. Gen. Genet. 263: 978-86
- 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.

- Krämer, R., Aquila, H, Klingenberg, M.** (1977) Isolation of the unliganded adenosine 5'-diphosphate, adenosine 5'-triphosphate carrier-linked binding protein and incorporation into the membranes of liposomes. *Biochemistry* 16: 4949-4953.
- Kumar, A., Bennetzen, J.L.** (1999) Plant retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 33:479-532.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Läuchli, A., Kramer, D., Pitman, M.G., Lüttge, U.** (1974) Ultrastructure of xylem parenchyma cells of barley roots in relation to ion transport to the xylem. *Planta* 119: 85-99.
- Larhammar, D., Risinger, C.** (1994) Why so few pseudogenes in tetraploid species? *Trends Genet.* 10 (12): 418-419.
- Larsson, C., Collin, C., Albertson, P.A.** (1971) Characterization of three classes of chloroplasts obtained by counter-current distribution. *Biochim. Biophys. Acta* 245: 425-438.
- Lee, A.G.** (2000) Membrane lipids: it's only a phase. *Curr Biol.* 10 (10): 377-380.
- Lee, C., Lewin, A., Branton, D.** (1987) Copper staining: A five minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 166: 308-312.
- Lewin, B.** (1994) *Genes V.* Oxford University Press. Oxford, New York.
- Li, WH.** (1980) Rate of gene silencing at duplicate loci: a theoretical study and interpretation of data from tetraploid fishes. *Genetics* 95(1): 237-58.
- Loddenkötter, B., Kammerer, B., Fischer, K., Flügge, U.-I.** (1993) Expression of the functional mature chloroplast triose phosphate translocator in yeast internal membranes and purification of the histidine tagged protein by a single metal affinity chromatography step. *PNAS* 90: 2155-2159.
- Long, M., Rosenberg, C.** (2000) Testing the "proto-splice sites" model of intron origin: evidence from analysis of intron phase correlations. *Mol. Biol. Evol.* 17 (12): 1789-1796.
- Luan, D.D., Korman, M.H., Jakubczak, J.L., Eickbush, T.H.** (1993) Reverse transcription of R2B mRNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* 72(4): 595-605.
- Lübberstedt, T., Bolle, C.E.H., Sopory, S., Flieger, K., Herrmann, R.G., Oelmüller, R.** (1994) Promoters from Genes for Plastid Proteins Possess Regions with Different Sensivities towards Red and Blue Light. *Plant Physiol.* 104: 997-1006.
- Lübke, T., Marquardt, T., Etzioni, A., Hartmann, E., von Figura, K., Körner, C.** (2001) Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nature genetics* 28: 73-76.

- Lühn, K., Wild, M.K., Eckhardt, M., Gerady-Schahn, R., Vestweber, D.** (2001) The gene defective in leudocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. *Nat. Genet.* 28(1): 69-72.
- Lyamichev, V. Brow, M.A., Dahlberg, J.E.** (1993) Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* 260:778-783.
- Lynn, D.G., Chen, R.H., Manning, K.S., Wood, H.N.** (1987) The structural characterization of endogenous factors from *Vicia rosea* crown gall tumors that promote cell division of tobacco cells. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 84: 615-619.
- Macasev. D., Newbigin, E., Whelan, J., Lithgow, T.** (2000) How do plant mitochondria avoid importing chloroplast proteins? Components of the import apparatus Tom20 and Tom22 from *Arabidopsis* differ from there fungal counterparts. *Plant Physiol.* 123: 811-816.
- MacKintosh, C.** (1992) Regulation of spinach leaf nitrate reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1137: 121-127.
- Marchionni, M., Gilbert, W.** (1986) The triosephosphate isomerase gene from maize: introns antedate the plant-animal divergence. *Cell* 46(1): 133-141.
- Martin, W., Herrmann, R.G.** (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens and why? *Plant Physiol.* 118: 9-17.
- May, T., Soll, J.** (2000) 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* 12: 53-63.
- McElver, J., Tzafirir, I., Aux, G., Rogers, R., Ashby, C., Smith, K., Thomas, C., Schetter, A., Zhou, Q., Cushman, M.A., Tossberg, J., Nickle, T., Levin, J.Z., Law, M., Meinke, D., Patton, D.** (2001) Insertional Mutagenesis of Genes Required for Seed Development. *Genetics* 159: 1751-1763.
- Meinke, D.W.** (1994) Seed development in *Arabidopsis*, pp. 253-295, in *Arabidopsis thaliana*, edited by E. M. Meyerowitz and C.R. Somerville. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Merrit, H., McCullough, A.J., Schuler, M.A.** (1997) Internal AU-rich elements modulate activity of two competing 3' splice sites in plant nuclei. *Plant J.* 12: 937-943.
- Miège, C., Maréchal, E., Shimojima, M., Awai, K., Block, M., Otha, H., Takamiya, K.-I., Douce, R., Joyard, J.** (1999) Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *Eur. J. Biochem.* 265: 990-1001.
- Miernyk, J.A., Dennis, D.T.** (1982) Isoenzymes of the glycolytic enzymes in endosperm from developing castor oilseeds. *Plant Physiol.* 69: 825-828.
- Miller, A.J., Zhou, J.J.** (2000) *Xenopus* oocytes as an expression system for plant transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465 (1-2): 343-358.

- Möhlmann, T., Tjaden, J., Henrichs, G., Quick, W.P., Häusler, R.E., Neuhaus, H.E.** (1997) ADP glucose drives starch synthesis in isolated maize-endosperm amyloplasts. Characterization of starch synthesis and transport properties across the amyloplastic envelope. *Biochem. J.* 324: 503-509.
- Montgomery, R.A., Dallman, M.J.** (1997) Semi-quantitative polymerase chain reaction analysis of cytokine and cytokinereceptor gene expression during thymic ontogeny. *Cytokine* 9:717-726.
- Moran, J.V., DeBerardinis, R.J., Dazazian, H.H. Jr.** (1999) Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* 283: 1530-1534.
- Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwer, C.T.** (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954-962.
- Nadeau, J.H., Sankoff, D.** (1997) Comparable rates of gene loss and functional divergence after genome duplications early in vertebrate evolution. *Genetics* 147 (3): 1259-1266.
- Nakamura, R.L., McKendree, W.L. Jr., Hirsch, R.E., Sedbrook, J.C., Gaber, R.F., Sussman, M.R.** (1995) Expression of an Arabidopsis potassium channel gene in guard cells. *Plant Physiol.* 109 (2): 371-374.
- Nalecz, K.A., Kaminska, J., Nalecz, M.J., Azzi, A.** (1992) The activity of pyruvate carrier in a reconstituted system: substrate specificity and inhibitor sensitivity. *Arch. Biochem. Biophys.* 297: 162-168.
- Nalecz, M.J., Nalecz, K.A., Azzi, A.** (1991) Purification and functional characterisation of the pyruvate (monocarboxylate) carrier from baker's yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochim. Biophys. Acta* 1079 (1): 87-95.
- Neuhaus, H.E., Heinrichs, G., Scheibe, R.** (1993) Characterization of glucose-6-phosphate incorporation into starch by isolate intact cauliflower bud plastids. *Plant Physiol.* 101: 573-578.
- Nomura, M., Sentoku, N., Tajima, S., Matsuoka, M.** (2000) Expression patterns of cytoplasmic pyruvate, orthophosphate dikinase of rice (C_3) and maize (C_4) in a C_3 plant, rice. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 343-347.
- Novak, M.A., Boerlijst, M.C., Cooke, J., Smith, J.M.** (1997) Evolution of genetic redundancy. *Nature* 388, 167-171.
- Ohlrogge, J.B., Jaworski, J.G., Post-Beittenmiller, D.** (1993) De novo fatty acid biosynthesis. In TS Moore, ed, *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 3-32.
- Okita, T.** (1992) Is there an alternative pathway for starch synthesis? *Plant Physiol.* 100: 560-564.
- Overlach, S., Dieckmann, W., Raschke, K.** (1993) Phosphate translocator of isolated guard-cell chloroplasts from *Pisum sativum* L. transports glucose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 101: 1201-1207.

- Palmer, J.D., Logsdon, J.M. Jr.** (1991) The recent origin of introns. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1: 470-477.
- Pang, S.-Z., DeBoer, D.L., Wan, Y., Ye, G., Layton, J.G., Neher, M.K., Armstrong, C.L., Fry, J.E., Hinchee, M.A.W., Fromm, M.E.** (1996) An improved Green Fluorescent gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.* 112: 893-900.
- Pardo, J.M., Serrano, R.** (1989) Structure of a plasma membrane H⁺-ATPase gene from the plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 264: 8557-8562.
- Parker, R.M., Barnes, N.M.** (1999) mRNA: detection by in situ and northern blot hybridization. *Methods in Molecular Biology* 106: 247-283.
- Peeters, N., Small, I.** (2001) Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1541 (1-2): 54-63.
- Perez, M., Hirschberg, C.B.** (1985) Translocation of UDP-N-acetylglucosamine into vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 260: 4671-4678.
- Pickett, F.B., Meeks-Wagner, D.R.** (1995) Seeing double: appreciating genetic redundancy. *Plant Cell* 7 (9): 1347-1356.
- Poethig, S.** (1989) Genetic mosaics and cell lineage in plants. *Trends Genet.* 5: 273-277.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.
- Pozeto-Romero, J., Frehner, M., Viale, A.M., Akazawa, T.** (1991) Direct transport of ADP glucose by an adenylate transporter is linked to starch biosynthesis in amyloplasts. *PNAS* 88: 5769-5773.
- Preiss, J.** (1991) Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.* 7: 59-114.
- Proud, C.G.** (2001) Regulation of mRNA translation. *Essays Biochem.* 37: 97-108.
- Puente, P., Wie, N., Deng, X.W.** (1996) Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 15: 3732-3743.
- Pyke, K.A., Marrison, J.L., Leech, R.M.** (1991) Temporal and spatial development of the cells of the expanding first leaf of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Exp. Bot.* 42:1407-1416.
- Qui, Q., Kleppinger-Sparace, K.F., Sparace, S.A.** (1994) The role of the triose-phosphate shuttle and glycolytic intermediates in fatty acid and glycerolipid biosynthesis in pea root plastids. *Planta* 194: 193-199.
- Quick, W.P., Scheibe, R., Neuhaus, H.E.** (1995) Induction of a hexose-phosphate translocator activity in spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 109: 113-121.

- Reischl, U., Kochanowski, B.** (1999) Quantitative PCR. In: Quantitative PCR Protocols pp 3-30. Eds. B. Kochanowski und U. Reischl. Totowa, NJ Humana Press.
- Reiter, W.-D., Chapple, C.C.S., Somerville, C.R.** (1993) Altered growth and cell walls in a fucose deficient mutant of Arabidopsis. *Science* 261: 1032-1035.
- Reiter, W.-D., Vanzin, G.F.** (2001) Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. *Plant Mol. Biol.* 47: 95-113.
- Rethmeier, R., Seurinck, J., Van Montagu, M, Cornelissen, M.** (1997) Intron-mediated enhancement of transgene expression in maize is a nuclear, gene-dependent process. *Plant J.* 12(4): 895-899.
- Reumann, S., Davila-Aponte, J., Keegstra, K.** (1999) The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: Identification of a cyanobacterial homolog. *PNAS* 96: 784-789.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., Yu, G.-L.** (2000) Arabidopsis Transcription Factor: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Riggs, P.** (2000) Expression and purification of recombinant proteins by fusion to maltose-binding protein. *Mol. Biotechnol.* 15 (1): 51-63.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T.** (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154-160.
- Rosche, E., Streubel, M., Westhoff, P.** (1994) Primary structure of the photosynthetic pyruvate,orthophosphate dikinase of the C₃ plant *Flaveria pringlei* and expression analysis of pyruvate,orthophosphate dikinase sequences in C₃, C₃-C₄ and C₄ *Flaveria* species. *Plant Mol. Biol.* 26: 763-769
- Rost, S., Frank, C., Beck, E.** (1997) The chloroplast envelope is permeable for maltose but not for maltodextrins. *Biochim. Biophys. Acta* 1291: 221-287.
- Roy, S.W., Nosaka, M., de Souza, S.J., Gilbert, W.** (1999) Centripetal modules and ancient introns. *Gene* 238(1): 85-91.
- Sack, F.D.** (1991) Plant gravity sensing. *Int. Rev. Cytol.* 127: 193-252.
- Salisbury, F.** (1993) Gravitropism: changing ideas. *Hortic. Rev.* 15: 233-277.
- San Miguel, P.A., Tikhonov, Y.K., Jin, Y.K. et al.** (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274: 765-768.
- Sauer, N., Friedländer, K., Gräml-Wicke, U.** (1990) Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 9: 3045-3050.

- Sauer, N., Stolz, J.** (1994) SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*: expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J.* 6: 67-77.
- Sauer, N., Tanner, W.** (1989) The hexose carrier from *Chlorella* cDNA cloning of a eukaryotic H⁺ cotransporter. *FEBS Lett* 259: 43-46.
- Savant, S.V., Kiran, K., Singh, P.K., Tuli, R.** (2001) Sequence architecture downstream of the initiator codon enhances gene expression and protein stability in plants. *Plant Physiol.* 126 (4): 1630-1636.
- Schäfer, G., Heber, U., Heldt, H.W.** (1977) Glucose transport into spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 60: 286-289.
- Schimke, R.T., Doyle, D.** (1970) Control of enzyme levels in animal tissues. *Annu. Rev. Biochem.* 39: 929-976.
- Schmid, J., Amrhein, N.** (1995) Molecular organisation of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* 39: 737-749.
- Schnabl, H.** (1981) The compartmentation of carboxylating and decarboxylating enzymes in guard cell protoplasts. *Planta* 152: 307-313.
- Schroeder, J.I.** (1995) Heterologous expression of higher plant transport proteins and repression of endogenous ion currents in *Xenopus* oocytes. *Methodes Cell Biol.* 50: 519-533.
- Schünemann, D., Borchert, S.** (1994) Specific transport of inorganic phosphate and C3- and C6-sugar phosphates across the envelope membranes of tomato leaf chloroplasts, tomato fruit chloroplasts and fruit chromoplasts. *Bot. Acta* 107: 461-467.
- Schulz, B., Frommer, W.B., Flügge, U.-I., Hummel, S., Fischer, K., Willmitzer, L.** (1993) Expression of the triose phosphate translocator gene from potato is light dependent and restricted to green tissues. *Mol. Gen. Genet* 238:357-361.
- Sehnke, P.C., Chung, H.-J., Wu, K., Ferl, R.J.** (2001) Regulation of starch accumulation by granule associated plant 14-3-3 proteins. *PNAS* 98 (2) 765-770.
- Sehnke, P.C., Ferl, R.J.** (2000) Plant 14-3-3s: omnipotent metabolic phosphopartners? *Sci STKE* 56:PE1.
- Sellner, L.N., Turbett, G.R.** (1998) Comparison of three RT-PCR methods. *Biotechniques* 25 (2): 230-234.
- Shannon, J.C., Pien, F.-M., Cao, H., Liu, K.-C.** (1998) Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplasmidial synthesized ADP-glucose into amyloplasts of maize endosperm. *Plant Physiol.* 117: 1235-1252.
- Singht, B.K., Shaner, D.L.** (1995) Biosynthesis of branched chain amino acids: From test tube to field. *Plant Cell* 7: 935-944.

- Smith, A.M.** (1988) Major differences in isoforms of starch-branching enzyme between developing embryos of round- and wrinkled-seeded peas. *Planta* 175: 270-279.
- Smith, M.W., Doolittle, R.F.** (1992) Anomalous phylogeny involving the enzyme glucose-6-phosphate isomerase. *J. Mol. Evol.* 34: 544-545.
- Soares, M.B., Schon, E., Henderson, A., Karathanasis, S.K., Cate, R., Zeitlin, S., Chirgwin, J., Efstratiadis, A.** (1985) RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Mol Cell Biol.* 5(8): 2090-2103.
- Soll, J., Bölter, B., Wagner, R., Hinnah, S.C.** (2000) The chloroplast outer envelope: a molecular sieve? *Trends Plant Sci.* 5: 137-138.
- Song, W.Y., Pi, L.Y., Bureau, T.E., Ronald, P.C.** (1998) Identification and characterization of 14 transposon-like elements in the noncoding regions of members of the Xa21 family of disease resistance genes in rice. *Mol. Gen. Genet.* 258 (5): 449-456.
- Spring, J.** (1997) Vertebrate evolution by interspecific hybridisation - are we polyploid? *FEBS Lett.* 400: 2-8.
- Stitt, M., ap Rees, T.** (1979) Capacities of pea chloroplasts to catalyse the oxidative pentose phosphate pathway and glycolysis. *Phytochem.* 18, 1905-1911.
- Stoltzfus, A., Lodsdon, J.M. Jr., Palmer, J.D., Doolittle, W.F.** (1997) Intron 'sliding' and the diversity of intron positions. *PNAS* 94: 10739-10744.
- Stomp, A.-H.** (1992) Histochemical Localization of β -Glucuronidase. *In: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression.* Academic Press, Inc. Ed. S. R. Gallagher.
- Streatfield, S.J., Weber, A., Kinsman, E.A., Häusler, R.E., Li, J., Post-Beittenmiller, D., Kaiser, W.M., Pyke, K.A., Flügge, U.-I., Chory, J.** (1999) The Phosphoenolpyruvate/Phosphate Translocator Is Required for Phenolic Metabolism, Palisade Cell Development, and Placid-Dependent Nuclear Gene Expression. *Plant Cell* 11: 1609-1621.
- Subhan, D., Murthy, S.D.S.** (2001) Effect of polyamines on chlorophyll and protein contents, photochemical activity, and energy transfer in detached wheat leaves during dark incubation. *Biol. Plant.* 44: 529-533
- Sullivan, T.D., Kaneko, Y.** (1995) The maize *brittle1* gene encodes amyloplast membrane polypeptides. *Planta* 196: 477-484.
- Suzuki, T., Higgins, P.J., Crawford, D.R.** (2000) Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29 (2): 332-337.
- Tavares, R., Aubourg, S., Lechary, A., Kreis, M.** (2000) Organization and structural evolution of four multigene families in *Arabidopsis thaliana*: AtLCAD, AtLGT, AtMYST and AtHD-GL2. *Plant Mol. Biol.* 42: 703-717.

- Tetlow, I.J., Bowsher, C.G., Emes, M.J.** (1996) Reconstitution of the hexose phosphate translocator from the envelope membranes of wheat endosperm amyloplasts. *Biochem. J.* 319: 717-723.
- Teutonico, R.A., Dudley, M.W., Orr, J.D., Lynn, D.G., Binns, A.N.** (1991) Activity and accumulation of cell division-promoting phenolics in tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 97: 288-297
- The C. elegans Sequencing Consortium** (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science.* 282 (5396):2012-2018.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., DeBorman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisoar, T., Igout, A., Heinen, E.** (1999) Housekeeping genes als internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 75 (2-3): 291-295.
- Thom, E., Möhlmann, T., Quick, P., Camara, B., Neuhaus, H.E.** (1998) Sweet pepper plastids: Enzymic equipment, characterisation of the plastidic oxidative pentose-phosphate pathway, and transport of phosphorylated intermediates across the envelope membrane. *Planta* 204: 226-233.
- 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 Res.* 25: 4876-4882.
- Thorbjørnsen, T., Volland, P., Denyer, K., Olsen, O.A., Smith, A.M.** (1996) Distinct isoforms of ADP-glucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm. *Plant J.* 10: 243-250.
- Trotman, C.N.A.** (1998) Introns early: slipping lately? *TIG* 14(4): 132-134.
- Tyagi, S., Kramer, F.R.** (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization, *Nature Biotechnology* 14:303-308.
- Tyson, R. H., ap Rees, T.** (1988) Starch synthesis by isolated amyloplasts from wheat endosperm. *Planta* 175: 33-38.
- Uozumi, N., Nakamura, T., Schroeder, J.I., Muto, S.** (1998) Determination of transmembrane topology of an inward-rectifying potassium channel from *Arabidopsis thaliana* based on functional expression in *Escherichia coli*. *PNAS* 95: 9773-9778.
- van Bel, A.J.E.** (1993) Strategies of phloem loading. *Ann. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol.* 44: 253-281.
- van der Staeten, D., Rodrigues-Pousada, R.A., Goodman, H.M., van Montagu, M.** (1991) Plant enolase: Gene structure, expression and evolution. *Plant Cell* 3: 719-735.
- Vierstra, R.D., Callis, J.** (1999) Polypeptide tags, ubiquitous modifiers for plant protein regulation. *Plant Mol. Biol.* 41 (4); 435-442.
- Villalba, J.M., Palmgran, M.G., Berberian, G.E., Ferguson, C., Serrano, R.** (1992) Functional expression of plant plasmamembran H⁺-ATPase in yeast endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 267: 12341-12349.

- Voznesenskaya, E.V., Franceschi, V.R., Kiirats, O., Freitag, H., Edwards, G.E.** (2001) Kranz anatomy is not essential for terrestrial C4 plant photosynthesis. *Nature* 414: 543-546.
- Waegemann, K., Soll, J.** (1996) Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J. Biol. Chem.* 271: 6545-6554.
- Wang, T., Brown, M.J.** (1999) mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Analytical Biochemistry* 269:198-201.
- Wang, A.M., Doyle, M.V., Mark, D.F.** (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *PNAS* 86: 9717-9721.
- Ward, J.M.** (2001) Identification of novel families of membrane proteins from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* 17 (6): 560-563.
- Wasserman, L., Dreilinger, A., Easter, D., Wallace, A.** (1999) A seminested RT-PCR Assay for HER2/neu: initial validation of a new method for the detection of disseminated breast cancer cells. *Molecular Diagnostics* 4:21-28.
- Weber, A., Servaites, J.C., Geiger, D.G., Kofler, H., Hille, D., Gröner, F., Hebbeker, U., Flügge, U.-I.** (2000) Identification, Purification, and Molecular Cloning of a Putative Plastidic Glucose Transporter. *Plant Cell* 12: 787-801.
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N., Wobus, U.** (1997) A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9: 895-908.
- Weber, K., Osborn, M.** (1969) The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4409.
- Weis, J.H., Tan, S.S., Martin, B.K, Wittwer, C.T** (1992) Detection of rare mRNA via quantitative RT-PCR. *Trends in Genetics* 8: 263-264.
- Wendel, J.F.** (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.* 42(1): 225-249.
- Wessler, S.R., Bureau, T.E., White, S.E.** (1995) LTR-retrotransposons and MITES: important players in the evolution of plant genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5(6): 814-821.
- White, J.A., Todd, J., Newman, T., Focks, N., Girke, T., Martinez de Ilarduya, O., Jaworski, J.G., Ohlrogge, J., Benning, C.** (2000) A new set of Arabidopsis ESTs from developing seeds: the metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiol.* 124: 1582-1594.
- Wiese, T.J., Wuensch, S.A., Ray, P.D.** (1996) Synthesis of citrate from phosphoenolpyruvate and acetylcarnitine by mitochondria from rabbit, pigeon and rat liver: implications for lipogenesis.
- Williams, M.L., Farrar, Pollock, C.J.** (1989) Cell specialization within the parenchymatous bundle sheath of barley. *Plant Cell Environ.* 12: 909-18

- Williamson, L.R., Plano, G.V., Winkler, H.H., Krause, D.C., Wood, D.O.** (1989) Nucleotide sequence of the *Rickettsia prowazekii* ATP/ADT translocase-encoding gene. *Gene* 80: 269-278.
- Witte, C.-P., Le, Q.H., Bureau, T., Kumar, A.** (2001) Terminal-repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes. *PNAS* 98 (24): 13778-13783.
- Wittwer, C.T., Fillmore, G.C., Hillyard, D.R.** (1989) Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. *Nucleic Acids Research* 17: 4353-4357.
- Wittwer, C.T., Garling, D.J.** (1991) Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques* 10: 76-83.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P.** (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130-138.
- Wolter FP, Fritz CC, Willmitzer L, Schell J, Schreier PH.** (1988) *rbcS* genes in *Solanum tuberosum*: conservation of transit peptide and exon shuffling during evolution. *PNAS* 85(3): 846-850.
- Woo, K.C., Flügge, U.-I., Heldt, H.W.** (1987) A two-translocator model for the transport of 2-oxoglutarate and glutamate in chloroplasts during ammonia assimilation in the light. *Plant Physiol.* 84: 624-632.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T. et al.** (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415 (6874): 871-80.
- Wu, K., Rooney, M.F., Ferl, R.J.** (1997) The Arabidopsis 14-3-3 multigene family. *Plant Physiol.* 114: 1421-1431.
- Yu, T.-S., Kofler, H., Häusler, R.E., Hille, D., Flügge, U.-I., Zeemann, S.C., Smith, A.M., Kossmann, J., Lloyd, J., Ritte, G., Steup, M., Lue, W.-L., Chen, J., Weber, A.** (2001) The Arabidopsis *sex1* mutant is defective in the R1 Protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter.
- Yu, T.-S., Lue, W.-L., Wang, S.-M., Chen, J.** (2000) Mutation of Arabidopsis Plastid Phosphoglucose Isomerase Affects Leaf Starch Synthesis and Floral Initiation. *Plant Physiol.* 123: 319-325.

8. Anhänge

8.1. Die komparative CT-Methode (nach User Bulletin #2, Applied Biosystems, 1997)

Die komparative CT-Methode ähnelt der Standardgeradenmethode, sie nutzt jedoch arithmetische Formeln um das gleiche Resultat bei der relativen Quantifizierung zu erreichen. Die Menge des Zielgens, normalisiert auf eine endogene Referenz (z.B. 18SrRNA) und relativ zu einem Kalibrator (z.B. Blatt), wird durch den Ausdruck:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

Ableitung der Formel:

Folgende Gleichung beschreibt eine exponentielle Amplifikation während einer PCR:

$$X_n = X_o \times (1 + E_x)^n$$

X_n	=	Anzahl der Zielmoleküle zum Zeitpunkt n
X_o	=	Anfangszahl der Zielmoleküle
E_x	=	Effizienz der Zielgenamplifikation
n	=	Anzahl der Zyklen

Der „threshold cycle“ (CT) stellt die Zykluszahl dar, zu der die Menge des amplifizierten Zielgens eine festgelegte Grenze überschreitet. Daher ist

$$X_T = X_o \times (1 + E_x)^{CT,X} = K_x$$

wobei

X_T	=	„threshold“-Zahl des Zielmoleküls
$C_{T,X}$	=	„threshold“ Zyklus für die Zielgenamplifikation
K_x	=	Konstante

Eine ähnliche Gleichung für die endogene Referenzreaktion lautet:

$$R_T = R_o \times (1 + E_R)^{CT,R} = K_R$$

R_T	=	„threshold“-Zahl des Referenzmoleküls
R_0	=	Anfangszahl der Referenzmoleküle
E_R	=	Effizienz der Referenzgenamplifikation
$C_{T,R}$	=	„threshold“ Zyklus für die Referenzgenamplifikation
K_R	=	Konstante

Teilt man nun X_T durch R_T , ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$

Die exakten Werte von X_T und R_T hängen von einer Reihe von Faktoren ab, z.B. von

- dem Reporterfluoreszenzfarbstoff in der Probe
- dem Sequenzkontext
- der Reinheit der Probe
- der Festlegung des Fluoreszenzgrenzwertes („threshold“)

Deswegen ist die Konstante K nicht unbedingt gleich 1.

Angenommen, die Effizienzen des Zielgens und der Referenz sind gleich, dann ist

$$E_X = E_R = E$$

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K$$

oder
$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

wobei

X_N	=	X_0/R_0 , die normalisierte Zielgenmenge
ΔC_T	=	$C_{T,X} - C_{T,R}$, die Differenz der „threshold“-Zyklen von Ziel- und Referenzgen

Umformung dieser Gleichung ergibt:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

Im letzten Schritt wird X_N für eine beliebige Probe q durch X_N des Kalibrators (cb) geteilt:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta CT,q}}{K \times (1 + E)^{-\Delta CT,cb}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta CT}$$

wobei

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT,q - \Delta CT,cb$$

Für Amplikons, die für *real-time* PCR auf optimiert wurden, ist die Effizienz nahezu 1. Deswegen wird die Menge des Zielgens, normalisiert mit Hilfe einer endogenen Referenz und relativ zu einem Kalibrator, durch folgende Gleichung gegeben:

$$2^{-\Delta \Delta CT}$$

8.2. Verwendete Oligonukleotide

GPT1-Promotor

AraGPTrev ccg ttg cag cca aca tga c
GPT-3F ccc tct ttg aag ata tac ata cag

PPT1-Promotor

P1-XbaI-for gca cgt cta gat aaa tag act aag
P1-EcoRV-rev agc tga tat cta agg agt cag aga tcg gga

PPT2-Promotor

PPT2for gta cag tgt tag gcg aag tag
PPT2rev aca tgc ctc cta gct tca acc

GPT2cDNA

G2for1 cac ctc gag atc ata gtc
G2rev1 cac cgg aat gtt ctc tcc tcc

PPT2cDNA

PPT2forEcoRV tgc gat atc gga gca tct gat aag agg a
PPT2revXbaI tgc tct aga gcc cat tat ata att tcc atg

35S-fw gca aga ccc ttc ctc tat ata ag

GUS-test cag act gaa tgc cca cag gcc

pgi-for agc tgc gtt taa ggc tat gga
pgi-rev cca gac ctc agc gac aat tga

Primer für RT-PCR (Tm aller Oligonukleotidkombinationen = 60°C)

At18SrRNA-936F	tgc gaa agc att tgc caa g
At18SrRNA-1040R	tgg tcg gca tcg ttt atg gt
Aktin2-1543F	atg gaa gct gct gga atc cac
Aktin2-1682R	ttg ctc ata cgg tca gcg atg
GPT1-455F	tgg ctt acc tcg acg ctt tct
GPT1-617R	tac tca ccg ttg cag cca cat
GPT2-179F	ctt cga att tca agc gtg agg
GPT2-280R	tct gcg cgg att gtt cat c
PPT1-1092F	ttg gcg aga gta tca ccg gtt
PPT1-1207R	ccg aaa gca tta aca ggc ga
PPT2-901F	gct ggt gtt tgc ttg cat agc
PPT2-1007R	ata acc acc aca cgc ttc acg
XPT-156F	ggc ttt cac cga ttc cca a
XPT-289R	tga atc cga tga gcc aac g
TPT-104F	ccg tca att cag cac tgc atc
TPT-229R	atc gcc gac gaa tcg aga a
KAT1for	ttc gaa aga ttc tgc gtc gag
KAT1rev	tgg ttg atc ctg gct cca ag

Primer für PT-homologe Gene

at1g76340 for347	AGC TTC TCC TCC ACG CCA A
at1g76340 rev447	CCA TGG CTG ATG CAA GAA AAG
at1g06890 for963	GCC TCA GAT GAA AGA GAG CGA
at1g06890 rev1063	CCA CCG TCT TTT GCT GCA CT
at1g12490 for131	CAA TTG ACA CAG CGT CAG CA
at1g12490 rev231	GGT GAC CGA TGA TGA TGA ACC
at1g21070 for49	GGA GCA TGG GCT ATG AAC GT
at1g21070 rev149	AGA GTT GTC GCG AAG CTG AAG
at3g10290 for3	GTC GTC CCA TGC TCG AGG T
at3g10290 rev103	TGT TCA TCT TCG TCG TCG ATG
at3g48850 for979	ACA CTC ACT GGA GCG CAG TG
at3g48850 rev1079	GAT GGA GCA AGC GCA GTA GC
at4g32390 for800	CTG GTG TGG TTA AGG ATT GGC
at4g32390 rev900	CAA GAA CGC AAG CCC GTA A

at5g14040 for95	ACT CCA ACG CTG CAT TCG AG
at5g14040 rev195	CTC GGT GGG AGA TGC AAT AAG
at5g42420 for494	TTG CGA TTT TCT CGT CAT CCT
at5g42420 rev594	AAT CGG CGC TGT TTT ACT CAA
at5g57100 for100	TTG GAG GAC TTG AGA GCA TCG
at5g57100 rev200	GCA ACA GTT GGG CCA CAG AT
at2g25520 for239	TAC CAA TCG GCG CGT TGT A
at2g25520 rev369	AGG CAT TAG GGC TTT GAG CAT

Für LightCycler-Experimente verwendete Primer:

AktinSfor	tgt acg cca gtg atc gta caa cc
AktinBrev	gaa gca aga atg atg gaa cca ccg
TPTfor	ctg aag gtg gag ata ccg ctg
TPTrev2	caa cga tga tgg cag gag gaa tgc
GPTfor	ggt agt gag atg tga agc tta
GPTrev	aga cag gcg tag tag ttc atc
Bac1	gca caa tgc ttt ctt caa tca acc
Bac2	ggt cat cgg gaa gct cga tgt ta
PPT1for	agt gct gag gaa ggt gat aac
PPT1rev2	tac aat ggc acc gag tac cca tgg
F4P13for	tca att agg gtg tgg aac gtt ga
F4P13rev	acc atc tcc aat atc ata tac gat ac
RPTfor	ccg ttg gct cat cgg att caa
RPTrev	gct ctg taa gct acg ttt aga

Primer zur Herstellung des GPT1-PCR *overlap*-Konstruktes

N-for	gtc gac gaa gct tat gaa gct gac cga
N-rev	aat cat agc tcc cat ctt caa ttt
loop-for	atg gga gct atg att tcg acc
loop-rev	ata caa gaa ggt tcc gtt cat ccc gct cac aga
C-for	gga acc ttc ttg tat tcc cag
Crev2	ctg cag tca gag ctt tgc ctg gaa ata

Die Orientierung der angegebenen Primer-Sequenzen ist stets von 5' nach 3'. Oligonukleotide, welche ausschließlich für Sequenzierungen verwendet wurden, sind nicht aufgeführt.

Ich danke...

Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge für das interessante Thema, die hervorragende Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Priv. Doz. Dr. Sabine Waffenschmidt für die kurzfristige Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Priv. Doz. Dr. Karsten Fischer für konstruktive Vorschläge, Denkanstöße und Diskussionen und die zwar manchmal etwas chaotische (☺), aber dennoch gute und fundierte Betreuung.

Herrn Priv. Doz. Dr. Andreas Weber für das Verarzten so mancher „Computernotfälle“ und für interessante Gespräche zu einigen Bereichen dieser Arbeit.

J. Chen dafür, dass er Samen der *pgi1-1* Mutante zur Verfügung gestellt hat.

Hildegard Lender für die Klonierung des AtPPT1-Promotor-GFP Konstruktes und die Durchführung aller Arbeiten, die etwas mit der Anzucht und Transformation von Hefe zu tun hatten, sowie für die gemeinsam verbrachten Stunden in Isotopenlabor (Transportversuche) und Kühlraum....

Lars Voll für anregende Diskussionen über sein „Lieblingskind“, die *cue1*-Mutante, die ja eigentlich mit meiner Arbeit nichts zu tun hat, nicht wahr?

Michael Eicks und Lars Voll für die kompetente Hilfe bei Computerproblemen und beim Formatieren dieser Arbeit.

Dr. Anja Schneider für ständige Hilfsbereitschaft und sinnvolle Kommentare zu unterschiedlichsten Themen.

Dr. Elmon Schmelzer für die zeitintensiven Aufnahmen am konfokalen Lasermikroskop und das Interesse an „meinen GFP-Pflanzen“.

Dr. Heike Kofler und Petra Renné für aufmunternde Worte und für „Erste Hilfe bei Formulierungsblockaden“.

der AG Bothe für die Möglichkeit, das GeneAmp[®]5700 Sequence Detection System nutzen zu können.

Frau Lorbeer für die unkomplizierte Hilfe beim Ausfüllen von unverständlichen Formularen und anderen organisatorischen Angelegenheiten.

Den Mitarbeiter der Firma Leica für die Gelegenheit, ein konfokales Mikroskop im Leica-Servicezentrum nutzen zu dürfen.

Allen Mitarbeitern der Gärtnerei und der Werkstatt des Botanischen Instituts.

Siggi Werth für das stunden- und tagelange Ausleihen der digitalen Kamera (aber das hat jetzt ein Ende!) und die Hilfe bei Fotoarbeiten.

allen jetztigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Flügge für das exzellente Arbeitsklima : Andrea, Andreas, Anja, Beate, Bettina, Birgit, Diana, Eric, Esther, Ferdi, Frank, Gabi, Heike Kofler, Heike Richards, Hildegard, Inga, Jörg, Julia, Karsten, Katrin, Klaus, Lars, Marion, Michael Eicks, Michael Gutensohn, Peter, Petra, Rainer Häusler, Reiner Schwacke, Reinhard, Sabine, Sharis, Sheila, Tamara, Ulrike Hebbeker, Ulrike Mödder, Vero.

meiner Familie und allen Freunden für Unterstützung jeglicher Art; besonders Papa für die jahrelange finanzielle Unterstützung, Natalie für erfolgreiche „Telefonseelsorge“ und die Bewahrung davor, das Schreiben zu ernst zu nehmen, Kirsten und Christian für diverse „stärkende Nahrungsmittel“ in der Endphase der Arbeit, und v.ä. Timm für intensives „Mitleiden“, geduldiges Ertragen meiner Launen und „Schreib-Depressionen“, dafür, dass ich das Wohnzimmer verübergehend in eine Papierwüste verwandeln konnte, für die kleinen und großen Aufmunterungsaktionen und die selbstverständliche Übernahme alltäglicher, aber zu erledigender Dinge.

Erklärung:

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt habe, 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 der angegebenen Teilpublikation noch nicht veröffentlicht worden ist, und dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U.-I. Flügge betreut worden.

Teilpublikation:

Eicks, M., Maurino, V., Knappe, S., Flügge, U.-I., Fischer, K. (2002) The Plastidic Pentose Phosphate Translocator Represents a Link between the Cytosolic and the Plastidic Pentose Phosphate Pathways in Plants. *Plant Physiol.* 2002 128(2) :512-22.

Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen:

Deterding, S., Kammerer, B., Weber, A., Schubert, S., Flügge, U.-I., Fischer, K.: Molekulare Charakterisierung der drei plastidären Phosphattranslokator-Familien. Botanikertagung in Bremen, 30.08. – 06.09.1998 (Poster).

Deterding, S., Schneider, A., Fischer, K., Flügge, U.-I.: Die Struktur der Phosphattranslokatorgene und deren Expression in *Arabidopsis thaliana*. Botanikertagung in Jena, 17.11.-22.11.2000 (Poster).

Knappe, S., Schneider, A., Flügge, U.-I., Fischer, K.: Structure and Expression of Phosphate Translocator Genes in *Arabidopsis thaliana*. 12th International Conference on Arabidopsis Research in Madison, USA, 23.06.-27.06.2001 (Poster).

Knappe, S., Flügge, U.-I., Fischer, K.: Genstrukturen und Expressionsprofile plastidärer Phosphat-Translokatoren. 15. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen in Dabringhausen, 26.02.-01.03.2002 (Kurzvortrag).

Kurzzusammenfassung

Phosphattranslokatoren sind kernkodierte Transportproteine mit einem N-terminalen Transitpeptid; sie besitzen sechs bis neun Transmembranspannen und katalysieren den Austausch unterschiedlicher phosphorylierter Metabolite gegen anorganisches Phosphat über die innere Plastidenmembran.

In dieser Arbeit wurde die Genfamilie der plastidären Phosphattranslokatoren (PTs) in *A. thaliana* untersucht. Es stellte sich heraus, dass im *A. thaliana*-Genom sechs funktionelle PTs vorhanden sind, und zwar je zwei GPT- und PPT-Gene sowie ein TPT- und ein XPT-Gen. Zusätzlich wurde eine hohe Anzahl von Pseudogenen identifiziert. Datenbankrecherchen ergaben, dass viele homologe Sequenzen innerhalb des Genoms existieren, die zusammen mit den PT-Sequenzen zur TPT-NST-Genfamilie zusammengefaßt werden. Durch Promotor-GUS-Fusionen, Northern Blot Analysen und RT-PCR wurde gezeigt, dass die Mitglieder der Phosphattranslokator-Genfamilie differentiell exprimiert sind. Durch Transportmessungen mit heterolog exprimierten und gereinigten PT-Proteinen sowie Komplementationen von geeigneten *A. thaliana*-Mutanten wurden Mitglieder der Phosphattranslokator Familie auch funktionell charakterisiert.

Abstract:

Phosphate translocators represent a family of transport proteins of the chloroplast inner envelope membrane, catalyzing the exchange of inorganic phosphate and different phosphorylized metabolites. The *A. thaliana* genome contains six functional PT genes as well as ten pseudogenes. It was shown that there are some PT homologous sequences which belong, like the PTs, to the NST-TPT gene family. Members of the PT gene family are differentially expressed. This was demonstrated by performing Northern Blot Analysis, RT-PCR and promoter-GUS fusions. Further, transport studies were done with PT proteins expressed in yeast and reconstituted into liposomes. The overexpression of PT genes in *A. thaliana* mutants gives additional informations about the function of some of the translocators.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Silke Knappe, geb. Deterding
Geburtsdatum, -ort 31.01.1973 in Essen, NRW
Eltern Dieter Deterding
Esther Deterding, geb. Rotter, verstorben 1996
Familienstand verheiratet mit Timm Knappe
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1979-1983 Gemeinschaftsgrundschule Wiehl
1983-1992 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Wiehl mit dem
Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Studium

Oktober 1992 Immatrikulation an der Universität zu Köln für
das Studienfach Biologie
September 1994 Diplomvorprüfung
Oktober 1996 Diplomhauptprüfung in den Fächern Botanik,
Genetik und Biochemie
November 1996-
Januar 1998 Diplomarbeit am Botanischen Institut der Universität
zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U.-I. Flügge
im Hauptfach Botanik
Thema: Analyse der Struktur des Triosephosphat/
Phosphattranslokatorgens aus *A. thaliana*
Februar 1998-
März 2002 Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U.-I.
Flügge im Prüfungsfach Botanik
Thema: Analyse der Phosphattranslokator-Genfamilie in
A. thaliana