

Funktionelle Charakterisierung von Peptid- und Aminosäuretransportern in Leguminosen und Gerste in Relation zur Proteinakkumulation im Samen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christiane Seiler

geb. am 09.02.1980 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ulrich Wobus
2. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen
3. Prof. Dr. Thomas Roitsch

Halle (Saale), den 25.06.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014152

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014152>]

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Die Bedeutung von Stickstoff für die Pflanzenentwicklung.....	- 1 -
1.2 Samenentwicklung in Leguminosen und Gerste	- 1 -
1.3 Stickstoffremobilisierung und Samenspeicherproteinakkumulation in Leguminosen	- 4 -
1.4 Aminosäure- und Peptidtransport in Pflanzen	- 6 -
1.5 Pflanzliche Aminosäuretransporter.....	- 7 -
1.6 Pflanzliche Peptidtransporter	- 8 -
1.7 N-Transporter aus Leguminosen (<i>Vicia faba</i> , <i>Pisum sativum</i>) und Gerste	- 9 -
1.7.1 Aminosäuretransporter	- 9 -
1.7.2 Peptidtransporter	- 11 -
1.8 Funktionen von GABA in Pflanzen	- 12 -
1.9 Stickstoffmetabolismus und Seneszenz.....	- 13 -
1.10 Zielstellung der Arbeit.....	- 14 -
2 Material und Methoden	- 16 -
2.1 Material.....	- 16 -
2.1.1 Bakterienstämme.....	- 16 -
2.1.2 Hefestämme	- 16 -
2.1.3 Pflanzenmaterial.....	- 17 -
2.1.4 Plasmide und Vektoren	- 17 -
2.1.5 Oligonukleotide.....	- 17 -
2.1.6 Medien.....	- 20 -
2.1.7 Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	- 21 -
2.1.8 Speziallabormaterial	- 22 -
2.1.9 Enzyme und Antikörper	- 22 -
2.1.10 Geräte und Apparaturen.....	- 23 -
2.1.11 Software, Datenbanken und interaktive Webprogramme.....	- 24 -
2.2 Methoden	- 25 -
2.2.1 Klonierung und Sequenzierung	- 25 -

2.2.2 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	- 26 -
2.2.3 Pflanzentransformation und Selektion.....	- 26 -
2.2.4 Pflanzenanzucht und Materialentnahme	- 28 -
2.2.5 Kreuzung von Erbsenpflanzen	- 29 -
2.2.6 Isolierung genomischer DNA und Southern Blot.....	- 29 -
2.2.7 RNA-Isolierung und Northern Blot.....	- 30 -
2.2.8 Transiente Expression von Reporterfusionen in Protoplasten	- 30 -
2.2.9 Genome Walking.....	- 31 -
2.2.10 Quantitative real-time (qRT) PCR.....	- 32 -
2.2.11 Analyse von Promotoraktivitäten in Pflanzen	- 33 -
2.2.12 Inhaltsstoffanalyse von sich entwickelnden und reifen Samen	- 33 -
2.2.13 Arbeiten mit Hefe.....	- 35 -
2.2.14 Herstellung und Reinigung polyklonaler Peptidantikörper.....	- 37 -
2.2.15 Proteinbiochemische Methoden	- 38 -
2.2.16 Mikroskopische Techniken	- 39 -
2.2.17 Statistische Auswertungen	- 42 -
3 Ergebnisse.....	- 43 -
3.1 N-Transporter aus Leguminosen.....	- 43 -
3.1.1 Regulatorische Regionen und Expression des Peptidtransporters <i>VfPTR1</i>	- 43 -
3.1.2 Analyse der <i>VfPTR1</i> -Promotoraktivität mittels Promotor/GUS- und Promotor/GFP-Fusionen in <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Pisum sativum</i>	- 49 -
3.1.3 Intrazelluläre Lokalisierung von <i>VfPTR1</i>	- 53 -
3.1.4 Phloemspezifische Expression der Aminosäurepermease <i>VfAAP1</i> und des Peptidtransporters <i>VfPTR1</i> in <i>P. sativum</i>	- 62 -
3.1.5 Kreuzung zweier <i>VfAAP1</i> Erbsenlinien	- 73 -
3.2 Aminosäuretransporter aus Gerste	- 81 -
3.2.1 Identifizierung putativer Aminosäuretransporter aus einer Gersten-EST-Kollektion -	81 -
3.2.2 <i>HvAAP1</i> und <i>HvAAP2</i> sind funktionelle Mitglieder der AAP-Familie.....	- 85 -
3.2.3 Expression der Gersten-AAPs in vegetativen Geweben und während der Kornentwicklung	- 88 -
3.2.4 Intrazelluläre Lokalisierung von <i>HvAAP1</i> und <i>HvAAP2</i>	- 90 -
3.2.5 <i>HvGAP1</i> – eine putative GABA-Permease aus Gerste	- 94 -

4 Diskussion	- 102 -
4.1 N-Transporter aus Leguminosen.....	- 102 -
4.1.1 Charakterisierung des Peptidtransporters VfPTR1	- 102 -
4.1.2 Intrazelluläre Lokalisierung von VfPTR1	- 105 -
4.1.3 Phloemspezifische Expression von <i>VfAAP1</i> und <i>VfPTR1</i> in <i>P. sativum</i>	- 108 -
4.1.4 Kreuzung einer <i>sucAAP-</i> mit einer <i>LeB4AAP-</i> Erbsenlinie	- 111 -
4.2 Aminosäuretransporter aus Gerste	- 113 -
4.2.1 <i>HvAAP1</i> und <i>HvAAP2</i> sind funktionelle Aminosäuretransporter	- 113 -
4.2.2 Intrazelluläre Lokalisierung und Expression von <i>HvAAP1</i> und <i>HvAAP2</i> – eine mögliche Rolle bei der Seneszenz	- 115 -
4.2.3 Identifizierung einer putativen GABA-Permease	- 119 -
4.3 Weiterführende Arbeiten	- 121 -
4.3.1 Leguminosen-Transporter	- 121 -
4.3.2 Gerste-Transporter	- 122 -
5 Zusammenfassung.....	- 124 -
5.1 Leguminosen-Transporter	- 124 -
5.2 Gerste-Transporter	- 125 -
6 Literaturverzeichnis	- 127 -
A Anhang	- 139 -

Abkürzungsverzeichnis

AAP	Aminosäurepermease
Abb.	Abbildung
Amp ^r	Ampicillinresistenz
AP	alkalische Phosphatase
As	Aminosäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cv	Kultivar
2,4D	2,4-dichlorphenoxyessigsäure
Da	Dalton
DAF	„days after flowering“, Tage nach der Blüte
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“, Enzymimmuntest
ER	endoplasmatisches Reticulum
EST	expressed sequence tag
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
<i>Hv</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
HRP	horse raddish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-thiogalacto-pyranosid
k	kilo
KLH	„Keyhole Limpet Hemocyanine“, aus der marinen Schnecke <i>Megathura crenulata</i> gewonnenes Mollusken-Hämocyanin
L	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
μ	mikro
m	Meter, milli
M	Molarität (Mol/Liter)
min	Minute

MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige und Scoog Basalmedium
MW	relatives Molekulargewicht
n	nano
N	Stickstoff
NHS	N-hydroxysuccinimid
ocs	Octopinsynthase
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
ori	Replikationsursprung
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate-buffered saline“
PBST	PBS mit 0,05% Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
PPT	Phosphinotricin
<i>Ps</i>	<i>Pisum sativum</i>
PTR	Peptidtransporter
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription PCR
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
Spec ^r	Spectinomycinresistenz
T ₀	Transgen-Generation 0 (Primärtransformanden)
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U	„unit“, Einheit der Enzymaktivität
ü/N	über Nacht
V	Volt
<i>Vf</i>	<i>Vicia faba</i>
vgl.	vergleiche
Wt	Wildtyp
YNB	„Yeast Nitrogen Base“
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Stickstoff für die Pflanzenentwicklung

Stickstoff (N) ist ein essentieller Bestandteil der meisten pflanzlichen Moleküle (z. B. Proteine, Nukleinsäuren, Chlorophyll, Hormone), die Aufnahme und der Transport von N sind wichtig für Pflanzenentwicklung und -wachstum. Stickstoff stellt daher für die Pflanze einen limitierenden Nährstoff aus dem Boden dar, der das Pflanzenwachstum begrenzt (Frommer et al., 1994). Die Hauptstickstoffquellen im Boden sind Nitrat, Ammonium und in geringerem Maß Aminosäuren. Nach der Transporter-vermittelten Aufnahme dieser Stoffe aus dem Boden über die Wurzel wird der anorganische Stickstoff in einem energieabhängigen Prozess in Aminosäuren umgewandelt. Die Ammoniumassimilation findet dabei in Wurzeln, die Nitratassimilation je nach Spezies und Umweltbedingungen in Wurzeln oder Blättern statt. Nitrat wird im Zytosol der Mesophyll- oder Wurzelzellen durch die dort vorhandene Nitrat-Reduktase zunächst zu Nitrit und dann durch die Nitrit-Reduktase der Chloroplasten bzw. Leukoplasten weiter zu NH_4^+ reduziert. Durch Aufnahme in die Vakuole können große Mengen Nitrat im Blatt gespeichert werden. Die Assimilation von Ammonium, welches aus der Nitratreduktion und Photorespiration stammt, ist vom plastidären GS/GOGAT-Zyklus abhängig (Weber and Flügge, 2002). Reduzierter Stickstoff wird hauptsächlich in Form von Aminosäuren, Amiden und Ureiden im Leitsystem der Pflanze transportiert. Der Transport von Aminosäuren zu den Blättern erfolgt hauptsächlich im Xylem, ihre Verteilung ausgehend von den Blättern in Gewebe, die nicht an der N-Assimilation teilnehmen, im Phloem (Frommer et al., 1994). Reduzierter Stickstoff kann in vegetativen Organen oder im Speichergewebe der Samen akkumuliert werden. Der gespeicherte Stickstoff dient der Versorgung der nächsten Generation und wird während der Pflanzenentwicklung innerhalb der Pflanze verteilt. Wichtige Exportquellen sind Wurzeln und Blätter während der Pflanzenentwicklung bzw. Endosperm und Kotyledonen während der Keimung.

1.2 Samenentwicklung in Leguminosen und Gerste

Wachsende Leguminosen- und Gerstensamen sind heterogene, hoch organisierte Systeme, die aus dem maternalen Samengewebe (Samenschale bei Leguminosen, Perikarp bei Gerste) sowie dem filialen Embryo und Endosperm bestehen. Die Samenentwicklung weist bei den dikotylen Leguminosen und der monokotylen Gerste einige Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede auf. Ein wesentlicher Unterschied ist das Speicherorgan. Während

Leguminosen Nährstoffe im Embryo speichern, ist bei Gerste das Endosperm das Hauptspeicherorgan. Zusätzlich liegt ein genetischer Unterschied vor. Der Leguminosen-Embryo ist diploid und das Gerste-Endosperm triploid mit einem 2:1-Verhältnis von maternalem zu paternalem Genom. Verschieden sind auch die Speicherstoffe. Während der Samenentwicklung werden im Embryo von Leguminosen vorwiegend Proteine, aber auch Stärke und Lipide gespeichert. Das Endosperm der Gerste ist spezialisiert auf die Einlagerung von Stärke, Proteine stellen einen wesentlich geringeren Anteil der Speicherstoffe dar. Außerdem ist die Speicherung von Stärke und Proteinen bei Gerste räumlich voneinander getrennt. Stärke wird im Endosperm gespeichert, Proteine akkumulieren im Endosperm und Aleuron. Das Aleuron, welches von den äußeren Zellreihen des Endosperms gebildet wird, speichert ausschließlich Proteine.

Für *Vicia faba* wurden sieben Stadien der Samenentwicklung beschrieben (Borisjuk et al., 1995). In den Stadien I-III finden Organogenese und Morphogenese statt, in den Stadien IV-VII die Differenzierung zu Speichergeweben und die Speicherstoffakkumulation. Junge Kotyledonen (Phase I bis IV) sind mitotisch sehr aktiv, in der folgenden Phase V (Transitionsphase) sind die inneren Zellen vor allem durch Streckungswachstum gekennzeichnet, während sich die äußeren noch weiter teilen. Stadium VI stellt die Hauptspeicherphase dar und in Phase VII erreichen die Kotyledonen ihre physiologische Reife, in der Zellstreckung und Speicheraktivität zunächst in der Mitte und dann graduell in den äußeren Regionen aufhören.

In Gerste ist die Endosperm-Entwicklung ebenso durch aufeinander folgende Entwicklungsstadien charakterisiert (Weschke et al., 2003; Weschke et al., 2000). Ungefähr am 3. Tag nach der Blüte (DAF, days after flowering) beginnt die Zellularisierung des Stärkeendosperms, diese ist am 4. DAF abgeschlossen. Diese Vorspeicherphase ist durch Zellteilungen und die Abwesenheit von Stärke im Endosperm gekennzeichnet. In den Tagen 5-8 erfolgt die Umschaltung von der mitotischen in die Speicherphase (Intermediär- oder Transitionsphase der Karyopse), und die Stärkeeinlagerung im Endosperm beginnt (6. DAF). In den Tagen 9-15 nach der Blüte werden große Mengen an Stärke akkumuliert. Die Aleuronzellen speichern keine Stärke, initiieren aber die Proteinakkumulation ungefähr ab dem 9. DAF.

Neben den genannten Unterschieden in der Samenentwicklung gibt es auch Gemeinsamkeiten. Die Samenentwicklung beginnt sowohl bei Leguminosen als auch bei Gerste in den maternalen Geweben gefolgt von den filialen Samenteilern, die sich zu hoch spezialisierten Speicherorganen entwickeln (Borisjuk et al., 2004; Weber et al., 2005). Die Differenzierung der Speichergewebe erfolgt sowohl bei Leguminosen als auch bei Gerste wellenartig, d.h. in den reifenden Geweben entstehen Entwicklungsgradienten. Ein komplexes regulatorisches Netzwerk löst die Samenreifung und die Akkumulation von

Speicherprodukten aus. Darin eingeschlossen ist ein Umschalten auf transkriptioneller und physiologischer Ebene, welches durch zucker- und hormongesteuerte Stoffwechselwege vermittelt wird (Gibson, 2004; Wobus and Weber, 1999).

Generell kann die Samenentwicklung in drei Stadien unterteilt werden: Zellteilungs- oder Vorspeicherphase, Speicherphase und Austrocknungsphase. Die frühe Samenentwicklung wird hauptsächlich maternal kontrolliert (Weber et al., 2005). Zwischen den ersten beiden Stadien liegt die Transitionsphase, in der hormonelle, transkriptionelle und metabolische Regulationsprozesse von maternaler auf filiale Kontrolle umgeschaltet werden. Die Transitionsphase ist begleitet von Differenzierungsprozessen in den filialen Samenteilen und gekennzeichnet durch eine *lag*-Phase in der Wachstumskurve der Samen. Die Abb. 1.1 zeigt typische Phasen der Samenentwicklung.

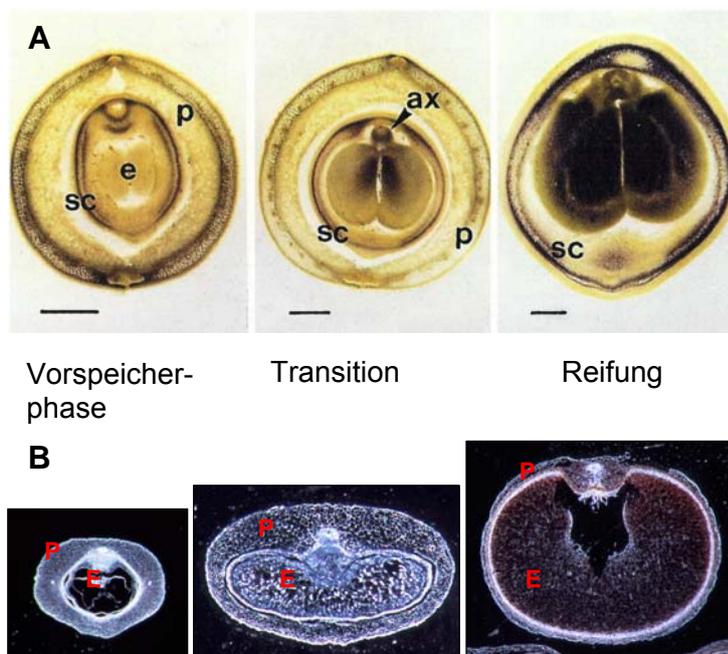


Abb. 1.1: Stadien der Samenentwicklung von *V. faba* (A, Stärkefärbung) bzw. *H. vulgare* (B). Gezeigt sind Querschnitte der Samen. p: pod (Hülle), sc: Samenschale, e: Embryo, ax: Embryoachse, P: Perikarp, E: Endosperm. Aus (Borisiuk et al., 2004).

In der Transitionsphase werden die sogenannten Transferzellen funktionell. Transferzellen sind durch sekundäre Zellwandeinwüchse charakterisiert. Dadurch entsteht eine vergrößerte Plasmamembran-Oberfläche, die einen verstärkten Assimilattransport gewährleistet (Offler et al., 2003). Die Transferzellen bilden sich bei Gerste in den äußeren Zellreihen des Endosperms gegenüber der nuzellaren Projektion der Karyopse (Weschke et al., 2000). Bei *V. faba* werden die Transferzellen in der abaxialen Epidermis gebildet (Offler et al., 1997; Weber et al., 1997b). Transferzellen sind gekennzeichnet durch die Expression von Transportproteinen, z.B. Saccharosetransportern (Weber et al., 1997b; Weschke et al., 2000). In der Transitionsphase nehmen die Speichergewebe von Leguminosen und Gerste verstärkt Saccharose auf. Außerdem setzen Zellexpansion und die Expression von Speicherungs-assoziierten Genen ein. Alle genannten Entwicklungsprozesse unterliegen

auch der metabolischen Kontrolle, wobei Saccharose eine wichtige Funktion vor allem als Nährstoff hat. Saccharose wird während der Samenentwicklung importiert und der Saccharose-Abbau in den maternalen Geweben, gekoppelt an die Expression von Zellwandinvertasen, ist wichtig für die frühe Entwicklung (Weber et al., 1997a; Weschke et al., 2003). Der aus dem Saccharose-Abbau resultierende hohe Hexosestatus in den filialen Geweben ist mit Wachstum und Zellteilung verknüpft. Nach der Herunterregulation der Invertase-Transkription wird die Speicher- bzw. Reifungsphase initiiert, in der ein aktives Saccharosetransportsystem aufgebaut wird. Ein Marker für die Samenreife ist die Expression von Genen, die für Speicherproteine codieren.

Die Arbeitsgruppe Genwirkung beschäftigt sich mit der Samenentwicklung von mono- und dikotylen Kulturpflanzen am Beispiel von Gerste und Leguminosen mit dem Ziel, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen diesen beiden Kulturpflanzen hinsichtlich der Samenentwicklung herauszustellen und zu analysieren. Ziel ist es zu verstehen, wie die Samenentwicklung mit Wachstum, Transportprozessen und der Kontrolle von Stoffwechselwegen verknüpft ist.

1.3 Stickstoffremobilisierung und Samenspeicherproteinakkumulation in Leguminosen

Leguminosen nehmen Stickstoff zu Beginn ihrer Entwicklung vorwiegend aus dem Boden auf. Die N-Fixierung aus der Luft beginnt erst später mit der Knöllchenbildung und ist während der frühen Samenfüllung am höchsten (Sagan et al., 1993). Mit fortlaufender Samenentwicklung nehmen sowohl N-Assimilierung als auch N-Fixierung ab. Da die sich füllenden Samen ein starkes *sink* für Stickstoff darstellen, reicht der aufgenommene N nicht für den hohen Bedarf aus. Daher setzt zum Ende der Wachstumsphase die Remobilisierung von Reserven aus den vegetativen Organen, vor allem der Blätter und Stängel, ein (Salon et al., 2001). Dabei stammt der meiste N aus dem enzymatischen Abbau von Proteinen, an dem verschiedene Peptidasen beteiligt sind. Die daraus entstehenden Aminosäuren werden über das Phloem exportiert. Die Akkumulation von Speicherproteinen im Samen wird von der N-Verfügbarkeit während der Samenfüllung beeinflusst. So steigen die N-Akkumulation und N-Konzentration in Kotyledonen von isolierten Soja-Embryonen proportional mit der N-Konzentration im Medium an (Balconi et al., 1991; Barratt, 1982; Lhullier-Soundélé et al., 1999). Dies lässt vermuten, dass samenlokalisierte N-Aufnahme und N-Transportprozesse eine wichtige Rolle spielen. (Rolletschek et al., 2005) konnten zeigen, dass die Überexpression von *VfAAP1* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors in *P. sativum* und *V. narbonensis* eine größere Aufnahmekapazität für Aminosäuren bewirkt und

zu höheren Samenspeicherproteingehalten führt. Ein hoher Proteingehalt ist im Allgemeinen mit einer verspäteten Blattseneszenz sowie einer längeren Photosyntheseperiode und N-Akkumulation verbunden. So wurde bei bestimmten Mais- und Sojasorten eine längere N-Aufnahmephase während der Samenfüllung festgestellt (Kumudini et al., 2002). Darüber hinaus wurden in Maisgenotypen mit erhöhtem Samenproteingehalt mehr N-Assimilate in den Blättern nachgewiesen (Lohaus et al., 1998; Lohaus and Moellers, 2000). Die Proteinakkumulation im Samen wird aber auch über die N-Verfügbarkeit in der gesamten Pflanze reguliert. Diese ist wiederum von der N-Aufnahme aus dem Boden, der N-Assimilation in der Pflanze, der Fixierung von Luftstickstoff innerhalb der Knöllchen und von der N-Remobilisierung aus den vegetativen Organen während der Samenfüllung abhängig. Der größte N-Anteil, der in die Samen gelangt, stammt dabei aus der Remobilisierung. Aminosäure- und Peptidtransporter spielen offensichtlich für die Remobilisierung von Reserven und deren Translokation innerhalb der Pflanze eine wichtige Rolle. Mögliche Strategien zur Erhöhung der Samenproteingehalte wären die Erhöhung der Samen-*sink*-Stärke, aber auch die effektivere Gestaltung von N-Akquisition und N-Remobilisierung.

Der Samenproteingehalt variiert zwischen 20 % und 40 % des Trockengewichts bei den verschiedenen Leguminosen (Shewry et al., 1995). Die Samen von Leguminosen stellen somit eine wichtige Proteinquelle dar. Erbsen werden in Europa aufgrund ihres Proteingehaltes vor allem für die tierische Ernährung angebaut. Verbesserungen der Proteinmenge und -qualität sind folglich wünschenswert. Der Proteingehalt von Erbsensamen liegt je nach Sorte und Umweltbedingungen zwischen 20 % und 25 %. Diese Proteine stellen einen Speicher für Aminosäuren dar, die dann während der Keimung benötigt werden. Samenspeicherproteine werden in großen Mengen in speziellen Geweben und in bestimmten Entwicklungsstadien synthetisiert. In reifen Samen werden sie in sogenannten Proteinkörperchen gespeichert. Die Speicherproteine werden aufgrund ihrer Löslichkeit in Wasser (Albumine), verdünnter Salzlösung (Globuline), Alkohol/Wasser-Gemisch (Prolamine) bzw. verdünnter Säure oder Base (Gluteline) in verschiedene Gruppen unterteilt. Bei Leguminosen sind Globuline und Albumine die am häufigsten vorkommenden Speicherproteine, wobei Globuline in etwa 3 x höheren Mengen vorkommen als Albumine. Die Globuline wiederum werden aufgrund ihres Sedimentationskoeffizienten in den 7S Vicillin- und den 11S Legumintyp untergliedert. Globuline enthalten nur sehr geringe Mengen der essentiellen Aminosäuren Cystein und Methionin (Shewry et al., 1995). Daher wird angestrebt den Anteil dieser AS zu erhöhen, um die Proteinqualität zu erhöhen. Albumine werden wegen ihres Sedimentationskoeffizienten von ca. 2 als eigene Gruppe beschrieben (Youle and Huang, 1981).

1.4 Aminosäure- und Peptidtransport in Pflanzen

Aminosäuren (As) stellen wahrscheinlich die prinzipielle Langstreckentransportform für organischen Stickstoff dar (Lalonde et al., 2004). Die Konzentration proteinogener As im Phloem liegt bei ungefähr 100-200 mM und im Xylem bei etwa 10-20 mM. Dabei überwiegen Amine (Glutamin, Asparagin) und saure As (Glutamat, Aspartat). Aus dem Boden werden vor allem Nitrat und Ammonium, aber auch As in die Wurzeln aufgenommen. As werden über aktive Systeme aufgenommen und anschließend über das Xylem exportiert. Die Verteilung der As ausgehend von den Blättern und der Import in die Samen erfolgt jedoch über das Phloem; d.h. es ist ein Xylem-Phloem-Transfer notwendig (Frommer et al., 1994). Dazu werden die Aminosäuren von der Plasmamembran der Geleitzellen in die Zellwand freigesetzt und anschließend über einen protonengekoppelten Symport in das Phloem transportiert. Dieser Prozess wird von einer H^+ -ATPase in der Plasmamembran energetisiert. In Pflanzenwurzeln sind verschiedene Transportsysteme an der Aufnahme von As, ihrer Mobilisierung aus den Wurzeln ins Xylem, der Phloementladung zurück in die Wurzeln und möglicherweise an einem direkten Transfer zwischen Phloem und Xylem beteiligt. In Blättern sind zwei Systeme für eine Phloembeladung notwendig und eventuell ein zusätzliches für die As-Aufnahme aus dem Xylem. Auch Samen als *sink*-Organe benötigen mindestens zwei Transportsysteme, eines im maternalen Gewebe für die Entladung von As aus dem Phloem und eines für die Aufnahme in den sich entwickelnden Embryo, da dieser symplastisch vom maternalen Gewebe isoliert ist (Frommer et al., 1994).

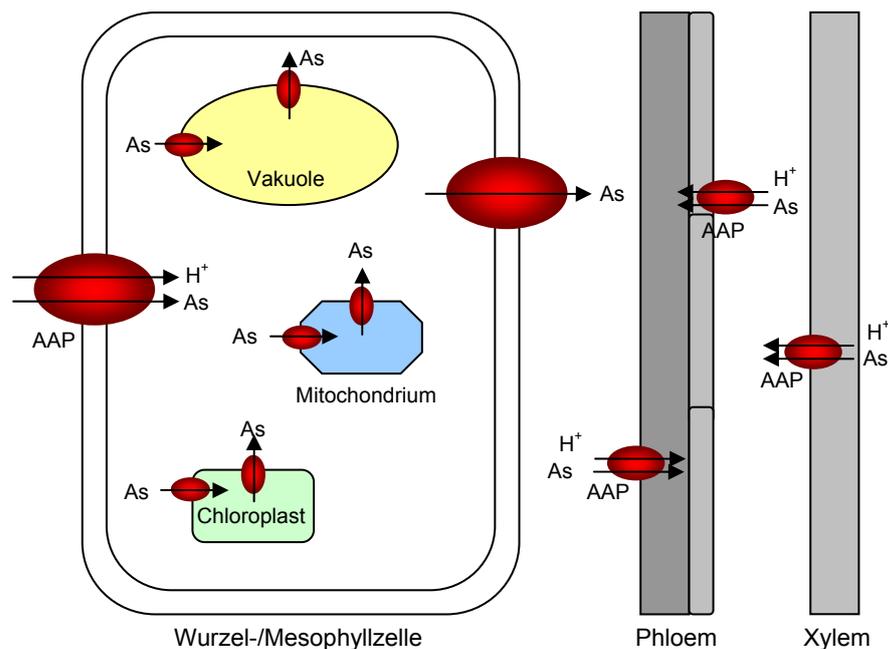


Abb. 1.2: Schematische Darstellung von Aminosäuretransportern in pflanzlichen Zellen und ihre Funktion bei der Phloembe- und -entladung. As: Aminosäure, AAP: Aminosäurepermease

Neben Aminosäuren werden auch Peptide mit 2-6 Aminosäuren aktiv von pflanzlichen Zellen über Membranen transportiert. Peptidtransport wird oft assoziiert mit Geweben, in denen eine rasche Proteinhydrolyse stattfindet, so z.B. in keimenden Samen oder seneszierenden Blättern (Higgins and Payne, 1982). In Gerste werden Peptide aus der Samenproteinhydrolyse während der Keimung vom Endosperm über das Scutellum, ein modifiziertes Kotyledo, in den Embryo transportiert (Ranki et al., 1994). Die Hydrolyse der Peptide erfolgt innerhalb der Zelle durch Peptidasen, die daraus entstehenden Aminosäuren können für die Proteinsynthese oder als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle verwendet werden (Steiner et al., 1995). Eine weitere Funktion des Peptidtransports könnte eine Schutzfunktion sein, die Aminosäuren vor Abbau durch bestimmte Enzyme im Phloem schützt (Higgins and Payne, 1980). Peptidtransportsysteme könnten außerdem am Transport von Peptid-Hormonkonjugaten über Zellmembranen beteiligt sein (Higgins and Payne, 1982). Diese Konjugate kommen beispielsweise im Leitgewebe und Endosperm vor.

1.5 Pflanzliche Aminosäuretransporter

Bereits seit den 1970er Jahren wird für die Aminosäureaufnahme bei Pflanzen ein Carrier-vermittelter Mechanismus vermutet, da dieser Prozess energieabhängig ist. Verschiedene Forschergruppen schlugen entweder nur ein Transportsystem für alle Aminosäuren vor (Barran and Singh, 1982; Cheruel et al., 1979; McDaniel et al., 1982; Robinson and Beevers, 1981) oder aber mehrere unabhängige Systeme (Berlin and Mutert, 1978; Harrington and Henke, 1981; Soldal and Nissen, 1978). Ein Wasserstoffprotonengradient stellt dabei die Energiequelle für den Transport dar (Reinhold & Kaplan, 1984). Der Eintransport der Aminosäuren ist an einen H^+ -Einstrom über ein Transportsystem gekoppelt, welches sowohl Aminosäuren als auch die Protonen bindet. Der Ionengradient wird durch eine ATPase in der Plasmamembran aufgebaut. 1993 wurde parallel von zwei Gruppen der erste Aminosäuretransporter aus Arabidopsis durch funktionelle Komplementation einer Hefemutante kloniert (Frommer et al., 1993; Hsu et al., 1993). Da der als AAP1 (amino acid permease 1) bezeichnete Transporter nicht alle Aminosäuren transportierte, wurde darauf geschlossen, dass noch mehr Aminosäuretransporter existieren müssen. Die Komplementation einer Hefemutante mit Defekten in verschiedenen Aufnahmesystemen für Aminosäuren erlaubte schließlich die Isolierung verschiedener pflanzlicher Aminosäuretransporter-cDNAs. So wurden nachfolgend AAP2 (Kwart et al., 1993), AAP3-5 (Fischer et al., 1995) und AAP6-8 (Okumoto et al., 2002) identifiziert. Die AAP-Familie von Aminosäuretransportern besteht insgesamt aus 8 Mitgliedern in Arabidopsis, die aber im Hefesystem nicht alle funktionell sind. Die AAPs zeigen ein ähnliches Substratspektrum, sie

sind aber dennoch nicht redundant, da sie in verschiedenen Zelltypen und entwicklungspezifisch exprimiert werden.

Im Genom von Arabidopsis gibt es ca. 53 putative Aminosäuretransporter-Gene, bei Reis ca. 59. Diese lassen sich in zwei Überfamilien gliedern, die APC-Familie (*amino acid-polyamine-choline transporter*) und die ATF-Familie (*amino acid transporter family*) (Fischer et al., 1998; Wipf et al., 2002). Zur APC-Familie gehören Aminosäuretransporter mit 12-14 Transmembrandomänen, die in drei Unterfamilien eingeteilt werden. Die ATF-Familie wurde zuerst in Pflanzen beschrieben, später aber auch in Hefe und im tierischen System gefunden. Deren Mitglieder besitzen 9-11 Transmembrandomänen mit einem zytosolischen N-Terminus und einem extrazellulären C-Terminus. Es gibt sechs Unterfamilien. In der Tabelle 1.1 sind die beiden Hauptfamilien ATF und APC sowie deren Unterfamilien aufgelistet. AAPs werden bevorzugt im Leitgewebe exprimiert. Prolintransporter transportieren Prolin, Betain und GABA und akkumulieren besonders unter Salzstress.

APC (Aminosäure/Polyamin/Cholin Transporter)	ATF (Aminosäuretransporter)
CAT (kationische Aminosäuretransporter)	AAP (Aminosäurepermeasen)
LAT (L-Typ Aminosäuretransporter)	LHT (Lysin-Histidin-Transporter)
GAP (GABA-Permeasen)	ProT (Prolintransporter)
	GAT (GABA-Transporter)
	AUX (Auxin-Transporter)
	ANT (neutrale AS-Transporter)

Tab. 1.1: Übersicht der Hauptfamilien pflanzlicher Aminosäuretransporter.

1.6 Pflanzliche Peptidtransporter

Pflanzliche Peptidtransporter werden in zwei Familien unterteilt, die Peptidtransporterfamilie (PTR) und die Oligopeptidtransporter (OPT). Im Genom von Arabidopsis wurden etwa 10x mehr Peptidtransporter vorhergesagt als in allen anderen bisher sequenzierten Organismen (Pro- und Eukaryonten), gibt es 51 putative PTR-Gene und 9 OPT-Gene (Stacey et al., 2002). Bei Reis sind es sogar 80 Gene, die der PTR-Familie angehören (Tsay et al., 2007). Peptidtransporter scheinen demzufolge eine wichtige Rolle während Pflanzenentwicklung und Pflanzenwachstum zu spielen.

Hydropathy-Diagramme der PTR-Mitglieder schlagen eine Struktur mit 12 möglichen Transmembrandomänen und einem für PTR-Proteine charakteristischen Aminosäuresequenzmotiv „FING“ (FYxxINxGSL) im vierten oder fünften hydrophoben Segment vor (Steiner et al., 1995). Dieses Motiv scheint für den Peptidtransport notwendig

zu sein, denn Mutationen des konservierten Tyrosin (Y167) im menschlichen Peptidtransporter hPepT1 (PTR-Familie) führen zum vollständigen Verlust dessen Aktivität (Yeung et al., 1995). Die bisher funktionell charakterisierten PTRs transportieren vor allem Di- und Tripeptide, aber auch Aminosäuren und Nitrat. Die ersten charakterisierten pflanzlichen Peptidtransporter waren CHL1, ein Nitrattransporter aus Arabidopsis (Huang et al., 1996) und AtPTR2B (Rentsch et al., 1995; Song et al., 1996). AtPTR2B wurde auch als AtNTR1 und später als AtPTR2 bezeichnet. Dieser Peptidtransporter besitzt 12 putative Transmembrandomänen und transportiert verschiedene Dipeptide, jedoch keine Aminosäuren und Nitrat. *AtPTR2* wird vor allem in der Blüte, im Blatt sowie in Stängel, Wurzel und Keimlingen exprimiert. AtPTR2 spielt möglicherweise eine Rolle bei der Versorgung der Samen, denn *AtPTR2-antisense* Pflanzen zeigen einen spät blühenden Phänotyp und zum Teil sterben die Samen ab (Song et al., 1997). Außerdem wurden in Arabidopsis noch zwei weitere Peptidtransporter, AtPTR1 und AtPTR3, näher beschrieben. AtPTR1 ist ebenfalls ein funktioneller Peptidtransporter, der in der Plasmamembran lokalisiert ist und Di- sowie Tripeptide unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung transportiert (Dietrich et al., 2004). Seine Expression während der Samenkeimung, in sich entwickelnden Schoten und in Wurzelspitzen deutet auf eine mögliche Rolle bei der Mobilisierung von Reserven, der Samenentwicklung und auch der Aufnahme von Nährstoffen aus dem Boden hin. Von AtPTR3 ist hingegen nur bekannt, dass seine Expression durch mechanische Verletzung und Salzstress induzierbar ist, über die Funktionalität des Proteins ist bisher nichts beschrieben worden (Karim et al., 2005). Mitglieder der Oligopeptidtransporter weisen 12-14 Transmembrandomänen auf und transportieren bestimmte Tetra- und Pentapeptide. Sie zeigen keine Sequenzähnlichkeit zu den PTR-Transportern. Von den neun OPTs in Arabidopsis sind bisher sieben näher untersucht worden, wobei fünf eine Hefemutante funktionell komplementieren konnten (Koh et al., 2002). Alle OPTs zeigen ein gewebespezifisches Expressionsmuster, was auf unterschiedliche Funktionen in der Pflanze schließen lässt.

1.7 N-Transporter aus Leguminosen (*Vicia faba*, *Pisum sativum*) und Gerste

1.7.1 Aminosäuretransporter

Bei Leguminosen erfolgt die Phloementladung von Aminosäuren in die Samenschale symplastisch, die Freisetzung aus der Samenschale wahrscheinlich über erleichterten Transport mit Hilfe von nicht selektiven Poren (De Jong et al., 1997). An der Aufnahme der As aus dem Samenapoplast in den Embryo könnten, ähnlich wie für Saccharose

beschrieben, Transferzellen beteiligt sein, welche die innere Oberfläche der Samenschale und die äußere Epidermis der Kotyledonen bilden (Tegeder et al., 1999; Weber et al., 1997b).

Für *P. sativum* sind zwei Aminosäuretransporter beschrieben worden, die der AAP-Familie zugehören. *PsAAP1* wird in vegetativen Organen und in den embryonalen Transferzellen exprimiert, *PsAAP2* konnte mittels Northern-Analysen nicht detektiert werden (Tegeder et al., 2000). Die Transkriptverteilung von *PsAAP1* könnte auf eine mögliche Rolle bei der Rückgewinnung von Aminosäuren aus dem Apoplast während des symplastischen Transports durch die Samenschale hindeuten. *PsAAP1* transportiert verschiedene Aminosäuren, darunter Prolin, Citrullin, Glutamin und Lysin. *PsAAP2* hingegen ist ein unvollständiger cDNA-Klon, und es wurden keine Transportanalysen durchgeführt. Trotz der phylogenetischen Nähe zu *P. sativum* ist die Situation bei *V. faba* anders, hier sind bisher sieben AAPs bekannt. Es wurden drei vollständige cDNA-Klone aus einer samenspezifischen cDNA-Bank von *V. faba* isoliert, *VfAAP1*, *VfAAP3* und *VfAAP4* (Miranda et al., 2001). *VfAAP1* (ortholog zu *PsAAP2*) transportiert ein breites Spektrum an Aminosäuren, wenn das Protein heterolog in Hefezellen exprimiert wird, zeigt aber eine gewisse Präferenz für Cystein. *VfAAP3* transportiert in Hefezellen ebenfalls verschiedene Aminosäuren mit einer Präferenz für basische Aminosäuren (Lysin, Arginin). *VfAAP1* wird stark vor Beginn der Speicherproteinsynthese in sich entwickelnden Kotyledonen exprimiert. *In situ* Hybridisierungen zeigen die *VfAAP1*-mRNA in den Speicherparenchymzellen der Kotyledonen, nicht aber in den Transferzellen. Zusätzlich wird *VfAAP1* noch in verschiedenen vegetativen Geweben (Stängel, Wurzel, Hülse, *sink*-Blatt) sowie in der Samenschale exprimiert. Dagegen wird *VfAAP3* stark in verschiedenen *sink*-Organen aber nur wenig im Embryo exprimiert. Die mRNA von *VfAAP4* (ortholog zu *PsAAP1*) konnte mittels Northern-Analysen nicht nachgewiesen werden. Vier weitere Vertreter der AAP-Familie aus *V. faba* (*VfAAP2*, *VfAAPa*, *VfAAPb* und *VfAAPc*) unterscheiden sich wesentlich in ihrem Expressionsmuster. *VfAAP2* ist ein vollständiger cDNA-Klon und wurde aus einer blattspezifischen cDNA-Bank isoliert und zeigt die höchste Sequenzidentität mit *AAP2* und *AAP4* aus *Arabidopsis*. In Hefe exprimiert, transportiert *VfAAP2* Prolin sowie aromatische und neutrale Aminosäuren. *VfAAP2* wird am stärksten im Stängel, in *sink*-Blättern und in Hülsen exprimiert, nicht aber im Samen. Die drei partiellen cDNA-Klone *VfAAPa*, *VfAAPb* und *VfAAPc* zeigen ein hohes mRNA-Expressionslevel in der Blüte, *VfAAPa* wird zusätzlich im Stängel, *VfAAPb* im Samen und *VfAAPc* in *source*-Blättern exprimiert (Montamat et al., 1999).

Aus Gerste sind bisher außer einem durch Salzstress induzierbaren Prolintransporter (Ueda et al., 2001) keine weiteren Aminosäuretransporter funktionell beschrieben worden.

1.7.2 Peptidtransporter

Aus *V. faba* wurden bisher zwei Peptidtransporter aus einer samenspezifischen cDNA-Bank kloniert. Der partielle cDNA-Klon *VfPTR2* wird schwach in Wurzeln, der Wurzelspitze und im Blatt exprimiert, über die Transporteigenschaften ist noch nichts bekannt. *VfPTR1* komplementiert die Hefemutante LR2, die auf Medien mit Histidylpeptiden als einziger Stickstoffquelle nicht wachsen kann, und ist demzufolge ein funktioneller Peptidtransporter. *VfPTR1* wird einerseits in den Wurzeln, Wurzelhaaren und Kotyledonen keimender Samen exprimiert, zum anderen auch in späteren Stadien der Samenentwicklung, zwischen Tag 20 und 35 nach der Blüte (Miranda et al., 2003). In keimenden Embryonen wird *VfPTR1* ab dem 4. Tag nach der Keimung exprimiert, das Expressionslevel steigt dann bis zum 8. Tag an, dabei ist die Expression in den Bereichen kurz oberhalb der Wurzelspitze am stärksten. *In situ* Hybridisierungen haben eine spezifische Expression im Leitgewebe von Keimlingen gezeigt. Außerdem konnte die *VfPTR1*-mRNA in der Epidermis von Kotyledonen, der Wurzelepidermis und in Wurzelhaaren detektiert werden. Dabei sind die *VfPTR1* mRNA-Mengen in Wurzeln abhängig von der Stickstoffquelle. In Wurzeln, die in Medium mit 1 mM des Dipeptids Leu-Leu oder 1 mM Gln kultiviert wurden, findet sich weniger mRNA als in Wurzeln, die ohne diese Zusätze gewachsen sind (Miranda et al., 2003). Während der Samenentwicklung wird die *PTR1*-Expression räumlich kontrolliert, so wird der Transporter in den Stadien V und VI der Samenentwicklung zunächst in der Epidermis exprimiert. Später finden sich *PTR1*-Transkripte in den Zellen, die die Leitbündel umgeben (Stadium VI) und während der Hauptspeicherphase in den Speicherparenchymzellen (Stadium VII). In den Transferzellen konnte hingegen keine *PTR1*-Expression nachgewiesen werden. Das Expressionsmuster deutet zum einen auf eine mögliche Rolle bei der Samenentwicklung hin, die Substrate für *VfPTR1* könnten aus der Remobilisierung bei einsetzender Blattseneszenz stammen, die parallel zur Samenreifung verläuft. Zurzeit ist allerdings nicht klar, inwieweit der Langstreckentransport von Peptiden und deren Aufnahme in die Samen zur Speicherproteinakkumulation beitragen. Weitere Funktionen des *VfPTR1* könnten der Transport von Peptiden aus der Speicherproteinhydrolyse in die Leitgewebe des Keimlings sowie die Aufnahme von Peptiden aus dem Boden in die Wurzel sein.

Aus *P. sativum* sind noch keine Peptidtransporter charakterisiert worden. In *H. vulgare* wurde bisher *HvPTR1* funktionell beschrieben. *HvPTR1* wird stark samenspezifisch exprimiert, zum einen in den Epithelzellen des Scutellums während der Keimung und zum anderen im Gerstenkorn über die gesamte Samenentwicklung hinweg (West et al., 1998). Im keimenden Gerstensamen könnte die Funktion von *HvPTR1* darin bestehen, Peptide aus dem Endosperm über das Scutellum in den Embryo zu transportieren. Das Scutellum ist ein absorptives Gewebe, welches das Endosperm vom Embryo trennt (Waterworth et al., 2005).

Peptide sind die ersten Produkte des Proteinabbaus im Endosperm und liefern Nährstoffe für die erste Wachstumsphase des Keimlings. Bei Getreide ist Peptidtransport zu Beginn der Keimung allein dafür verantwortlich, den Embryo mit organischem Stickstoff zu versorgen. Aminosäuretransport wird erst 48-72h nach Beginn der Quellung wichtig (Waterworth et al., 2005). Aminosäuren, die ebenfalls Produkte der Proteinhydrolyse aus dem Endosperm sind und deren Konzentration während der Remobilisierung ansteigt, hemmen die Peptidaufnahme in das keimende Korn. Dabei sind die mRNA- und Proteinlevel von HvPTR1 unverändert, d.h. die Regulation findet auf post-translationaler Ebene statt. HvPTR1 wird in Anwesenheit von Aminosäuren an Serinresten phosphoryliert und diese Phosphorylierung senkt seine Fähigkeit Peptide zu transportieren (Waterworth et al., 2005).

1.8 Funktionen von GABA in Pflanzen

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist eine nicht proteinogene Aminosäure, die in Pro- und Eukaryonten vorkommt. GABA wurde bereits vor über 50 Jahren in Pflanzen als Bestandteil von Kartoffelknollen entdeckt (Steward et al., 1949), aber das Forschungsinteresse verlagerte sich hin zum tierischen System als man herausfand, dass GABA ein wichtiger Neurotransmitter des zentralen Nervensystems ist. Die Aufnahme von GABA in Neuronen und Gliazellen wird durch Na^+ -abhängige GABA-Transporter (GATs) vermittelt, womit die GABA-Konzentration in der Synapse reguliert wird (Borden, 1996; Chen et al., 2004). Zusätzlich zur Funktion als Neurotransmitter spielt GABA bei der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle, indem es Migration, Differenzierung und Proliferation fördert (Owens and Kriegstein, 2002). In Bakterien und Hefe wird GABA hauptsächlich von Transportern der APC-Familie aufgenommen (Hosie et al., 2002; Jack et al., 2000) und ist vorwiegend am Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus beteiligt (Kumar and Punekar, 1997; Shaibe et al., 1985; Solomon and Oliver, 2002). Andere Funktionen, wie z. B. bei der pH-Regulation in *E. coli* und bei der oxidativen Stresstoleranz in *S. cerevisiae*, wurden ebenfalls beschrieben (Coleman et al., 2001; Yohannes et al., 2004). Über die Funktionen und den Transport von GABA in Pflanzen ist weit weniger bekannt. GABA wird schnell und in großen Mengen bei biotischem und abiotischem Stress gebildet (Kinnersley and Turano, 2000; Shelp et al., 1999; Snedden and Fromm, 1999). In Pflanzen wird GABA durch die Decarboxylierung von Glutamat gebildet und im sogenannten GABA-*shunt* über Succinat-Semialdehyd zu Succinat metabolisiert (vgl. Abb. 3.55, [Shelp et al., 1999]). GABA und der GABA-*shunt* werden in Pflanzen mit verschiedenen physiologischen Funktionen in Verbindung gebracht (z. B. Regulation des zytosolischen pH, Kohlenstoffflüsse in den TCA-Zyklus, Stickstoffmetabolismus, Abwehr von Insekten, Schutz vor oxidativem Stress, Osmoregulation und Signalfunktion (Bouché and Fromm, 2004; Bouché et al., 2003a). Ein

Ausschalten des *SSADH*-Gens (Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase) in Arabidopsis führt in den Pflanzen zu nekrotischem Zelltod durch die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies unter Stresseinwirkung (Bouché et al., 2003b). Palanivelu et al. (2003) haben kürzlich beschrieben, dass ein GABA-Konzentrationsgradient für das gerichtete Wachstum von Pollenschläuchen notwendig ist. Möglicherweise hat diese Aminosäure dabei eine interzelluläre Signalfunktion. All diese Funktionen sind auf den intra- und interzellulären Transport von GABA angewiesen. Die Aminosäurepermease AtAAP3 und die Prolintransporter aus Arabidopsis transportieren GABA mit niedriger Affinität (Breitkreuz et al., 1999; Fischer et al., 2002; Grallath et al., 2005). Mit AtGAT1 wurde erstmals ein GABA-Transporter der ATF-Familie beschrieben, der GABA mit hoher Affinität transportiert (Meyer et al., 2006).

1.9 Stickstoffmetabolismus und Seneszenz

Seneszenz ist das letzte Stadium der Blattentwicklung vor dem Zelltod und ist charakterisiert durch den Wechsel von Nährstoffassimilation hin zur Nährstoffremobilisierung (Feller and Fischer, 1994; Masclaux et al., 2000). Die Bestandteile von abgebauten Makromolekülen werden in andere Teile der Pflanze transportiert, vor allem in sich entwickelnde Samen. Dies geschieht mittels Langstreckentransport im Phloem (Hill, 1980). Da ein Großteil des Stickstoffs, der für die Samenfüllung benötigt wird, aus vegetativen Teilen der Pflanze stammt und nur ein geringer Anteil während der Samenentwicklung aus dem Boden aufgenommen wird, ist die Remobilisierung aus seneszierenden Blättern vor allem für den Nährstoffgehalt in Samen von Kulturpflanzen unerlässlich (Feller and Keist, 1986). Chloroplasten sind die ersten Organellen, die dem Abbau unterliegen, was zu einem rapiden Abfall der Photosyntheseaktivität führt (Noodén et al., 1997). Stickstoff stammt hauptsächlich aus dem Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren (Hörtensteiner and Feller, 2002) und ist mit ca. 90 % der häufigste recycelte Nährstoff während der Seneszenz (Himmelblau and Amasino, 2001). Verschiedene Transporter für intrazelluläre Stickstofftranslokation wurden beschrieben, darunter Oligopeptidtransporter, aromatische Aminosäurepermeasen, Ammoniumtransporter sowie Purin- und Pyrimidintransporter (Guo et al., 2004). Amide, Glutamin und Asparagin sind die am häufigsten transportierten Aminosäuren im Phloem seneszierender Blätter (Feller and Fischer, 1994; Kamachi et al., 1992). Ammonium wird wahrscheinlich durch die Deaminierung von Aminosäuren und den Abbau von Nukleinsäuren gebildet und durch die Glutaminsynthetase in Glutamin umgewandelt (Kamachi et al., 1992). Seneszenz wird ausgelöst, wenn die Pflanze ein bestimmtes Entwicklungsstadium erreicht, kann aber auch durch verschiedene Umwelteinflüsse (Trockenstress, Nährstoffknappheit, Krankheitserreger, Temperatur) vorzeitig induziert werden. In genomischen Untersuchungen

wurden zahlreiche seneszenz-assoziierte Gene (SAGs) identifiziert, deren Produkte an der Initiation und Regulation der Seneszenzvorgänge beteiligt sind (Buchanan-Wollaston et al., 2003; Van der Graaff et al., 2006; Yoshida, 2003). Dazu zählen beispielsweise verschiedene hydrolytische Enzyme, die den Abbau von Proteinen, Nukleinsäuren, Polysacchariden und Lipiden katalysieren. Gene, die für Proteasen codieren, werden während der Seneszenz verstärkt exprimiert. Dabei handelt es sich oft um vakuolär lokalisierte Proteasen, die zunächst inaktiv vorliegen und während späterer Seneszenzstadien zu aktiven Enzymen prozessiert werden (Yamada et al., 2001). Zu diesen Proteasen gehören auch Gene von Cysteinproteinasen, deren Expression kurz vor der Autolyse der Zellen induziert wird (Buchanan-Wollaston, 1997; Hörtensteiner and Feller, 2002).

1.10 Zielstellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf zwei Kulturpflanzen, Leguminosen und Gerste. Die Arbeitsgruppe Genwirkung (IPK) beschäftigt sich hauptsächlich mit der Samenentwicklung dieser beiden Kulturpflanzen. Leguminosensamen sind eine der wichtigsten pflanzlichen Proteinquellen und der Samenproteingehalt ist daher ein wichtiges Ertrags- und Qualitätsmerkmal. Die Proteinakkumulation im Samen ist vom verfügbaren Stickstoff in den Pflanzen abhängig. Faktoren wie die N-Aufnahme in die Wurzeln, N-Fixierung und –assimilation sowie die Remobilisierung von Reserven und deren Translokation innerhalb der Pflanze können Kontrolle über dieses Merkmal ausüben. Aminosäure- und Peptidtransporter spielen wahrscheinlich bei den letztgenannten Prozessen eine wichtige Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion des Peptidtransporters PTR1 aus *V. faba* in den Kulturpflanzen Erbse bzw. *V. faba* in Bezug auf N-Translokation innerhalb der Pflanze und Samenproteinakkumulation untersucht werden. Ein Ziel war dabei die weiterführende molekulare Charakterisierung von VfPTR1 in *V. faba*. Dabei standen die Isolierung des *PTR1*-Promotors und Untersuchung der Expression sowie die intrazelluläre Lokalisierung des PTR1-Proteins im Vordergrund. Weiterhin sollten transgene Erbsenpflanzen erstellt werden, die *VfPTR1 antisense* unter Kontrolle des eigenen Promotors exprimieren. Dadurch sollte Aufschluss über die potenziell ratenlimitierende Rolle von VfPTR1 in Bezug auf Samenproteingehalt und Remobilisierung gewonnen werden. Des Weiteren war geplant, transgene Erbsenlinien zu regenerieren und etablieren, die die Aminosäurepermease *VfAAP1* bzw. *VfPTR1* unter Kontrolle eines phloemspezifischen Promotors exprimieren. Dies soll Aufschluss über die Transporterfunktionen *in vivo* geben. Durch diesen Ansatz könnte der Transfer von N-Metaboliten wie Aminosäuren und Peptiden aus der Remobilisierung in

das Phloem verbessert sein. Die Remobilisierung von Reservestoffen könnte somit effizienter gestaltet werden und indirekt zu einem erhöhten Samenproteingehalt beitragen.

Bisherige Kenntnisse über N-Transporter stammen vorwiegend aus Untersuchungen der Modellpflanze *Arabidopsis*. Es ist anzunehmen, dass viele regulatorische Mechanismen zwischen den Arten konserviert sind, aber es sollte dennoch nicht generalisiert werden. Leguminosen sind spezialisiert auf einen hohen Samenproteingehalt und verfügen daher über weitaus höhere Stoffflüsse und *pool*-Größen bestimmter Metabolite als z. B. *Arabidopsis*. Es ist daher wichtig, Untersuchungen zur ratenlimitierenden Funktion von Transportern bezüglich der Samenproteinakkumulation direkt an Kulturpflanzen vorzunehmen.

Gerste ist innerhalb der Getreide eine wichtige Modellpflanze, deren Samen vor allem Stärke aber auch Proteine speichern. Der geringe Proteingehalt (ca. 10 %) stellt einen Mangel vor allem bei den Futtergetreiden dar. Das Ziel der Züchtung ist daher ein höherer Proteingehalt in den Körnern von Futtergetreiden. Möglicherweise spielen Aminosäuretransporter eine Rolle bei der Remobilisierung von Reserven und dem Transport in die sich entwickelnden Samen. Es ist daher wichtig, diese Transportvorgänge und die zugehörigen Transporter an der Kulturpflanze Gerste direkt zu untersuchen. Über Aminosäuretransporter aus Gerste ist bisher noch nichts bekannt. Der zweite Teil der Arbeit sollte sich vorwiegend mit der Identifizierung und Charakterisierung von Aminosäuretransportern aus *H. vulgare* befassen. Dabei war das Ziel, Aminosäuretransporter zu finden, die eine Funktion während der Samenentwicklung und Seneszenz übernehmen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

***Escherichia coli* (*E. coli*)**

DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsd17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> (Sambrook et al., 1989)
XL1 Blue	<i>supE44</i> <i>hsd17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> ⁻ F' <i>[proAB+ lacI^q lacZ</i> Δ M15 Tn10 (<i>tet^r</i>)] (Sambrook et al., 1989)
One Shot [®] TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> (Invitrogen, Karlsruhe)

***Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*)**

EHA 105	C58 pTiBo542, T-region:: <i>aph</i> , Km(S), A281, super-virulent (Hood et al., 1993)
---------	---

2.1.2 Hefestämme

***Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)**

22574d	<i>Mata</i> , <i>ura3-1</i> , <i>gap1-1</i> , <i>put4-1</i> , <i>uga4-1</i> (Jauniaux et al., 1987)
22 Δ 6AAL	<i>Mata</i> , <i>ura3-1</i> , <i>gap1-1</i> , <i>put4-1</i> , <i>uga4-1</i> , <i>can1::hisG</i> , <i>lyp1/alp1::hisG</i> , <i>lys2::hisG</i> (Fischer et al., 2002)
JT16	<i>Mata</i> , <i>hip1-614</i> , <i>his4-401</i> , <i>can1</i> , <i>ino1</i> , <i>ura3-52</i> (Tanaka and Fink, 1985)
21.983c	<i>Mata</i> , <i>gap1-1</i> , <i>can1-1</i> , <i>ura3</i> (Hein and André, 1997)
30.537a	<i>Mata</i> , <i>gap1-1</i> , <i>dip5::kanMX2</i> , <i>ura3</i> (B. André, unveröffentlicht)
YDR544	<i>Mata</i> , <i>ura3-1</i> , <i>gap1-1</i> , <i>put4-1</i> , <i>uga4-1</i> , <i>ssy1::kanMX</i> (D. Rentsch, pers. Mitteilung)
LR2	<i>Mata</i> , <i>hip1-614</i> , <i>his4-401</i> , <i>can1</i> , <i>ino1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>ptr2Δ::hisG</i> (Rentsch et al., 1995)

2.1.3 Pflanzenmaterial

Nicotiana tabacum L. cv SNN

Nicotiana plumbagenifolia L.

Arabidopsis thaliana cv Columbia

Vicia faba L. ssp. Minor cv Fribo

Pisum sativum L. cv Eiffel und Erbi

Hordeum vulgare cv Barke

2.1.4 Plasmide und Vektoren

pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Amp ^r (Invitrogen, Karlsruhe)
pCR [®] 4-TOPO [®]	Amp ^r (Invitrogen, Karlsruhe)
pUC18/19	Amp ^r (Yanisch-Perron et al., 1985)
pBluescript II SK(-)	Amp ^r (Stratagene, Heidelberg)
pRT103	Amp ^r
pGUS1	Amp ^r , basiert auf pUC19
pDR196	Amp ^r (Rentsch et al., 1995)
pFF19	Amp ^r (Timmermans et al., 1990)
pBAR	Spec ^r (von Dr. I. Saalbach [IPK Gatersleben] zur Verfügung gestellt)

Karten der aufgelisteten Plasmide befinden sich im Anhang (Abb. A 8).

2.1.5 Oligonukleotide

Die folgenden synthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Die Sequenzen sind in 5'-3' -Orientierung dargestellt:

Sequenzierungsprimer

AtSUC2p_1961	CTA TGC CTC AAG GCT CTC TTA
ocs-term_100b	GAT CTG AGC TAC ACA TGC
PTR1p_1335a	ACG GAA GCA GAT CCA CTG CAA C
pDR196_94a	CTT TCC TAT AAC ACC AAT AGT G
VfPTR1_637a	CAA CAT AGG AGC CCT CAT ATC
pBAR_seq1	GTC ATA ACG TGA CTC CCT TA

Primer für die Überexpressionskonstrukte

AtSUC2p_a	CAA TTC TAG ACC TAA AAT CTG GTT TCA TAT TA
AtSUC2p_b	GAA TGG ATC CAT TTG ACA AAC CAA GAA AGT AAG
PTR1p_aBamHI	TGG TGG ATC CGG GAA AAC ACT TAC
PTR1p_bBamHI	CCA TGG ATC CGA GGC TTC AAA ATC C

Genome Walking Primer

AP1	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
AP2	ACT ATA GGG CAC GCG TGG T
VfPTR1_GSP1	GCC TCC CTT TAA AGT CGA CCG AGC CAT
VfPTR1_GSP2	TCC TGA ATA AGC GCT TCT TCC AAA CGC
PTR1PromA_GSP1	GCG TCT CAA TCT CAC TTT CTC CGA AGC A
PTR1PromA_GSP2	TTG CGG CGT AGT TGT ATT GAG CAT CCC A
PTR1PromB_GSP1	TGG GAG AGG TAG CTG CTA GGT GGA CTT
PTR1PromB_GSP2	GCA AAG CTT TAT GCT GCT GTC AGA AGG

Primer für Promotor-GUS und Promotor-GFP Konstrukte

PTR1pGUS_PstI	CCG GCT GCA GAT CAA AGG GAA AAA CAC
PTR1pGUS_SalI	GAA CGT CGA CAG CTA TGA GGC TTC
PTR1p_EcoRI	TGG TGA ATT CGG GAA AAA CAC TTA C
PTR1p_SacI	CCA TGA GCT CGA GGC TTC AAA ATC C
GFP_BamHI	GAC GGA TCC ATG GTG AGC AAG GGC
GFP_XbaI	CTT TCT AGA TTA CTT GTA CAG CTC G

Primer für GFP-Fusionskonstrukte

VfPTR1_BamHI	CAG GAT CCA TGG GTT CCG TAG AGG A
VfPTR1_XbaI	AGT GCC TGA AAA TCT AGA CGA AGC CT
HvGAP1_BamHI	AGG GGA TCC ATG GCA GGG CAG GGC A
HvGAP1_XbaI	CTT TGT CTA GAG CCG CTC AAA TTG G
HvAAP1_BamHI	ACG GAT CCA TGG AGA AGA AGC AGG C
HvAAP1_XbaI	ACT CTA GAG CCG CTG AAC GGC CGG T
HvAAP2_XbaI	ACT CTA GAA TGG GGC AGA ACG GCG T
HvAAP2_SalI	ACG TCG ACG TCG TGG AGA AAG GCT T

Primer für die Klonierung des c-myc-tags

c-myc_for CAA GGA GCT CTG AGC AAA AGT TGA TTT CTG AGG
 AGG ATC TTC TGA GCT CCA TG

c-myc_rev CAT GGA GCT CAG AAG ATC CTC CTC AGA AAT CAA
 CTT TTG CTC AGA GCT CCT TG

VfPTR1_Ncol TAC CAT GGG GCA CGA GCT ATG GGT T

VfPTR1_Xbal GGT CTA GAC ATA AAC TGC CAT CAC

Primer für Hefeexpressionskonstrukte

HvAAP1_Spela AAC TAG TAT GGA GAA GAA GCA GGC GAC TAC

HvAAP1_Spelb AAC TAG TTC AGC CGC TGA ACG GCC CGT ACT C

HvAAP2_Spela AAC TAG TAT GGG GCA GAA CGG CGT GGG CAA G

HvAAP1_Spelb AAC TAG TTC AGT CGT GGA GAA AGG CTT GTA G

GFP_Spelb CTT ACT AGT TTA CTT GTA CAG CTC G

HvGAP1_Spela AAA CTA GTA TGG CAG GGC AGG GCA GCT ACA

HvGAP1_Spelb AAA CTA GTC TAG CCG CTC AAA TTG GTG ACG GGT

Primer für RT-PCR und qRT-PCR

RT_VfPTR1_1527a TGC GAA GTT TAT GCA GTG CT

RT_VfPTR1_2010b TCA CAT CAA AGG GTA TCA AAC

RT_VfAAP1a TTG CTA ACG CCG CTC TCA TAA TTC ATC TTG

RT_VfAAP1b CAC TGA TCC AAC AAA AGC CAC AAC TGA TAC

RT_PsActin_1156a TGT CTG GAT CGG AGG CTC TA

RT_PsActin_1561b AGG CCA ATC AGA ACA TTG GA

qRT3'VfAAP1_a TTG TCA CCA GGA AAC TTA

qRT3'VfAAP1_b TGA GAG CGG CGT TAG CAA

qRT3'PsActin_a GCT CTA TTT TGG CAG CCC TCA

qRT3'PsActin_b GCC TTT GCA ATC CAC ATC TGT

PsActin_genom_a CCT TGT GCA GAT GTG GAT TGC

PsActin_genom_b TTG ATG GCC CAG ATT CAT CA

2.1.6 Medien

Die Anzucht der *E.coli*-Stämme erfolgte auf LB-Medium bzw. SOC-Medium nach Sambrook et al. (1989) mit dem entsprechenden selektiven Antibiotikum. *Agrobacterium tumefaciens* wurde auf YEB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums angezogen. Die festen Medien enthalten 1,5 % Agar.

LB	1 % NaCl, 0,5 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt (pH 7,4)
SOC	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,05 % NaCl, 20 mM Glukose, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ (pH 7,4)
YEB	0,5 % Fleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,1 % Hefeextrakt, 2 mM MgSO ₄

Die *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme wurden auf Vollmedium (YPD) und auf synthetischen Medien, minimal (SD) oder komplex (SC), angezogen. Der Drop-out Mix enthält eine Mischung verschiedener Aminosäuren und Nucleoside und wird als Zusatz für das SC-Minimalmedium verwendet. Je nach Selektionsbedingungen fehlen Uracil oder Uracil und Histidin. Alle festen Medien enthalten 2 % Agar.

YPD	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glukose
SD	0,17 % YNB w/o amino acids w/o NH ₄ , 0,5 % (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 % Glukose
SC	0,17 % YNB w/o amino acids w/o NH ₄ , 0,5 % (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 % Glukose, 0,2 % Drop-out Mix
MM	0,17 % YNB w/o amino acids w/o NH ₄ , 0,1 % Stickstoffquelle, 2 % Glukose

Für die Kultivierung der Pflanzen unter sterilen Bedingungen wurden folgende Medien verwendet:

B5	2070 mg/l KNO ₃ , 1029 mg/l CaCl ₂ x 2H ₂ O, 500 mg/l MgSO ₄ x 7H ₂ O, 134 mg/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 150 mg/l NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, 1x MS Mikrosalze (Murashige and Skoog, 1962), 1x B5 Vitamine (Gamborg et al., 1968), 3 % Saccharose, 10 mg/l Glutathion, 800 mg/l Glutamin, 1 mg/l Adenin, 100 mg/l Serin, 1 mg/l 2,4D, 0,2 mg/l Kinetin, 2,5 mM MES, PPT (pH 5,8)
P1	1x MS Mikro-und Makrosalze, 1x B5 Vitamine, 3 % Saccharose, 2 mg/l BA, 2 mg/l NAA, 2,5 mM MES, 400 mg/l Ticarcillin, 10 mg/l PPT (pH 5,8)
MS	1x MS Mikro-und Makrosalze, 1x MS Vitamine, 3 % Saccharose, 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA, 300 mg/l Ticarcillin, 10 mg/l PPT, MES (pH 5,8)

MS1/2	1x MS Mikrosalze, 0,5x MS Makrosalze, 1x MS Vitamine, 1 % Saccharose (pH 5,7)
MS4	1x modifizierte MS4 Mikro-und Makrosalze, 1x MS Vitamine, 2 % Saccharose, NH ₄ NO ₃ , 4 mg/l BA, 100 mg/l myo-Inositol, 0,1 mg/l IBS, 400 mg/l Ticarcillin, 10 mg/l PPT, 10 mM MES (pH 5,8)
K3	1x K3 Mikro-und Makrosalze (Nagy and Maliga, 1976), 0,4 M Mannit, 3 % Saccharose, 1 mg/l BA, 2 mg/l NAA, 1 mg/l 2,4D

2.1.7 Chemikalien, Reagenzien und Kits

BioRad (Richmond CA, USA)	30% Acrylamid/Bis
Biozym (Oldendorf)	Saekem LE Agarose
Clontech (Mountain View CA, USA)	Universal Genome Walker Kit, Marathon™ cDNA Amplification Kit, Yeast Nitrogen Base w/o amino acids w/o ammonium sulfate, -Ura DO supplement, -Ura-His DO supplement
Difco (Detroit MI, USA)	Bacto®-Agar, Bacto®-Trypton, Bacto®-Pepton, Hefeextrakt, Fleischextrakt
Duchefa (Amsterdam, Niederlande)	Murashige Skoog Vollmedium Festsubstanz, Kanamycin, PPT, Spectinomycin
Dynal (Oslo, Norwegen)	Dynabeads® mRNA Purification Kit
Fermentas (St. Leon Rot)	GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Prestained Protein Ladder, Rapid DNA Ligation Kit
Fluka (Buchs, Schweiz)	DEPC, Aminosäuren
GE Healthcare (Braunschweig)	ECL Western blotting analysis system, [α^{32}]dCTP, RediPrimell Labeling System
Invitrogen (Karlsruhe)	EDTA, TOPO TA Cloning® Kit, Superscript™III First-Strand Synthesis System for RT-PCR
Merck (Darmstadt)	Di-Natriumhydrogenphosphat, Lithiumchlorid, Magnesiumsulfat, Polyethylenglykol
Qiagen (Hilden)	Qiagen Plasmid Mini Kit, Qiagen Plasmid Maxi Kit, Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiaquick Nucleotide Removal Kit, Qiaquick PCR Purification Kit, Qiaprep Spin Miniprep Kit
Roche (Basel, Schweiz)	BSA, dNTPs, Rapid DNA Ligation Kit, DIG-High Prime, DIG nucleic acid detection Kit

Roth (Karlsruhe)	Formaldehyd, Chloroform, Phenol, Glycerin, Phenol/Chloroform, Ethanol, Methanol, 2-Propanol, Essigsäure, Salzsäure, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumazetat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Natriumzitat, Tris, Ethanolamin, Diethanolamin, Glycin
Serva (Heidelberg)	BICINE (N,N-Bis(2-hydroxyethyl) Glycin), Ovalbumin, Aminosäuren
Sigma (Louis MO, USA)	Aminosäuren, Peptide, 4-Nitrophenylphosphat (pNPP)
Stratagene (Heidelberg)	Sonicated Salmon Sperm DNA Kit
Tropix (Bedford, USA)	GUS-Light™ Kit
Vector Laboratories (Burlingame CA, USA)	Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit

2.1.8 Speziallabormaterial

Applied Biosystems (Foster City, USA)	Optical Adhesive Covers, Abdeckfolien
Fujifilm (Düsseldorf)	Imaging Plate BAS-MS 2040
GE Healthcare (Braunschweig)	Nylonmembran (Hybond N ⁺), Hyperfilm™ ECL, Protein A Sepharose CL-4B, HiTrap NHS-activated HP (Affinitätssäulen), MicroSpin™ S-200 HR columns
G. Kisker GbR (Steinfurt)	Quali PCR Platten 384 Loch
Nalgene (Rochester NY., USA)	Syringe filters 0,2µm, 0,45µm (Sterilfilter), Kryokonservierungsröhrchen
Nunc (Roskilde, Dänemark)	96 Loch Mikrotiterplatten (Immuno Plate, Maxisorp)
Pierce (Rockford IL, USA)	iCON™ Concentrator (15 ml Zentrifugenröhrchen)
Schleicher und Schüll (Dassel)	Nitrozellulosemembran Protran®, Gel-Blotting-Papier

2.1.9 Enzyme und Antikörper

Ambion (Austin, TX, USA)	TURBO DNase™ (DNase)
Applied Biosystems (Foster City, USA)	Power SYBR® Green PCR Master Mix
Clontech (Mountain View, CA, USA)	Advantage® Genomic Polymerase Mix, Advantage™ 2 Polymerase Mix

Fermentas (St. Leon Rot)	Restriktionsendonukleasen, T4 DNA-Ligase, Shrimp Alkaline Phosphatase (alkalische Phosphatase)
GE Healthcare (Braunschweig)	Restriktionsendonukleasen, ECL™ Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody aus Esel
Roche (Basel, Schweiz)	Taq Polymerase, Restriktionsendonukleasen, Proteinase K, Amyloglucosidase
Sigma (Braunschweig)	Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase aus Ziege

Der *c-myc*-Antikörper wurde als Konzentrat nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse gegen PBS (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5) aus dem Überstand der Hybridomazellen 9E10 (Evan et al., 1985) gewonnen, die im Zellzuchtlabor der Arbeitsgruppe „Phytoantikörper“ (IPK) kultiviert wurden. Das Epitop umfasst einen Bereich des humanen Proto-Onkogens p62, *c-myc* (Bernard et al., 1983; Hilpert et al., 2001).

2.1.10 Geräte und Apparaturen

Applied Biosystems (Foster City, USA)	Thermocycler 7900HT
Biometra (Göttingen)	Hybridisierungsöfen
BioRad (München)	Mini Protean® 3 (Minigel Elektrophoresesystem für vertikale PAA-Gelelektrophorese), Mini Trans Blot® (Mini Blot Apparatur)
Brand (Wertheim)	Transferpipette® -8
Dynax (Stuttgart)	Mikrotiterplattenlesegerät Dynatech MR7000
Elementar (Hanau)	Elementaranalysator Vario EL III
Eppendorf (Hamburg)	Thermomixer comfort, Thermomixer 5436/5437, Tischzentrifuge 5415R, Mastercycler „ep gradient“, Präzisionspipetten
GFL (Burgwedel)	Wasserbad, Schüttelinkubator
Gilson (Abimed Langenfeld)	Präzisionspipetten
Heraeus Holding GmbH (Hanau)	Brutschränke, Zentrifuge Sorvall RC5C Plus, Biofuge fresco, Vortex Genie 2™
Kontron Ag (Eching/München)	Uvikon Spectrophotometer 922
Liebherr (Ochsenhausen)	Kühlschränke, Tiefkühlschränke
Peqlab (Erlangen)	Horizontalelektrophoresen
Perkin Elmer (New Jersey, USA)	Thermocycler 9700
Raytest (Straubenhardt)	Phosphorimager FLA 5100, Eraser

Sanyo (Bad Nenndorf)	Ultratiefkühlschränke
Sartorius Ag (Göttingen)	Analysenwaage
Stratagene (Heidelberg)	Geldokumentation Eagle Eye™ II, UV Stratalinker® 2400, PicoFuge™
Zeiss (Göttingen)	konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510 Meta

2.1.11 Software, Datenbanken und interaktive Webprogramme

Software

Applied Biosystems (Foster City, USA)	SDS 2.2.1 Sequence Detection System, Primer Express 2.0
DNASTAR Inc. (Madison WI, USA)	Lasergene® Sequence Analysis
Microsoft Corporation (USA)	Microsoft Office® 2003
Raytest (Straubenhardt)	TINA 2.0, AIDA Image Analyzer v 4.06
Zeiss (Göttingen)	LSM Image Browser
Thomson (Stamford CT, USA)	Endnote 8.0.2

Datenbanken und interaktive Webprogramme

ARAMEMNON – öffentliche Datenbank für Membranproteine aus Arabidopsis und Reis (Schwacke et al., 2003)

(<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>)

BLAST – Basic local alignment search tool (Altschul et al., 1990)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

CR-EST – Crop-EST, öffentliche Datenbank mit Zugang zu Sequenz-, Klassifizierungs-, Clustering- und Annotationsdaten von Kulturpflanzen EST Projekten des IPK (Künne et al., 2005)

(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/>)

EMBL-EBI – European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute

(<http://www.ebi.ac.uk/>)

ExpASy – Expert Protein Analysis System, Proteomics Server des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)

(<http://us.expasy.org>)

NCBI – national center for bio**te**chnology information

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

PlantCARE – öffentliche Datenbank von pflanzlichen *cis*-regulatorischen Elementen (Rombauts et al., 1999)

(<http://sphinx.rug.ac.be:8080/PlantCARE/>)

PLACE – eine Datenbank von pflanzlichen *cis*-regulatorischen Elementen (Higo et al., 1999)
<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>

Promoter 2.0 – Programm für die Vorhersage von Transkriptionsstartpunkten (Knudson, 1999)

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>)

SoftBerry – öffentliche Datenbank für pflanzliche Promotorsequenzen (Shahmuradov et al., 2003)

(<http://www.softberry.com/berry.phtml>)

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierung und Sequenzierung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendeten Standardmethoden wie Bakterienanzucht, Restriktionsspaltungen, Klonierungsschritte, Auftrennung der DNA in Agarosegelen und DNA-Konzentrationsbestimmungen wurden nach den von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Protokollen durchgeführt.

PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem „Qiaquick Gel Extraction Kit“ nach Herstellervorschrift aus dem Agarosegel gereinigt. Die gereinigten Fragmente wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten, mit dem „PCR Purification Kit“ erneut aufgereinigt und für die Ligation eingesetzt. Für Ligationen wurde der „Rapid DNA Ligation Kit“ (Fermentas) benutzt. Die direkte Subklonierung von Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten wurde mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Der ebenfalls in diesem Kit enthaltene Bakterienstamm TOP10 wurde für die anschließende Transformation verwendet. Für die Isolation und Reinigung von Plasmid-DNA wurde der „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ oder der „Qiagen Plasmid Mini Kit“ verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und vor der Ligation gewöhnlich mit alkalischer Phosphatase (Fermentas) dephosphoryliert. Die Transformation der *E.coli*-Stämme wurde nach der Hitzeschock-Methode in Anlehnung an (Cohen et al., 1972) durchgeführt.

Die Sequenzierung von DNA wurde entweder am IPK Gatersleben oder kommerziell von der Firma Agowa (Berlin) ausgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Lasergene[®] Sequence Analysis (DNASTAR) ausgewertet.

2.2.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformation von Agrobakterien wurde eine Modifikation der von Holsters et al. (1978) und Nishiguchi et al. (1987) beschriebenen Methoden verwendet. Kompetente Agrobakterien-Zellen (Stamm EHA105) wurden mit 1 µg der entsprechenden Plasmid-DNA vermischt und nachfolgend 5 min auf Eis, 5 min in flüssigem Stickstoff und 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium wurden die Zellen für 2-4 h bei 28°C geschüttelt. 200 µl Aliquots wurden auf YEB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und für 2 Tage bei 28°C inkubiert.

2.2.3 Pflanzentransformation und Selektion

Transformation von Arabidopsis thaliana

Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana* erfolgte durch den Stamm EHA105 (Hood et al., 1993) nach der Blütentauchmethode (floral dip; [Clough and Bent, 1998]). Als Ausgangsmaterial dienten *A. thaliana* Pflanzen im Blütenstadium, die zuvor drei Wochen unter Kurztagbedingungen (8 h Belichtung) und danach drei Wochen unter Langtagbedingungen (16 h Belichtung) kultiviert wurden. Von einer Agrobakterien-Vorkultur wurden zunächst je 2 ml in 4x 250 ml YEB-Medium mit Antibiotika überimpft. Diese Hauptkulturen wurden ü/N bei 28°C bis zu einer $OD_{600} > 2$ geschüttelt und die Bakterien anschließend zentrifugiert (6000 x g, 20 min). Die Pellets wurden in insgesamt 1 – 1,5 l Infektionsmedium (MS mit 0,5 % Saccharose und 0,04 % Silwet L-77) resuspendiert. Bei den zu transformierenden Pflanzen wurden bereits ausgebildete Schoten abgeschnitten und die Blütenstände dann für 1 min in die Agrobakterien-Suspension getaucht. Die behandelten Pflanzen wurden anschließend für 24 h liegend mit geschlossener Kunststoffhaube und danach offen unter Langtagbedingungen bis zur Samenreife im Pflanzenkulturraum kultiviert. Die Selektion transgener Pflanzen mit dem *bar*-Gen, welches Resistenz gegen Phosphinotricin vermittelt, erfolgte durch Aussaat von etwa 200 Samen in Erde. Die Pflanzen wurden im Keimblattstadium mit einer 1:5000 Verdünnung des Herbizids Basta® besprüht und diese Anwendung nach etwa einer Woche wiederholt, um eine ausreichende Selektion transgener Pflanzen zu erhalten. Resistente Pflanzen wurden getopft und unter Langtagbedingungen weiter kultiviert.

Transformation von Nicotiana tabacum

Für die Tabaktransformation wurden Blätter steril angezogener, 4 Wochen alter *N. tabacum* Pflanzen in 1x1 cm große Stücke geschnitten, auf MS-Medium gelegt und 2-3 Tage in diffusem Licht bei 21°C vorkultiviert. 0,5 ml einer *A. tumefaciens* Übernachtskultur, die den

entsprechenden Vektor für die Pflanzentransformation enthielt, wurden mit 10 ml MS-Medium verdünnt. Die Blattstücken wurden für 30 min in die Agrobakteriensuspension gelegt, danach auf MS-Medium überführt und für 2-3 Tage in diffusem Licht bei 21°C kokultiviert. Anschließend wurden die Blattscheiben auf Selektionsmedium (MS, 10 mg/L PPT, 200 mg/L Ticarcillin) gelegt, bei 21°C und 16 h Licht kultiviert und alle 10 Tage auf frisches MS-Medium umgesetzt (ca. 3 Mal). Regenerierte Sprosse wurden abgeschnitten, bis zur Wurzelbildung auf MS-Medium (+ 10 mg/L PPT, 200 mg/L Ticarcillin) kultiviert und letztlich in Erde überführt.

Transformation von *Pisum sativum*

Für die Erbsentransformation wurde ein modifiziertes Protokoll der von Schroeder et al. (1993) beschriebenen Methode angewandt. Dazu wurden unreife Hülsen 2-5 Tage nach dem Erreichen des maximalen Frischgewichtes geerntet. Die Hülsen wurden nachfolgend in 70 % Ethanol (10 min) und 50 % „Domestos“ Haushaltsreiniger (10 min) sterilisiert und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen. Danach wurden die Samen aus den Hülsen entfernt und die Explantate für die Transformation aus der Embryoachse dieser Samen geschnitten. Für die Präparation der Explantate wurde das Wurzelende jedes Segmentes abgeschnitten und Bereiche des Epikotyls sowie des Apikalmeristems mit einer Rasierklinge in drei bis fünf Längsschnitte geteilt. Diese Scheiben wurden für 30-40 min mit der Agrobakteriensuspension inkubiert, auf festes B5-Medium gelegt und für 3-4 Tage bei 21°C und 16 h Licht mit den Agrobakterien kokultiviert. Danach wurden die Explantate 5x mit B5-Medium gewaschen und zur Kallusinduktion auf P1-Medium mit 10 mg/l PPT gesetzt. Nach 15 Tagen wurden die Explantate zur Sprossentwicklung auf MS4-Medium mit 10 mg/l PPT überführt und alle 20 Tage (3-4 Mal) auf frisches MS4-Medium umgesetzt. Primäre Sprosse, die sich aus bereits vorhandenen Meristemen entwickelten, wurden entfernt und verworfen. Nach etwa 2 Monaten wurde die Phosphinotricinkonzentration auf 5 mg/l PPT herabgesetzt. Regenerierte Sprosse wurden abgeschnitten und auf MS1-Medium überführt. Nach 6-12 Wochen Kultivierung wurden Sprosse >0,5 cm *in vitro* auf einen Wurzelstock von etiolierten, 5-7 Tage alten *P. sativum* Keimlingen gepfropft. Nach ca. 10 Tagen wurden die gepfropften Pflanzen in Erde gepflanzt und in der Phytokammer weiter gezogen. Die Pflanzen wurden zunächst unter transparenter Abdeckung gehalten und dann stufenweise an eine geringere Luftfeuchte angepasst bis zur vollständigen Entfernung der Abdeckung. Die Blätter der Primärtransformanten wurden mit Erreichen des 4-6 Knotenstadiums mit einer 0,5 %-igen Lösung des Herbizids Basta® (Hoechst) bestrichen, um eine entsprechende Resistenz festzustellen und somit transgene Pflanzen zu selektieren.

2.2.4 Pflanzenanzucht und Materialentnahme

A. thaliana

Arabidopsis-Pflanzen vom Columbia-Ökotyp wurden unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h dunkel, 22°C) in einem Pflanzenkulturraum gezogen. Das Substrat bestand aus einem Gemisch aus Erde und Quarzsand.

N. tabacum

Tabakpflanzen (*N. tabacum* L. cv. SNN) wurden *in vitro* in Pflanzenkulturräumen bei 16 h Licht / 8 h dunkel und 22°C angezogen. Die Blätter 4 Wochen alter Pflanzen wurden für den Agrobakterien-vermittelten Gentransfer eingesetzt. Regenerierte Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 23°C und 16 h Licht weiter kultiviert.

Transgene Promotor/GUS-Tabakpflanzen wurden im Alter von 4 bis 6 Wochen aus der *in vitro*-Kultur genommen und hydroponisch weiter gezogen. Dazu wurden die *in vitro* Pflanzen zunächst für zwei Wochen in Sand ausgepflanzt und danach in Erlenmeyerkolben mit flüssigem MS-Medium überführt. In Flüssigmedium entwickeln die Pflanzen kräftigere Wurzeln als in Medium mit Agar.

H. vulgare

Gerstenpflanzen der Sorte „Barke“ (Sommergerste) wurden im Gewächshaus kultiviert.

Um die Expression von Aminosäuretransportern in sich entwickelnden Karyopsen und vegetativen Geweben zu analysieren, wurden die Ähren selbstbestäubter Blüten am Tag der Befruchtung etikettiert (0. DAF). Die Karyopsen wurden vom 0. DAF bis 20. DAF im Abstand von zwei Tagen geerntet. Dabei wurde das maternale Perikarp von den filialen Geweben (Endosperm und Embryo) getrennt präpariert. Ab dem 12. DAF wurden Endosperm und Embryo voneinander getrennt. Alle geernteten Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

P. sativum

Erbsepflanzen (*Pisum sativum* L. cv. Eiffel bzw. Erbi) für die Transformation wurden in Phytokammern bei 16 h Licht / 18°C und 8 h dunkel / 16°C angezogen. Die Hülsen wurden 2-5 Tage nach Erreichen des maximalen Frischgewichtes geerntet und die unreifen Samen für die Agrobakterien-vermittelte Transformation verwendet. Folgegenerationen der transgenen Pflanzen wurden zum Teil in Phytokammern (16 h Licht / 18°C und 8 h dunkel / 16°C) oder in Gewächshäusern ohne zusätzliche Licht- und Temperaturregulation (März bis Juli) angezogen.

Für die Inhaltsstoffanalyse und um die Expression von *VfAAP1* in sich entwickelnden Samen zu untersuchen, wurden selbstbestäubte Blüten am Tag der Befruchtung etikettiert (0. DAF). Die Samen wurden vom 15. DAF bis 35. DAF geerntet. Dabei wurde die Samenschale von den Kotyledonen entfernt und die Kotyledonen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert. Pro Entwicklungsstadium und Linie wurden Hülsen von fünf verschiedenen Pflanzen geerntet. Um die Expression von *VfAAP1* und *VfPTR1* unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors zu überprüfen, wurden zusätzlich *source*-Blätter geerntet und ebenfalls in Stickstoff eingefroren.

2.2.5 Kreuzung von Erbsenpflanzen

Für die Kreuzung der homozygoten Linie *sucAAP 5/8* mit der ebenfalls homozygoten Linie *LeB4AAP 14/10* wurden Samen dieser Linien gleichzeitig ausgelegt, um einen vergleichbaren Blühzeitpunkt zu gewährleisten. Von den Blüten einer Elternlinie wurden die unreifen Antheren entfernt und die Blüten dann mit dem fremden Pollen der anderen Elternlinie bestäubt. Dabei dienten sowohl *sucAAP*- und *LeB4AAP*-Pflanzen jeweils als Pollenspender und Pollenempfänger. Die resultierenden F_1 -Samen sind für beide Konstrukte heterozygot und können für weitere Nachkommenschaftsanalysen verwendet werden.

2.2.6 Isolierung genomischer DNA und Southern Blot

Für die Isolierung genomischer DNA wurde ca. 200 mg gefrorenes Blattmaterial in einer Schwingmühle zerkleinert und anschließend in DNA-Extraktionspuffer (1 % N-Lauryl-Sarcosin, 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl) und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:50:1) suspendiert. Nach der Zentrifugation (5000 rpm, 3 min, RT) wurde der Überstand mit 3 M Natriumazetat pH 5,2 und Isopropanol gefällt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C), das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und letztlich in 10 mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert. RNA-Verunreinigungen wurden durch RNase-Behandlung (1 h, 37°C) entfernt.

Für den Southern Blot wurden 10 μg DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in einem 1 %-igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Azetat, 1 mM EDTA) aufgetrennt. Danach wurde das Gel 5 min mit 0,25 M HCl behandelt, anschließend denaturiert (2x 15 min mit 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und neutralisiert (2x 15 min mit 0,5 M Tris-HCl pH 8, 3 M NaCl). Die DNA wurde dann unter Verwendung von 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumzitat) auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺) transferiert und durch UV-Quervernetzung (UV Stratalinker[®] 2400) auf der Membran immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit [α -³²P]dCTP radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten (RediPrimell Labeling

System) in modifiziertem Church Puffer (0,5 M Natriumphosphat, 7 % SDS, 1 % BSA, 2 mM EDTA; [Church and Gilbert, 1984]) bei 65°C in Anwesenheit von nicht-homologer „Salmon Sperm DNA“ (Stratagene). Die hybridisierten Membranen wurden 3x 20 min bei 65°C mit Spüllösung (40 mM Natriumphosphat pH 7,2, 1 % SDS, 2 mM EDTA) gewaschen und je nach Signalstärke unterschiedlich lange exponiert.

2.2.7 RNA-Isolierung und Northern Blot

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte wie in (Heim et al., 1993) detailliert beschrieben. Pflanzliches Gewebe wurde in RNA-Extraktionspuffer (1 M Tris-HCl pH 7, 10 mM EDTA, 1 % SDS) und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:50:1) homogenisiert. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase mit Phenol/Chloroform extrahiert, die Nukleinsäuren wurden mit 3 M Natriumazetat pH 5,2 und 96 % Ethanol gefällt und in Wasser gelöst. Die RNA wurde anschließend ü/N bei 4°C mit 4 M Lithiumchlorid gefällt, nacheinander mit 2 M Lithiumchlorid und 70 % Ethanol gewaschen und in Wasser gelöst.

Für die Northern Blot Analyse wurden 10 µg RNA in einem 1 %-igen Formaldehyd-Agarosegel in 1x MOPS-Puffer aufgetrennt, unter Verwendung von 20xSSPE (3,6 M NaCl, 0,2 M Natriumphosphat, 0,02 M EDTA pH 7,7) auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺) transferiert und durch UV-Quervernetzung auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung erfolgte nach Church and Gilbert (1984) wie unter 2.2.6 für den Southern Blot beschrieben. 25S rDNA wurde zur Hybridisierung eingesetzt, um die relativen RNA-Mengen zu bestimmen, die in jeder Spur aufgetragen wurden.

2.2.8 Transiente Expression von Reporterfusionen in Protoplasten

Isolation und Transformation von Protoplasten

Protoplasten für die transiente Genexpression wurden aus Suspensionszellkulturen von *A. thaliana*, *H. vulgare* und *V. faba* sowie aus Arabidopsis-Blättern isoliert. Die Suspensionszellen wurden dazu zunächst zentrifugiert (5 min, 800 rpm, RT), das Pellet in Enzymlösung (2 % Cellulase, 1 % Macerozyme in K3-Medium) aufgenommen und ü/N zum Zellwandabbau inkubiert. Die freigesetzten Protoplasten wurden mit W5 Waschlösung (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 5 mM KCl, 5,5 mM Glukose, pH 5,6) verdünnt, durch ein 80 µm Nygonsieb filtriert, zentrifugiert (10 min, 800 rpm, RT), mit W5 und MgMannit (0,45 M Mannitol, 15 mM MgCl₂, 0,1 % MES pH 5,6) gewaschen und letztlich in MgMannit aufgenommen (ca. 3x10⁶ Zellen/ml). Für die Isolation von Mesophyllprotoplasten wurden die Blätter von Arabidopsis-Pflanzen kleingeschnitten, eingeritzt und mit der genannten Enzymlösung behandelt. Die freigesetzten Protoplasten wurden analog zu den

Suspensionsprotoplasten behandelt. Für die Transformation wurden 10^6 Protoplasten/ml 5 min bei 42°C inkubiert, für 1 min ins Eisbad gestellt und mit 10-30 µg Plasmid-DNA sowie 160 µg Kalbsthymus-DNA versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei RT inkubiert, mit 350 µl PEG 6000 (40 %) gemischt, 20 min bei RT inkubiert und unter Zusatz von 4 ml K3-Medium bis zur Aufarbeitung 24 – 48 h dunkel bei 22°C inkubiert.

Promotortestungen

Für die *VfPTR1* Promotortestungen wurde als Reporter gen das in Pflanzen nicht vorhandene bakterielle Gen der β-Glucuronidase (GUS), *uidA*, verwendet. Die putativen *VfPTR1*-Promotorfragmente wurden vor das *uidA*-Gen in den promotorlosen Vektor pGUS1 kloniert. Die β-Glucuronidase katalysiert die hydrolytische Spaltung vieler β-Glucuronide. In diesem Fall wird das Substrat 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid (MUG) zu 4-Methylumbelliferon (MU) hydrolysiert, welches durch seine Fluoreszenz nachweisbar ist. Über die Intensität der Fluoreszenz kann auf die enzymatische Aktivität der β-Glucuronidase geschlossen und diese quantifiziert werden. Die Protoplasten wurden nach der Transformation 24 h dunkel inkubiert und anschließend unter Verwendung des GUS-Light™ Kit nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die spezifische Aktivität der β-Glucuronidase wurde mit einem Luminometer gemessen.

Expression von GFP-Fusionsproteinen in Protoplasten

Um die intrazelluläre Lokalisierung verschiedener Proteine aufzuklären, wurden translationale Fusionen mit GFP (*green fluorescent protein*) erstellt. GFP stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* und fluoresziert grün bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht. Da GFP in nahezu allen eukaryontischen Zellen nicht toxisch wirkt, ist es sehr gut für *in vivo* Untersuchungen geeignet. Für diese Versuche wurde die Codon-optimierte Variante, das sogenannte *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) verwendet, welches im Vergleich zum Wildtyp eine 5-10fach stärkere Expression aufweist. Die transformierten Protoplasten wurden 1-2 Tage bei 22°C dunkel kultiviert und anschließend durch Anregung mit blauem Licht (488 nm) mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop auf GFP-Fluoreszenzsignale untersucht.

2.2.9 Genome Walking

Um die Promotorsequenz des *VfPTR1*-Gens zu isolieren, wurde *genome walking* mit dem Universal Genome Walker™ Kit der Firma Clontech nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, unbekannte genomische Sequenzen zu amplifizieren, die sich unmittelbar an eine bereits bekannte DNA-Sequenz anschließen. Für die Herstellung der

genome walking Bank wurden 2,5 µg genomische DNA von *V. faba* ü/N bei 37°C mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten, die glatte Enden produzieren (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI*). Nach der Reinigung der DNA wurde an das 5'- und 3'-Ende der genomischen Fragmente der *genome walker* Adaptor ligiert. Mit einem genspezifischen Primer (VfPTR1_GSP1) und dem Adaptorprimer AP1 wurde anschließend eine PCR-Reaktion durchgeführt, um genomische *VfPTR1*-Fragmente zu amplifizieren. Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, folgte der ersten PCR eine *nested* PCR mit einem zweiten genspezifischen Primer (VfPTR1_GSP2) und dem Adaptorprimer AP2. Für die PCR wurde das Advantage[®] 2 Polymerase Enzyme System der Firma Clontech verwendet. Die erhaltenen Fragmente wurden aus dem Gel eluiert, in den Vektor pCR[®]4-TOPO[®] kloniert und sequenziert.

2.2.10 Quantitative real-time (qRT) PCR

Zum Nachweis der Expression von *VfAAP1* unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors in Blättern transgener Erbsen, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurde aus Blättern (4. DAF) RNA isoliert und 2 µg Gesamt-RNA unter Verwendung des First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Für die PCR-Amplifikation wurden mit Hilfe des Programms Primer Express spezifische Primer aus den 5'- und 3'-Bereichen der *VfAAP1* cDNA abgeleitet, die Produkte von etwa 60 bp Länge liefern. Als Kontrolle wurden zusätzlich Primer aus den 5'- und 3'-Bereichen eines konstitutiv exprimierten *PsActin*-Gens abgeleitet. Um zu überprüfen, ob die eingesetzte RNA frei von genomischer DNA ist, wurde eine PCR mit Primern aus einem Intronbereich des *PsActin*-Gens durchgeführt. Alle Reaktionen wurden in 10 µl Endvolumen und unter Verwendung des Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) durchgeführt. Die qRT-PCR wurde standardmäßig nach folgendem Programm ausgeführt:

Schritt	Zeit	Temperatur
1	2 min	50°C
2	10 min	95°C
3-47	15 sek	95°C
	1 min	60°C
48	15 sek	95°C
49	15 sek	60°C
50	15 sek	95°C

Tab. 2.1: Schema für die quantitative real-time PCR

Die Auswertung der qRT-PCR Reaktion erfolgte mit der Software SDS 2.2.1 (Applied Biosystems).

2.2.11 Analyse von Promotoraktivitäten in Pflanzen

Um die putativen Promotorbereiche von *VfPTR1* auf eine Aktivität in pflanzlichen Geweben zu testen, wurden Fusionskonstrukte mit dem GUS-Gen (*uidA*) bzw. dem GFP-Gen (*eGFP*, *enhanced GFP*) erstellt.

GUS-Färbung transgener Promotor/GUS-Pflanzen

Die enzymatische Aktivität der β -Glucuronidase lässt sich im pflanzlichen Gewebe histochemisch mittels einer Farbreaktion nachweisen, da bei der hydrolytischen Spaltung des Substrates 5-Brom-4-chlorindolyl- β -D-glucoronid (X-Gluc) der schwer lösliche Indigo-Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo entsteht. Dieser Farbstoff fällt an den Orten der Enzymaktivität aus (Jefferson et al., 1987). Für die Analysen wurden Wurzel-, Stängel- oder Blattstückchen mit der Rasierklinge von transgenen Tabakpflanzen abgetrennt und in GUS-Färbelösung (50 mM NaPi pH 7,0, 0,5 mM X-Gluc, 1 mM EDTA, 0,05 % v/v Triton-X100, 0,1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$) ü/N bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgezogen und die Proben zur Extraktion des Chlorophylls in 70 %-igen Ethanol überführt. Die entfärbten Proben wurden am Stereomikroskop ausgewertet und fotografiert.

Analyse transgener Promotor/GFP-Pflanzen

Wurzeln transgener Tabakpflanzen wurden mit der Rasierklinge abgeschnitten, mit GFP-Anregungslicht (488 nm) bestrahlt und am konfokalen Laserscanning Mikroskop ausgewertet. Von Stängeln wurden zunächst 200 μ m dicke Quer- und Längsschnitte mit dem Vibratom erzeugt und diese am Mikroskop betrachtet. Von sich entwickelnden Samen transgener Erbsenpflanzen (26. DAF) wurden ebenfalls mit dem Vibratom 200 μ m dicke Querschnitte erstellt und diese auf GFP-Fluoreszenz untersucht.

2.2.12 Inhaltsstoffanalyse von sich entwickelnden und reifen Samen

Extraktion von Speicherproteinen

Für die Bestimmung der Speicherproteinfraktionen (Albumine und Globuline) sowie des Gesamtkohlenstoff- und -stickstoffgehaltes wurden reife Erbsensamen in einer Schwingmühle zu feinem Pulver gemahlen und dieses ü/N bei 60°C getrocknet. Unreife Samen verschiedener Entwicklungsstadien wurden zunächst für drei Tage gefriergetrocknet und anschließend ebenfalls in der Schwingmühle gemahlen. Für die Extraktion der Albumine wurden 50 mg vom getrockneten Mehl zunächst mit Slytermann-Puffer (50 mM Azetat, 1 mM KCl, 10 % DMSO, 0,5 % Butanol, pH 4,5) versetzt, 15 min bei 4°C und 1000 rpm geschüttelt, zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C) und der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal wiederholt. Danach wurde das Pellet zur Extraktion der Globuline in

Phosphatpuffer (100 mM KH_2PO_4 , 100 mM Na_2HPO_4 , 500 mM KCl, pH 7) resuspendiert und wie für den Slytermann-Puffer beschrieben, behandelt. Die Konzentration der löslichen Proteine im Überstand wurde mit einem Spektrophotometer nach Bradford (1976) bestimmt, wobei BSA als Standardprotein diente.

Bestimmung des C- und N-Gehaltes

Der relative Gehalt an Gesamtkohlenstoff und –stickstoff in den Samen wurde mit einem Elementaranalysator nach Dumas Verbrennungsmethode bestimmt. Dazu wurden 3 mg des zuvor getrockneten Pulvers für die Messung eingewogen. Die Proben werden im Analysator unter kontrollierter Sauerstoffzufuhr bei hohen Temperaturen verbrannt.

Extraktion von Stärke, Saccharose und Aminosäuren

Stärke wird durch Amyloglucosidase bei pH 4,6 zu D-Glukose gespalten. Die gebildete D-Glukose wird durch die Enzyme Hexokinase und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) bestimmt. D-Glukose wird unter Verwendung von ATP durch die Hexokinase phosphoryliert, wobei D-Glukose-6-phosphat (G-6-P) und ADP entstehen. G-6-P wird durch NADP in Anwesenheit von G6P-DH zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert, wobei NADPH entsteht. Die gebildete Menge NADPH wird bei 340 nm gemessen und ist proportional zu der durch die Stärkehydrolyse gebildeten D-Glukose-Menge. Für die Bestimmung des Saccharosegehaltes wird der D-Glukosegehalt nach enzymatischer Hydrolyse der Saccharose bestimmt. Dabei werden zwei Messungen, vor und nach der enzymatischen Inversion, durchgeführt und die Differenz der Glukosekonzentrationen ergibt den Saccharosegehalt. Messgröße ist auch hier NADPH.

20 mg des getrockneten Mehls wurde eingewogen, mit je 20 μl der Standardlösungen Norleucin (5 mM) und $^{13}\text{C}_6$ -Glukose (5 mg/ml) sowie 710 μl 80 % Ethanol versetzt und für 30 min bei 60°C geschüttelt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde erneut in 750 μl 80 % Ethanol resuspendiert, zunächst für 10 min bei RT und dann nochmals für 30 min bei 60°C geschüttelt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit dem ersten vereinigt. Für die Bestimmung der freien Aminosäuren mittels HPLC wurden 100 μl des Überstandes verdampft und die getrocknete Probe in 250 μl H_2O aufgenommen. Für die Bestimmung der Zucker wurde der gesamte Überstand verdampft und die Probe in 500 μl H_2O aufgenommen. Für die Stärkebestimmung wurde das Pellet in 1 - 2 ml 0,5 M KOH gelöst und für 1 h bei 95°C gekocht. 5 μl von der Probe wurden dann mit 100 μl Amyloglukosidase-Puffer (75 U/ml Amyloglukosidase in 100 mM tri-Natriumzitat x 2 H_2O pH 4,6) versetzt und 30 min bei 60°C geschüttelt. Zum gesamten Ansatz wurden 750 μl Bestimmungspuffer (100 mM Imidazol pH 6,9, 5 mM MgCl_2 x 6 H_2O , 2 mM NAD, 1 mM ATP) und 2 μl G6P-DH gegeben und die

Mischung für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 10 µl Hexokinase (1:1 verdünnt) zugegeben und die Extrakte weitere 25 min bei RT inkubiert. Die Vermessung der Proben erfolgte mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 340 nm. Für die Zuckerbestimmung wurden 10 µl der Probe eingesetzt, mit Bestimmungspuffer und G6P-DH versetzt, 10 min inkubiert, mit 5 µl Hexokinase versetzt, 10 min inkubiert und dann das erste Mal vermessen. Danach wurde den Proben 10 µl β-Fruktosidase zugefügt, diese für 30 min bei RT inkubiert und erneut bei 340 nm vermessen.

2.2.13 Arbeiten mit Hefe

Kultivierung, Transformation und Komplementation von *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen

Zur Erhaltung und Herstellung kompetenter Zellen wurden die Hefestämme auf Vollmedium (YPD) bei 30°C angezogen. Für die Stämme JT16 und LR2 wurde dem Vollmedium 2 mM Histidin zugesetzt. Die Transformation der Hefestämme erfolgte nach Dohmen et al. (1991): Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 50 ml YPD-Medium mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes inokuliert ($OD_{600} = < 0,1$). Bei einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml ($OD_{600} = 0,5-0,8$) wurden die Zellen zentrifugiert (3000 rpm, 5 min, RT), mit 20 ml Lösung A (10 mM BICINE pH 8,35, 1 M Sorbitol, 3 % Ethylenglykol) gewaschen, erneut zentrifugiert und in 2 ml Lösung A aufgenommen. Aliquots dieser Zellen wurden bei -80°C gelagert. Für die Transformation wurden 1 µg Plasmid-DNA, 25 µg Carrier-DNA (*salmon sperm* DNA) und 5 µl 1 M Histamin gemischt, zu den gefrorenen Zellen gegeben und 5 min bei 37°C und 600 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml Lösung B (20 mM BICINE pH 8,35, 40 % PEG1000) versetzt, vorsichtig gemischt und 1 h bei 30°C inkubiert. Dann wurde die Mischung zentrifugiert (3000 rpm, 1 min, RT), das Pellet mit 800 µl Lösung C (10 mM BICINE pH 8,35, 150 mM NaCl) gewaschen und in 60-100 µl Lösung C aufgenommen. Die Zellen wurden zur Selektion positiver Transformanden auf SD-Medium ohne Uracil (SD-ura) plattiert und bei 30°C inkubiert. Das *ura3*-Gen dient als Selektionsmarker und ist Bestandteil des Hefeexpressionsvektors pDR196. Die eingesetzten Hefestämme tragen eine Mutation in dem für die Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase codierenden *ura3*-Gen, d.h. sie sind nicht in der Lage Uracil selbst zu synthetisieren. Erst durch die Aufnahme des Plasmids wird ein funktionelles *ura3*-Gen bereitgestellt.

Für die funktionelle Komplementation wurden je zwei unabhängige Kolonien der transformierten Hefestämme auf Minimalmedium (MM oder SC) ausgestrichen, welches je nach Stamm bestimmte Aminosäuren oder Dipeptide als einzige Stickstoffquelle enthält. In der Tabelle 2.2 sind die verschiedenen Medien für die einzelnen Stämme aufgelistet. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30°C für drei bis fünf Tage. Das nicht-selektive SD-

Medium enthält 0,5 % Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle. Für die Stämme JT16 und LR2 wurde auch dem Selektivmedium Ammoniumsulfat zugesetzt. NH_4^{2+} -Ionen hemmen bis zu einem gewissen Grad die generelle Aminosäurepermease GAP1 von *S. cerevisiae*, so dass über diesen Transporter kein Histidin aufgenommen werden kann. Erst in hohen Konzentrationen von 20 mM (nicht-selektive Bedingungen) kann Histidin eintransportiert werden.

Hefestamm	Selektivmedium	Nicht-selektives Medium
22574d	MM + 1 g/l Prolin, Citrullin oder GABA	SD
22Δ6AAL	MM + 1 g/l Urea, + 100 μM Lysin	MM + 1 g/l Urea, + 1 g/l Lys-Asp
21.983c	MM + 1 g/l Arginin	SD
30.537a	MM + 1 g/l Glutamat	SD
YDR544	MM + 1 mM Methionin, Phenylalanin, Valin bzw. Isoleucin	SD
JT16	SC + 5 mM Histidin	SC + 20 mM Histidin
LR2	SC + 10-20 mM His-Ala	SC + 20 mM Histidin

Tab. 2.2 : Übersicht über die verwendeten Hefestämme sowie die zugehörigen selektiven und nicht-selektiven Medien

Isolation von intakten Mitochondrien aus *S. cerevisiae* und Messung der Atmungsrate

Die Isolation von intakten Mitochondrien wurde mittels differentieller Zentrifugation in Anlehnung an Daum et al. (1982) durchgeführt. Der Hefestamm 22574d wurde mit *HvGAP1* transformiert und positive Transformanten auf SD-ura Medium selektiert. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurde über eine Vorkultur eine 1 l-Kultur angelegt, und die Hefezellen bei Erreichen einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 5-6$ abzentrifugiert (10 min, 4500 rpm, 4°C). Es wurde das Feuchtgewicht bestimmt und die Zellen in Aufschlusspuffer (0,1 M Tris- SO_4 , 10 mM DTT) resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min bei 30°C geschüttelt, erneut zentrifugiert (4 min, 4000 rpm, 4°C), mit Sorbitlösung (1,2 M Sorbit, 20 mM KH_2PO_4) gewaschen und in Sorbitlösung aufgenommen. Zur Protoplastierung wurde 2 mg Zymolyase/g Feuchtgewicht zugegeben und die Suspension 1 h bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden die Protoplasten zur Lyse 1:40 mit H_2O verdünnt, zentrifugiert (4 min, 3000 rpm, 4°C), mit 1,2 M Sorbit gewaschen und in Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbit, 10 mM Tris-Cl pH 7,4, 0,5 % BSA, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Zellen wurden homogenisiert und Zelltrümmer sowie nicht aufgebrochene Protoplasten durch Zentrifugation (4 min, 4000 rpm, 4°C) abgetrennt. Für die Sedimentation der Mitochondrien wurde der Überstand 10 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH 7,4) gewaschen und die Mitochondriensuspension erneut sedimentiert (10 min, 12000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in

SEM-Puffer aufgenommen und von der Mitochondriensuspension eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Für die Bestimmung der Atmungsrate in der Suspension wurden die Mitochondrien mit Messpuffer (3 mM ADP, 2 mM K-Phosphat, 10 mM MgSO₄, 10 mM Tris-Azetat pH 7,3, 2 mM EDTA, 0,2 % BSA, 250 mM Saccharose) versetzt und 0,5 M Succinat bzw. GABA zugegeben. Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Suspensionsmedium ist ein Maß für die Atmung. Dabei wurde der Sauerstoffverbrauch in nmol pro mg Protein pro Minute berechnet. Die Zugabe von Gramicidin als Entkoppler bewirkt den Einstrom von Protonen in die Mitochondrien durch eine Erhöhung der Permeabilität für H⁺-Ionen. Die ATP-Synthese kommt trotz eines intakten nicht-zyklischen Elektronentransports mit NADH-Bildung zum Erliegen.

2.2.14 Herstellung und Reinigung polyklonaler Peptidantikörper

Herstellung von Peptidantikörpern

Die Herstellung der Peptidantikörper gegen VfpTR1 inklusive Peptidsynthese wurde von der Firma Pineda Antikörperservice (Berlin) durchgeführt. Für die Immunisierung wurde ein Peptidcocktail zweier 14 Aminosäuren langer Peptide vom N- bzw. C-Terminus verwendet. Die synthetischen Peptide wurden an das Carrier-Protein KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) konjugiert und drei Kaninchen mit dem Peptidcocktail immunisiert. Während der Immunisierungsphase wurden regelmäßig Serumproben auf ihre Antigen-spezifität im ELISA und Western Blot getestet. Am 120. Immunisierungstag wurde das gesamte Rohserum gewonnen.

Reinigung der Peptidantikörper

Für die Aufreinigung des Kaninchen-Rohserums wurden verschiedene Methoden angewandt. Um Lipide, Salze und Nukleinsäuren aus dem Rohserum zu entfernen, wurde zunächst eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Dazu wurden 50 ml Rohserum unter Rühren tropfenweise mit 50 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung versetzt, 2 h auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (4000 rpm, 30 min, 4°C). Das Pellet wurde in 25 ml PBS (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5) gelöst und gegen PBS dialysiert.

Um die Immunglobulin G (IgG) Fraktion, die die antigenbindenden Antikörper enthält, zu erhalten, wurde das gefällte Serum über eine Protein A-Säule (Protein A Sepharose CL-4B, GE Healthcare) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Säule wurde zunächst mit PBS äquilibriert, mit 1 ml Serum beladen und die verschlossene Säule für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit PBS gewaschen und letztlich die IgG-Fractionen mit

0,1 M Glycin-HCl (pH 2,8) eluiert. Die Antikörperlösung wurde sofort mit 1 M Tris (pH 8) neutralisiert. Alle Antikörperfraktionen wurden unter Verwendung von „iCON Concentrator“ Röhren (Pierce) nach Herstellerangaben eingengt und gegen PBS dialysiert.

Das Serum wird spezifisch gereinigt, wenn sogenannte Antigen-Säulen verwendet werden, mit denen nur die antigenbindenden Antikörper aufgereinigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür NHS-aktivierte Affinitätsäulen nach Herstellervorschrift benutzt (HiTrap NHS-activated HP, GE Healthcare). Die Säulen wurden zunächst mit 1 mM HCl aktiviert, dann erfolgte die kovalente Ligandenkopplung über primäre Aminogruppen der Peptide. Dazu wurden 8 - 10 mg jedes Peptids in Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) gelöst, auf die Säulen aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert. Um überschüssige aktive Gruppen zu deaktivieren und unspezifisch gebundenen Liganden zu entfernen, wurden die Säulen im mehrmaligen Wechsel mit Puffer A (0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3) und Puffer B (0,1 M Natriumazetat, 0,5 M NaCl, pH 4) gewaschen. Die Äquilibrierung der Säulen sowie die Reinigung des Serums erfolgten wie oben für die Protein A Säulen beschrieben.

2.2.15 Proteinbiochemische Methoden

Herstellung pflanzlicher Proteinrohextrakte

Die Extraktion der Proteine aus Keimlingswurzeln und Suspensionsgewebekulturen von *V. faba* und *H. vulgare* erfolgte zunächst durch Homogenisierung unter flüssigem Stickstoff. 100 mg des erhaltenen Pulvers wurde dann in einem Reaktionsgefäß mit Hilfe eines Metallpistills unter Zugabe von ca. 300 µl 1x SDS-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 5 % β-Mercaptoethanol, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 10 % Glycerin) weiter homogenisiert. Die Proben wurden anschließend 5 min bei 95°C denaturiert und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Western Blot

Die Proteinrohextrakte und die an Ovalbumin konjugierten Peptide wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel nach (Laemmli, 1970) in SDS-Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels Elektrotransfer (~ 1,2 mA/cm², 16 h) in einer mit Transferpuffer (10 % SDS-Elektrophoresepuffer, 20 % Methanol) gefüllten Apparatur („Mini Trans Blot“, BioRad) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde anschließend für 2 h bei RT mit 5 %-iger Trockenmilch („Marvel“) in Marvelpuffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) abgesättigt. Es folgte eine Inkubation (1,5 h, RT) mit dem affinitätsgereinigten anti-VfPTR1 Antikörper (1:1000 in 5 % Marvel). Danach wurde die Membran 3x 5 min mit 0,5 % Marvel

gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Esel anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-konjugiert, 1:2000 in 5 % Marvel) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 0,5 % Marvel erfolgte der Nachweis des VfPTR1 Proteins durch Chemilumineszenz mit dem ECL-System (Western Blotting Analysis System, GE-Healthcare).

Für Wettbewerbsversuche wurden die affinitätsgereinigten Antikörper (1:1000 in 5 % Marvel) 2 h bei RT mit den entsprechenden OVA-konjugierten Peptiden (20 µg/ml) vorinkubiert und dann auf die Membran gegeben.

ELISA

Die immunologische Spezifität der erhaltenen Peptidantikörper wurde in indirekten ELISA-Experimenten überprüft. Dazu wurde eine 96 *well* ELISA-Platte (MaxiSorp, Nunc) ü/N bei 4°C mit den OVA-konjugierten Peptiden (5 µg/ml in PBS, 100 µl pro *well*) beschichtet. Nach Verwerfen der Beschichtungslösung wurde die Platte für 2 h bei RT mit einer 3 %-igen BSA-Lösung in PBS abgesättigt (200 µl/*well*). Anschließend wurde die BSA-Lösung entfernt, die Platte 3x mit PBST gewaschen und für 90 min bei RT mit dem anti-VfPTR1 Antiserum (1:50000, 1:100000, 1:200000 in 3 % BSA/PBS, 100 µl/*well*) inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit PBST und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG konjugiert an alkalische Phosphatase, 1:2000 in 3 % BSA/PBS, 100 µl/*well*) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen (3x PBST, 1x PBS) wurde die ELISA-Platte mit Substratlösung befüllt (1 mg/ml pNPP in Substratpuffer [Diethanolamin, 0,1 g MgCl₂, 0,2 g NaN₃, pH 9,7]) und bis zur Vermessung der optischen Dichte 1 h bei 37°C inkubiert. Die Vermessung der Signale erfolgte in einem Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm.

2.2.16 Mikroskopische Techniken

Mikroskopische Techniken wurden teilweise von der Arbeitsgruppe „Strukturelle Zellbiologie“ am IPK durchgeführt.

***in situ* Hybridisierung**

Für die *in situ* Hybridisierung wurde ein 1200 bp großes Fragment der *HvGAP1*-cDNA mit DIG-11-dUTP unter Verwendung des „DIG-High Prime“ Kits der Firma Roche nicht-radioaktiv markiert. Nach der Markierungsreaktion wurde der Ansatz über MicroSpin-Säulen (GE Healthcare) zentrifugiert und die Effizienz der DIG-Markierung nach Herstellerangaben überprüft.

Karyopsen vom 0. und 10. DAF wurden in BMM (Butyl-Methyl-metacrylat) eingebettet, 5 µm dicke Querschnitte erzeugt und diese anschließend mit Aceton nach Warren (1998) wieder

entbettet und in einer Ethanol-Wasser Serie rehydriert. Nach einer Behandlung mit Proteinase K folgte die Hybridisierung wie bei De Block (1996), beschrieben. Nach dem Waschen wurden die Schnitte geblockt und anschließend mit einem anti-DIG Antikörper konjugiert mit alkalischer Phosphatase („DIG nucleic acid detection“ Kit, Roche) inkubiert. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde mit dem „Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate“ Kit (Vector Laboratories) nachgewiesen.

Chemische Fixierung und Einbettung

Zellsuspensionen von *V. faba* cv Fribo wurden auf zwei unterschiedliche Weisen chemisch fixiert. Bei einem Teil der Suspension wurde das Fixativ direkt in die Suspension gegeben zu einer Endkonzentration von 2 % Formaldehyd und 0,5 % Glutaraldehyd. Ein weiterer Teil der Zellsuspension wurde zuerst für 5 min bei 500 g zentrifugiert und das Pellet in Fixativlösung (2 % Formaldehyd, 0,5 % Glutaraldehyd in 20 mM PBS, pH 7,0) resuspendiert. Zur Fixierung wurden die Zellsuspensionen für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert (20 rpm). Danach wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 500 g) und in etwas Phosphatpuffer resuspendiert. 10 – 20 µl der Suspension wurden auf einem vorgewärmten Objektträger (40°C) 1:1 mit 40°C warmer *Low-Melting-Agarose* (3 %) gemischt. Nach der Verfestigung wurden 2 mm x 2 mm x 1 mm große Blöcke geschnitten, diese 3 x für 15 min mit PBS gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Für einen optimalen Erhalt der Struktur und der antigenen Bindungsstellen wurde die Entwässerung in einer Gefriersubstitutionseinheit (AFS, Leica AG, Wien) unter Absenkung der Temperatur durchgeführt. Die nachfolgende Infiltration mit HM20 Kunstharz erfolgte über vier Stufen bei RT. Ein detailliertes Ablaufschema ist in Tabelle 2.3 angegeben. Die vollständig infiltrierten Proben wurden dann in mit HM20 gefüllte Gelatine kapseln überführt und die Polymerisation des Harzes erfolgte in einer AFS bei -35°C für 48 h unter UV-Licht.

Lösung	Temperatur	Inkubationszeit
Fixativ	RT	1 h
PBS	RT	3 x 15'
30 % Ethanol	RT	15'
50 % Ethanol	4°C	15'
60 % Ethanol	4°C > -15°C	45'
75 % Ethanol	-15°C	45'
90 % Ethanol	-15°C > -35°C	45'
100 % Ethanol	-35°C > RT	40'
100 % Ethanol	RT	30'
25 % HM20	RT	ün
50 % HM20	RT	3 h
75 % HM20	RT	3 h
100 % HM20	RT	ün
100 % HM20	RT	3 h

Tab. 2.3 : Fixierung und Einbettung von *V. faba* Suspensionszellen in HM20.

Immunfluoreszenzmarkierung

Die polymerisierten Probenkapseln wurden zuerst grob mit einem Fräser angeschnitten. Anschließend wurden am Mikrotom mit Hilfe von Glasmessern Semidünnschnitte (1 µm) gemacht und auf einem Objektträger aufgenommen. Nach einer Färbung mit Methyleneblau (1 % in 1 % Borax [Dinatriumtetraborat-Decahydrat]) wurden lichtmikroskopisch Bereiche mit vielen angeschnittenen Zellen ausgesucht und markiert und die Kapsel nochmals zurechtgeschnitten. Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurden mit einem Histodiamantmesser 0,7 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Teflon-beschichtete 8-well Objektträger aufgenommen. Diese Semidünnschnitte wurden zunächst für 30 min in Blockierpuffer (3 % BSA, 0,05 % Triton X-100 in 20 mM PBS, pH 7,0) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Es folgte die einstündige Inkubation (RT) mit dem anti-VfPTR1 Antikörper (1:50 verdünnt in Blockierpuffer) bzw. dem Präimmunserum als Kontrolle. Nach 3-maligem Waschen für je 10 min mit Waschpuffer (0,1 % BSA, 0,05 % Triton X-100 in 20 mM PBS, pH 7,0) wurden die Proben für 45 min mit dem Sekundärantikörper (Alexa488 / Alexa568 *goat-anti-rabbit*) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben mit einem Deckglas abgedeckt und am konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht.

Immunogoldmarkierung

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden von den eingebetteten Proben ultradünne Schnitte (90 nm) mit einem Ultradiamantmesser hergestellt. Diese Schnitte wurden auf befilmte „75 Mesh hexagonal Kupfergrids“ aufgenommen. Die Immunogoldmarkierung fand in einer Tüpfelplatte statt, die *grids* wurden mit der Probe nach unten zeigend auf die jeweiligen Lösungen gelegt. Zuerst wurden die Proben für 20 min mit Blockierpuffer (Zusammensetzung wie bei Immunfluoreszenzmarkierung beschrieben) und anschließend 1 h mit dem anti-VfPTR1 Antikörper (1:50 bzw. 1:5 verdünnt in Blockierpuffer) bzw. dem Präimmunserum als Kontrolle inkubiert. Die Proben wurden 4 x gewaschen (Waschpuffer s. Immunfluoreszenzmarkierung) und dann für 45 min mit Protein A-Gold (Immunogoldkonjugat Protein A 10 nm) inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit Waschpuffer (2 x 10 min) und destilliertem Wasser (2 x 10 min), wurden die Proben mit 4 % wässrigem Uranylacetat für 20 min kontrastiert. Nach dem Trocknen folgte die Untersuchung der *grids* an einem Tecnai20 Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigung von 80 kV. Digitale Bilder wurden mit einer SIS Mega-View III Kamera aufgenommen.

2.2.17 Statistische Auswertungen

Ob gemessene Unterschiede zweier Messreihen statistisch signifikant sind, wurde anhand des „Studentischen t-Tests“ mit Hilfe des Programms Microsoft Excel überprüft. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 5 % (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Wenn der errechnete p-Wert der Analyse kleiner als 0,05 ist, liegt statistische Signifikanz vor.

3 Ergebnisse

3.1 N-Transporter aus Leguminosen

Gegenstand der folgenden Arbeiten ist der bereits funktionell charakterisierte Peptidtransporter 1 aus *Vicia faba* (VfPTR1). Die vollständige cDNA von VfPTR1 (2028 bp) stammt aus einer samenspezifischen cDNA-Bank von *V. faba*. Die Funktionalität des Transporters wurde in *S. cerevisiae* überprüft (Miranda et al., 2003). VfPTR1 codiert ein Protein mit 584 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 65 kDa und 10 vorhergesagten Transmembrandomänen. In der Arbeit von Fei et al. (1998) werden drei konservierte Sequenzbereiche beschrieben, die typisch für Mitglieder der PTR-Familie sind: GxxIADxWLGxFxTIxxxxVxxxG, LGTGGIKPxV und FxxFYLxINxGSL. Das zuletzt genannte wird als „FING“-Motiv bezeichnet und scheint für den Peptidtransport notwendig zu sein. Diese Motive wurden mit geringen Abweichungen (rot dargestellt) auch in der Aminosäuresequenz von VfPTR1 gefunden (GxxLADxYWGxYxTIxxxxIxxxG, LGTGGIKPxV, FxxFYFxFINxGAL; vgl. Abb. A 2). Die Abweichungen von den konservierten Bereichen treten ebenso in der Sequenz von PTR1 aus Arabidopsis auf (Dietrich et al., 2004).

3.1.1 Regulatorische Regionen und Expression des Peptidtransporters VfPTR1

Genomische Organisation des VfPTR1 Gens

Durch Southern Blot Analyse sollte überprüft werden, wie viele Sequenzbereiche mit Homologie zu PTR1 im Genom von *V. faba* vorhanden sind. Dazu wurde die genomische DNA mit sechs verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, die das zur Hybridisierung verwendete 700 bp PTR1 cDNA-Fragment nicht schneiden. Im Southern Blot waren mehrere Banden zu erkennen. Das Spaltmuster von XbaI und XhoI lässt auf zwei bis drei PTR1-homologe Bereiche schließen, vorausgesetzt, diese Enzyme schneiden nicht in einem Intron des PTR1-Gens. Ausgehend vom BglII- und NcoI-Spaltmuster gibt es fünf bis sechs PTR1-homologe Sequenzabschnitte. Mit PstI wurde die Vicia-DNA nur unvollständig geschnitten, was eine eindeutige Aussage über die Kopienzahl erschwert.

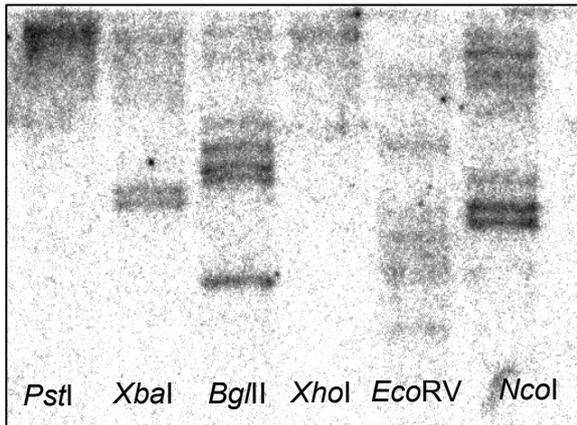


Abb. 3.1: Southern Blot Analyse der genomischen DNA von *V. faba*.

10 µg genomische DNA aus Blättern wurde mit den Restriktionsenzymen *PstI*, *XbaI*, *BglII*, *XhoI*, *EcoRV* und *NcoI* über Nacht bei 37°C inkubiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Nylonmembran immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgte unter stringenten Bedingungen mit einem 700 bp großen, radioaktiv markierten Fragment der *VfPTR1* cDNA.

Amplifizierung 5' genomischer Bereiche durch genome walking

Durch *genome walking* können unbekannte genomische DNA-Sequenzen identifiziert werden, die sich unmittelbar an eine bereits bekannte Sequenz des Zielgens anschließen. Genomische DNA wird dazu mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und an die 5'- und 3'-Enden der Fragmente wird ein DNA-Adaptor mit bekannter Sequenz ligiert. Der Bereich zwischen dem Adaptor und der bekannten Sequenz des Zielgens kann dann mittels PCR amplifiziert werden.

Für die Klonierung des Promotors von *VfPTR1* wurde zunächst eine *genome walking* Bank von genomischer DNA aus *V. faba* erstellt. Anschließend wurde eine PCR mit den Primern AP1 und *VfPTR1_GSP1* durchgeführt, gefolgt von einer *nested* PCR mit den Primern AP2 und *VfPTR1_GSP2*. Ausgehend von *DraI*, *EcoRV* und *PvuII* geschnittener DNA konnten insgesamt vier Fragmente unterschiedlicher Größe aus der genomischen Region des *VfPTR1*-Gens in 5'-Richtung des Startcodons amplifiziert werden. In Tabelle 3.1 sind die verschiedenen Fragmente aufgelistet.

Fragment-Nr.	Größe
1	580 bp
2	1831 bp
3	1041 bp
4	1433 bp

Tab. 3.1: Übersicht über die beim *genome walking* isolierten genomischen 5'- *PTR1*-Fragmente

Vergleichende DNA-Sequenzanalysen ergaben, dass die genomischen *PTR1*-Fragmente 2 und 3 identische Sequenzen enthalten, ebenso die Fragmente 1 und 4. Das heißt, es konnten zwei unterschiedliche genomische Sequenzen identifiziert werden, die bis auf 43 Nukleotide stromaufwärts vom Translationsstart (5' nicht translatierte Region; 97% identische Nukleotide) keine weiteren Ähnlichkeiten zueinander aufweisen. Weiterführende Analysen

mit Hilfe öffentlicher Datenbanken (Blastn, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) dieser Fragmente ergaben keine Homologien zu bisher bekannten Sequenzen.

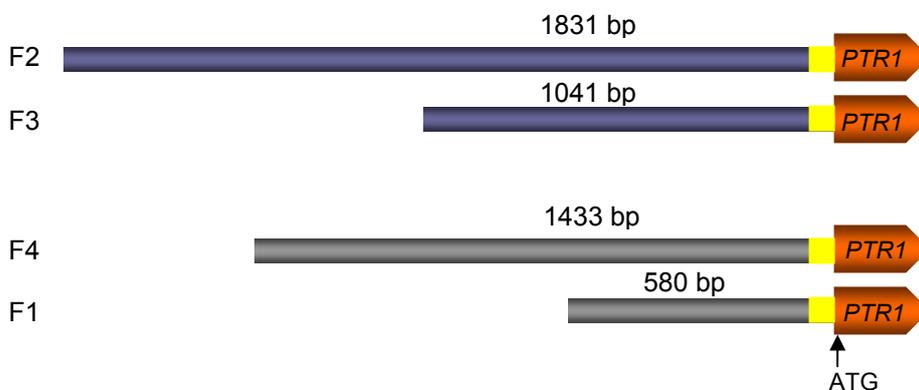


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der mittels *genome walking* isolierten 5'-genomischen Fragmente von *VfPTR1*. Violett bzw. grau dargestellt sind die putativen Promotorbereiche. Gelb dargestellt sind die homologen Bereiche innerhalb der 5' nicht translatierten Region (43 bp) mit 97 % identischen Nukleotiden. ATG: Translationsstart des *PTR1*-Gens

Aufgrund der identischen Sequenzen der Fragmente 2 und 3 bzw. 1 und 4 wurde im Folgenden nur mit den längeren DNA-Fragmenten weitergearbeitet. Fragment 2 wurde als Promotor A und Fragment 4 als Promotor B bezeichnet. Die Sequenzen wurden unter Verwendung verschiedener Softwareprogramme („Promoter 2.0“, „PLACE“, „PlantCARE“) auf das Vorhandensein von regulatorischen Elementen untersucht. Dabei konnten für beide genomische Fragmente neben einem putativen Transkriptionsstart typische Promotorelemente wie TATA-Box und CAAT-Box gefunden werden. In beiden Fragmenten konnten außerdem spezifische regulatorische Elemente identifiziert werden, die in der folgenden Tabelle 3.2 dargestellt sind. Abbildung 3.3 stellt die putativen Promotorelemente schematisch dar.

Promotorelement	Funktion	Position <i>upstream</i> vom ATG	Sequenz
Promotor A			
Inr (Initiator)	Transkriptionsstart	-544 bp	CCAGATT
TATA-Box	Initiation der Transkription	-738 bp	TTATTT
CAAT-Box	Initiation der Transkription	-756 bp	CAAT
E-Box	Endospermelement	-1021 bp	CANNTG
GATA-Box	Lichtregulation	-894 bp	GATA
ARF	Auxin response factor	-1433 bp	TGTCTC
ABRE	ABA responsive element	-1522 bp und -1020 bp	ACGTG

Promotor B			
Inr (initiator)	Transkriptionsstart	- 700 bp	CCAGATT
TATA-Box	Initiation der Transkription	- 516 bp	TATAAAT
CAAT-Box	Initiation der Transkription	- 673 bp und -1072 bp	CAAT
E-Box	Endospermelement	-1151 bp und -927 bp	CANNTG
GATA-Box	Lichtregulation	-1205 bp und -1005 bp	GATA
ABRE	ABA responsive element	-1162 bp	ACGTG

Tab. 3.2: Putative Promotorelemente der genomischen *PTR1*-Fragmente 2 (Promotor A) und 4 (Promotor B)

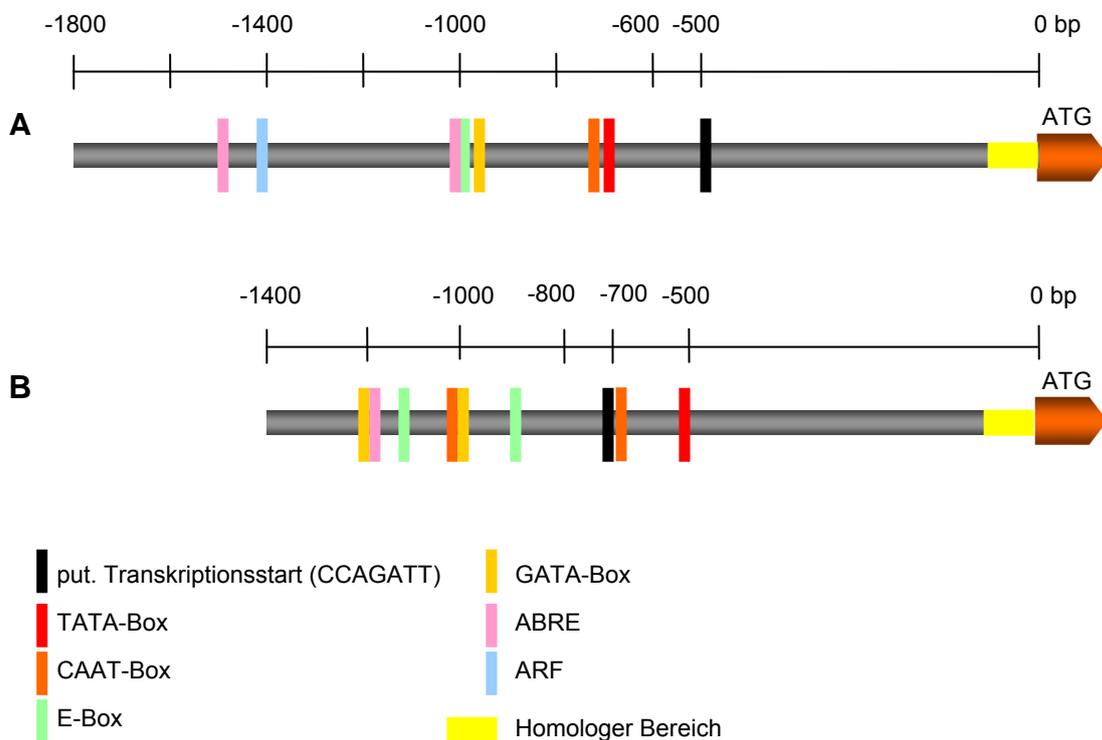


Abb. 3.3: Schematische Darstellung regulatorischer Elemente der putativen *PTR1*-Promotoren A und B. Die Positionen innerhalb der Sequenz sind relativ zum Translationsstart angegeben. Gelb dargestellt sind die homologen Bereiche innerhalb der 5' nicht translatierten Region (43 bp) mit 97 % identischen Nukleotiden.

Promotortestung im transienten Expressionssystem

Um zu überprüfen, ob die mittels *genome walking* isolierten putativen Promotoren von *VfPTR1* eine spezifische Aktivität zeigen, sollten sie zunächst in transient transformierten *V. faba* Protoplasten getestet werden. Durch Fusion mit einem Reporter gen, dessen Expression leicht zu quantifizieren ist, kann die Aktivität von Promotoren untersucht werden. Als Reporter gen wurde das bakterielle Gen der β -Glucuronidase (GUS), *uidA*, verwendet. Die Promotor-GUS-Fusionskonstrukte wurden basierend auf dem promotorlosen Vektor pGUS1 erstellt und über PEG-vermittelte Transformation in die Protoplasten übertragen (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.2.8). Dazu wurden die putativen Promotorfragmente A

und B unter Einbau der Restriktionsschnittstellen *Pst*I/*Sa*II (Fragment A) bzw. *Sph*I/*Pst*I (Fragment B) aus dem Plasmid pCR[®]2.1-TOPO[®] mittels PCR amplifiziert. Die gereinigten und geschnittenen Fragmente wurden anschließend in den mit denselben Enzymen verdauten Vektor pGUS1 einkloniert. Die richtige Orientierung der Fragmente wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

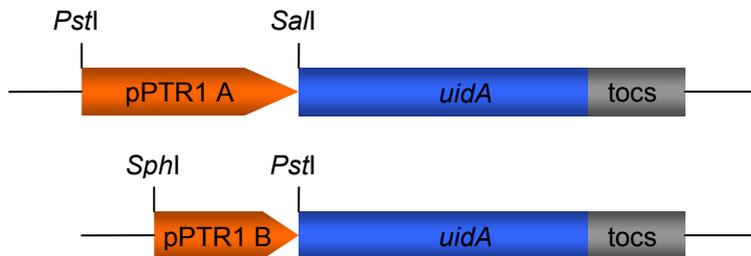


Abb. 3.4: Promotor:GUS-Fusionskonstrukte. pPTR1 A bzw. pPTR1 B: putative Promotorsequenzen von *VfPTR1*, *uidA*: β -Glucuronidase (GUS), *tocs*: Terminator des Octopinsynthasegens. Außerdem sind die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen angegeben.

Die transformierten Protoplasten wurden nach einem Tag luminometrisch auf eine GUS-Enzymaktivität untersucht. Dabei konnte nur für den Promotor A Chemilumineszenz, die die GUS-Aktivität anzeigt, und somit eine Promotoraktivität nachgewiesen werden. Die Messwerte waren im Vergleich zur Negativkontrolle (pGUS1 ohne Promotor) 50x erhöht (vgl. Abb. 3.5). Promotor B zeigte keinerlei Signal. Das heißt, dass Promotorfragment A über alle nötigen *cis*-regulatorischen Elemente für eine Transkription im Protoplastensystem verfügt.

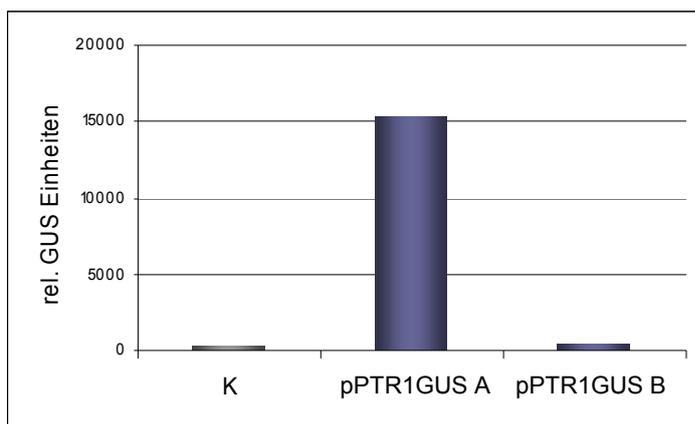


Abb. 3.5: Promotoraktivität der putativen *PTR1*-Promotorfragmente A und B in *V. faba* Protoplasten. Es wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils frisch isolierten Protoplasten durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Diagramm eines der Experimente. K, pPTR1GUS A, pPTR1GUS B: GUS-Aktivität von Protoplasten, die mit pGUS1 ohne Promotor (Negativkontrolle) bzw. dem Promotor A- und Promotor B-GUS-Fusionskonstrukt transformiert wurden.

Amplifizierung von 3' genomischen Bereichen

Die Southern Blot Analyse zeigte, dass es mehrere *PTR1*-Gene im Genom von *V. faba* zu geben scheint und durch *genome walking* konnten zwei putative *PTR1*-Promotoren isoliert werden. Um zu überprüfen, ob es möglicherweise zwei *PTR1*-Gene im Genom von *V. faba* gibt, wurde ausgehend von den beiden erhaltenen Promotorfragmenten *genome walking* in 3'-Richtung durchgeführt. Nach der *nested* PCR mit der DNA von Promotor A als Template wurden insgesamt 3 Fragmente unterschiedlicher Länge mit Homologien zu *VfPTR1* amplifiziert. Das größte mit einer Länge von 3,5 kb wurde vom 5'-Ende ansequenziert. Innerhalb des ca. 900 bp langen Bereichs wurden drei Exons und drei Introns identifiziert (Abb. 3.6). Ausgehend vom putativen Promotor B wurden zwei Fragmente unterschiedlicher Größe (2 kb und 350 bp) amplifiziert, die Sequenzidentitäten zu *VfPTR1* aufwiesen. Die ersten 157 bp dieser Fragmente entsprachen weitestgehend der *PTR1*-Sequenz mit dem Unterschied, dass ein Basenaustausch von G nach T an Position 13 zum Abbruch der codierenden Sequenz durch das Einführen eines Stopp-Codons führt. Die folgenden 764 bp zeigen auf DNA-Ebene keine Homologien zu *VfPTR1* oder anderen bekannten Genen. Erst ab Position 921 im Promotorfragment B ist die Sequenz wieder mit der *VfPTR1* cDNA-Sequenz homolog. Ob es sich bei dem zwischen den beiden *VfPTR1*-homologen liegenden Bereich um ein Intron oder einen anderen Sequenzbereich handelt, konnte nicht näher bestimmt werden. Möglicherweise handelt es sich bei dem amplifizierten Fragment um Teile eines Pseudogens.

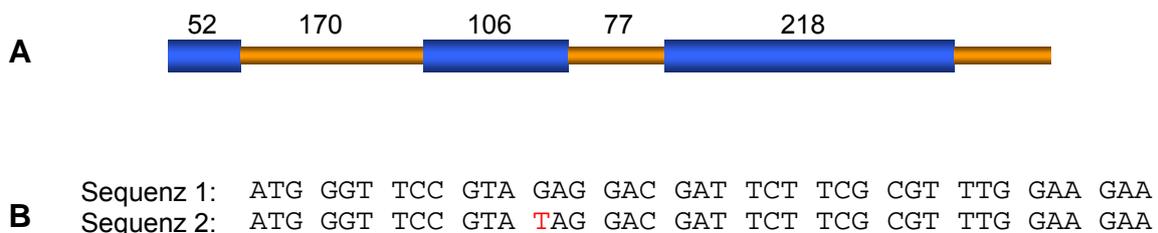


Abb. 3.6: Ausschnitt aus der Exon-Intron-Struktur des *VfPTR1*-Gens. A: Die Exons sind blau und die Introns gelb dargestellt. Die Größe ist in bp angegeben. B: Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz der amplifizierten *VfPTR1*-Fragmente A und B. Der Basenaustausch an Position 13 nach dem ATG ist in rot dargestellt.

VfPTR1 Transkriptabundanz in *V. faba* Keimlingen

Bisher wurde die *VfPTR1* mRNA-Expression nur in vegetativen Geweben und während der Samenentwicklung beschrieben (Miranda et al., 2003). Durch Northern Blot Analyse sollte die Transkriptverteilung von *VfPTR1* in Keimlingen näher untersucht werden. Für den Northern Blot wurde Gesamt-RNA aus elf verschiedenen Bereichen 8 Tage alter *V. faba* Keimlinge isoliert, im Agarosegel aufgetrennt und die auf einer Nylonmembran geblottete RNA mit einer radioaktiv markierten *VfPTR1* cDNA-Sonde hybridisiert. Die Auswertung

zeigte, dass *VfPTR1* mRNA im gesamten Keimling nachgewiesen werden konnte. Die höchste Expression wurde in Wurzelspitzen detektiert. Des Weiteren wurden erhöhte Transkriptmengen im Hypokotyl, am Übergang zwischen Hypokotyl und Kotyledonen sowie im adaxialen Bereich der Kotyledonen gefunden.



Abb. 3.7: Northern Analyse der *VfPTR1* mRNA-Expression in 8 Tage alten *V. faba* Keimlingen.

10 µg Gesamt-RNA wurde in einem 1 %-igen Formaldehydgel aufgetrennt, auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit einem 700 bp großen, radioaktiv markierten *VfPTR1* cDNA-Fragment hybridisiert. 1 und 2: Wurzelspitze, 3: Wurzel unterer Bereich, 4: Wurzel oberer Bereich, 5: Hypokotyl, 6: Übergang Hypokotyl/Kotyledonen, 7: Kotyledonen adaxial, 8: Stängel, 9: Blattansatz, 10: Blätter, 11: Kotyledonen abaxial. Die relativen mRNA-Mengen wurden nach der Exposition mit dem Phosphorimager detektiert und mit der Software „Aida“ quantifiziert. Das stärkste Signal wurde auf 100 % gesetzt.

3.1.2 Analyse der *VfPTR1*-Promotoraktivität mittels Promotor/GUS- und Promotor/GFP-Fusionen in *Nicotiana tabacum* und *Pisum sativum*

Um zu untersuchen, in welchen Geweben *VfPTR1* exprimiert wird, sowie um bestehende *in situ* Daten zu bestätigen und zu vervollständigen, wurden Promotor-Reporterfusionen für die Expression in Pflanzen erstellt. Die Promotoraktivität kann somit an der intakten Pflanze untersucht werden. Für die Konstrukte wurde nur das im transienten Test aktive Promotorfragment A benutzt. Als Reportergene wurden das für die bakterielle β -Glucuronidase codierende *uidA*-Gen bzw. das *GFP*-Gen (green fluorescent protein) verwendet. Die enzymatische Aktivität der β -Glucuronidase lässt sich im pflanzlichen

Gewebe histochemisch mittels einer Farbreaktion nachweisen. Die Expression von GFP im Gewebe der Pflanze kann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen werden. Die Konstrukte wurden folgendermaßen erstellt: Die vollständige Expressionskassette pPTRGUS wurde mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Eco*RI aus dem Plasmid pGUS1 ausgeschnitten, die überstehenden Enden mit T4-DNA Polymerase aufgefüllt und in den mit *Sma*I (produziert glatte Enden) geschnittenen und anschließend mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierten pflanzlichen Expressionsvektor pBAR ligiert. Für das pPTRGFP-Konstrukt wurde zunächst der *PTR1*-Promotor unter Einbau der Schnittstellen *Eco*RI und *Sac*I aus dem Plasmid pCR[®]2.1-TOPO[®] mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pUC18 zwischenkloniert. Das GFP-Fragment wurde unter Einbau der Schnittstellen *Bam*HI und *Xba*I aus dem Plasmid pFF19-GFP amplifiziert und hinter die Promotorsequenz in den entsprechend geschnittenen pUC18 Vektor ligiert. Die gesamte Kassette bestehend aus Promotor und GFP wurde anschließend mit *Eco*RI und *Xba*I aus pUC18 ausgeschnitten, die Enden geglättet und in den mit *Sma*I verdauten, dephosphorylierten Vektor pBAR umkloniert. Dieser enthielt schon den ocs-Terminator. Durch *A. tumefaciens* vermittelte Transformation wurden die Fusionskonstrukte in das Genom von *N. tabacum* und *P. sativum* integriert.

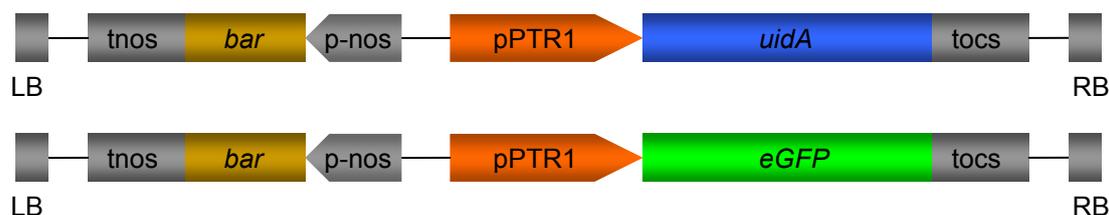


Abb. 3.8: Promotor:GUS- und Promotor:GFP-Fusionskonstrukte. LB und RB: linke und rechte Bordersequenz; p-nos und tnos: Promotor und Terminator der Nopalinsynthase; *bar*: Phosphinotricin-Acetyltransferase aus *Streptomyces hygroscopicus* (vermittelt Basta[®]-Resistenz); pPTR1: Promotorsequenz von *VfPTR1*; *uidA*: β-Glucuronidase (GUS); *eGFP*: enhanced GFP, tocs: Terminator der Octopinsynthase

Analyse der Promotoraktivität in *N. tabacum*

Für die Analyse der Promotoraktivität wurden je Konstrukt mehrere unabhängige pPTRGUS bzw. pPTRGFP *N. tabacum* Pflanzen regeneriert und auf Enzymaktivität der β-Glucuronidase bzw. Expression von GFP getestet (vgl. Material und Methoden, 2.2.11). Dabei konnte für beide Konstrukte eine Expression der entsprechenden Reportergene nachgewiesen werden. Für pPTRGUS wurde eine Blaufärbung im Stängel im Bereich des Blattansatzes sowie in jungen Wurzeln festgestellt. Wie die Abbildung 3.9 zeigt, sind die Parenchymzellen der Wurzel, die Epidermis und die Wurzelhaare markiert. Die Wurzelspitze ist nicht gefärbt, die Blaufärbung beginnt erst in der Streckungszone. Bei alten Wurzeln findet sich keine GUS-Aktivität. Im Querschnitt des Stängels ist ein Gradient ausgehend von den Parenchymzellen, die die stärkste Markierung zeigen, bis hin zur Mitte zu sehen. Das

Leitgewebe scheint nicht markiert zu sein. Nicht transgene Kontrollpflanzen zeigen keinerlei Signal.

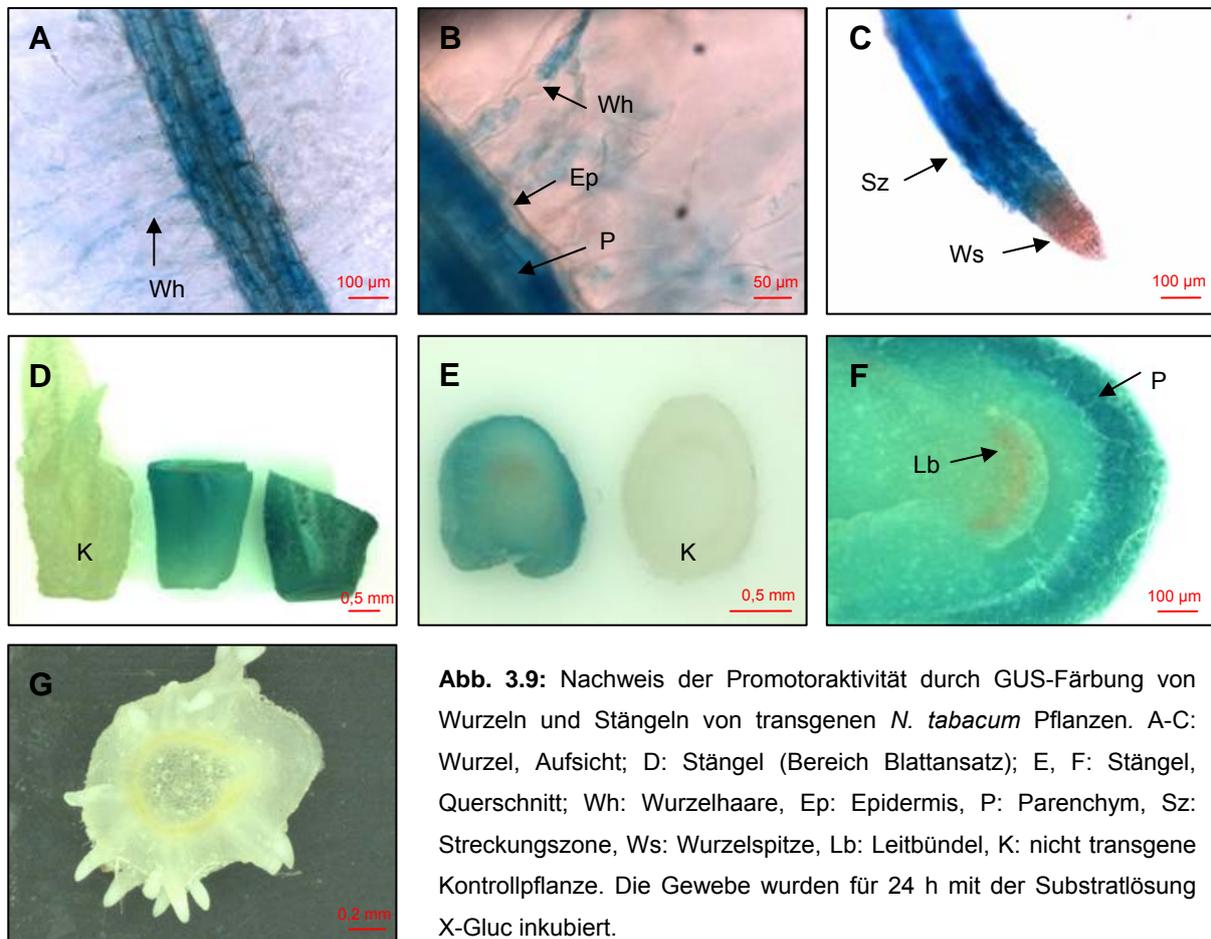


Abb. 3.9: Nachweis der Promotoraktivität durch GUS-Färbung von Wurzeln und Stängeln von transgenen *N. tabacum* Pflanzen. A-C: Wurzel, Aufsicht; D: Stängel (Bereich Blattansatz); E, F: Stängel, Querschnitt; Wh: Wurzelhaare, Ep: Epidermis, P: Parenchym, Sz: Streckungszone, Ws: Wurzelspitze, Lb: Leitbündel, K: nicht transgene Kontrollpflanze. Die Gewebe wurden für 24 h mit der Substratlösung X-Gluc inkubiert.

Bei den Promotor-GFP Tabakpflanzen wurden etwa 6 Wochen alte Keimlinge mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Bei diesen Pflanzen konnte eine GFP-Fluoreszenz in den Wurzeln nachgewiesen werden. Die Zellen, die den Zentralzylinder umgeben, waren markiert (Abb. 3.10 A+B). Die Wurzelspitze zeigte wie auch bei den GUS-Pflanzen kein Signal (Abb. 3.10 D). Eine Fluoreszenz zeigte sich erst ca. 0,5 mm hinter der Wurzelspitze (Abb. 3.10 C, schwaches Signal) in der Streckungszone. In den Wurzelhaaren und im Stängel konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Möglicherweise war das Signal zu schwach, um detektiert werden zu können.

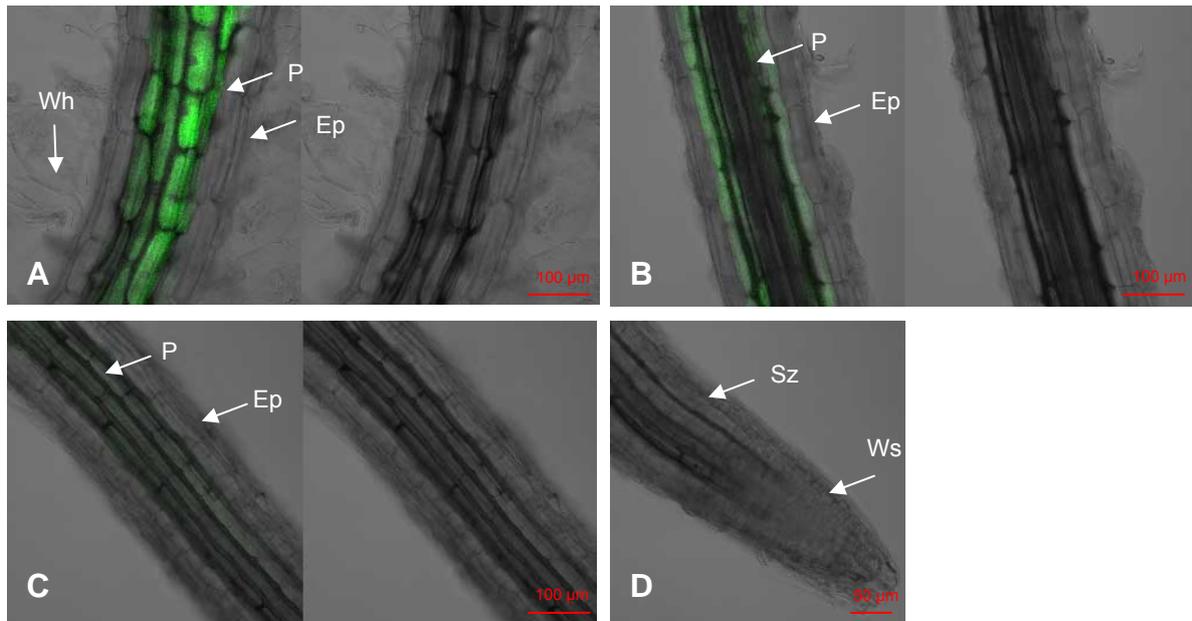


Abb. 3.10: Analyse der Promotoraktivität durch Nachweis der GFP-Fluoreszenz des pPTRGFP-Konstruktes in Wurzeln von *N. tabacum*. A-D: Wurzel Aufsicht, A, B: Wurzel mittlerer Bereich, C: Wurzel, 0,5mm hinter Spitze, D: Wurzelspitze. Links ist jeweils das Fluoreszenzbild und rechts die entsprechende Hellfeldaufnahme dargestellt. Wh: Wurzelhaare, Ep: Epidermis, P: Parenchym, Sz: Streckungszone, Ws: Wurzelspitze

Analyse der Promotoraktivität in *P. sativum*

Für eine weiterführende Promotoranalyse während der Samenentwicklung wurde als Untersuchungsobjekt *P. sativum* ausgewählt. Die Transformation und Regeneration von Erbse ist eine etablierte Methode in unserer Gruppe und sich entwickelnde Erbsensamen eignen sich aufgrund ihrer Größe sehr gut für eine Bestimmung der Gewebespezifität des *PTR1*-Promotors. Ein weiterer Vorteil ist die phylogenetische Nähe von *P. sativum* zu *V. faba*. Mit den bereits oben beschriebenen Konstrukten pPTRGUS und pPTRGFP wurden Erbsenpflanzen transformiert. Eine Regeneration transgener Pflanzen gelang aber nur für Erbsen, die mit pPTRGFP transformiert wurden, pPTRGUS-Erbsen konnten nicht erzeugt werden. Von pPTRGFP wurden insgesamt vier unabhängige Linien regeneriert, drei von ihnen verloren aber das Transgen in der T₁-Generation wieder. Somit wurden die Analysen nur mit einer Linie durchgeführt. Da von früheren Northern Analysen bekannt war, dass *VfPTR1* während der mittleren bis späten Stadien der Kotyledonenentwicklung exprimiert wird (Miranda et al., 2003), wurden Querschnitte sich entwickelnder Samen 26 DAF hinsichtlich einer GFP-Fluoreszenz untersucht (Abb. 3.11). Die Epidermis der Kotyledonen sowie angrenzende Parenchymzellen zeigten ein GFP-Signal. Die Intensität der Fluoreszenz nahm von außen nach innen kontinuierlich ab, der innere Bereich der Kotyledonen zeigte keine Fluoreszenz mehr. Auch die Samenschale war nicht markiert.

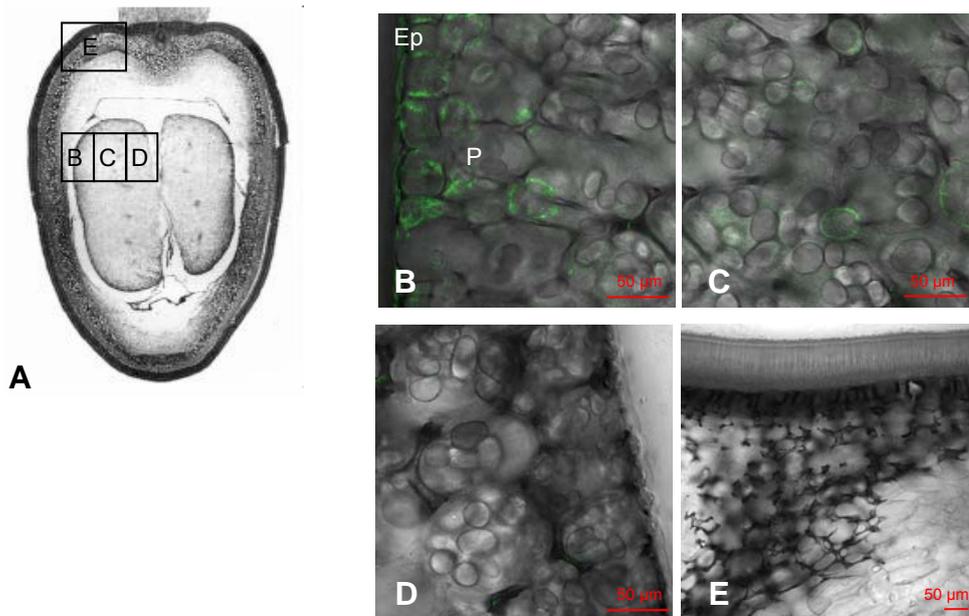


Abb. 3.11: Analyse der Promotoraktivität durch Nachweis der GFP-Fluoreszenz des pPTRGFP-Konstruktes in transgenen Samen (26 DAF) von *P. sativum*. A: Querschnitt durch einen mit Toluidinblau gefärbten Leguminosensamen (schwarz-weiß Darstellung, Übersicht), B-E: Ausschnittsvergrößerungen der in A gezeigten Bereiche; Ep: Epidermis, P: Parenchym.

3.1.3 Intrazelluläre Lokalisierung von VfPTR1

Erstellung eines GFP-Fusionskonstruktes, Expression in Protoplasten und Überprüfung der Funktionalität in Hefe

GFP eignet sich nicht nur als Reporter gen für Promotorstudien, sondern kann auch für die Erzeugung eines Fusionsproteins verwendet werden. Das Fusionsprotein behält in den meisten Fällen die Eigenschaften des zu untersuchenden Proteins, und über die Fluoreszenz des GFP kann dieses intrazellulär nachgewiesen werden. Für die Lokalisierung von VfPTR1 innerhalb der Zelle wurde zunächst eine C-terminale translationale Fusion mit GFP erstellt. Dazu wurde *VfPTR1* unter Einbau der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xba*I und gleichzeitiger Entfernung des *PTR1*-internen Stopp-Codons mittels PCR aus dem Plasmid pVfPTR1 amplifiziert. Nach der Aufreinigung aus dem Gel und anschließender *Bam*HI/*Xba*I-Restriktion wurde das Fragment in den mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pFF19-GFP einkloniert. Der korrekte Einbau des *PTR1*-Fragmentes sowie die Beibehaltung des Leserahmens am Übergang zum *GFP*-Gen wurden durch Restriktionsspaltung bzw. Sequenzierung überprüft.

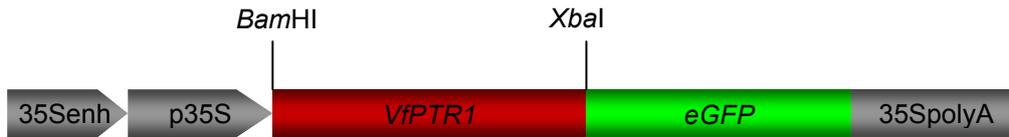


Abb. 3.12: VfPTR1GFP-Fusionskonstrukt. 35Senh, p35S: 35S-Enhancer- bzw. Promotorsequenz aus dem Blumenkohlmosaikvirus, 35SpolyA: 35S-Polyadenylierungssignal, VfPTR1GFP: VfPTR1 cDNA fusioniert an GFP, eGFP: enhanced GFP

Anschließend erfolgte die Transformation von *V. faba* Suspensionsprotoplasten. Die Isolierung und Kultivierung von *V. faba* Protoplasten aus Suspensionzellkulturen ist in unserer Gruppe etabliert. Die Verwendung von Protoplasten für die transiente Genexpression hat den Vorteil, dass die Plasmamembran nach dem Abbau der Zellwand durch bestimmte Enzyme für die zu transformierende DNA leicht zugänglich ist. Die enzymatische Isolation bewirkt eine Wundreaktion, welche die Zellen kompetent für die Aufnahme von DNA macht. Zwei Tage nach der Transformation wurden die Protoplasten auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Die Abbildung 3.13 (B und C) zeigt beispielhaft eine klare GFP-Fluoreszenz entlang der Vakuolenmembran zweier Protoplasten. Wie vor allem in der Überlagerung von Fluoreszenz- und Hellfeldaufnahme gut zu erkennen ist, war die Plasmamembran nicht markiert. In der Kontrolltransformation (A: p35S/GFP) war im Gegensatz dazu der gesamte Zytoplasmabereich sowie der Nukleus markiert. Wird GFP ohne Fusionsprotein exprimiert, ist es im Zytosol und Nukleus lokalisiert.

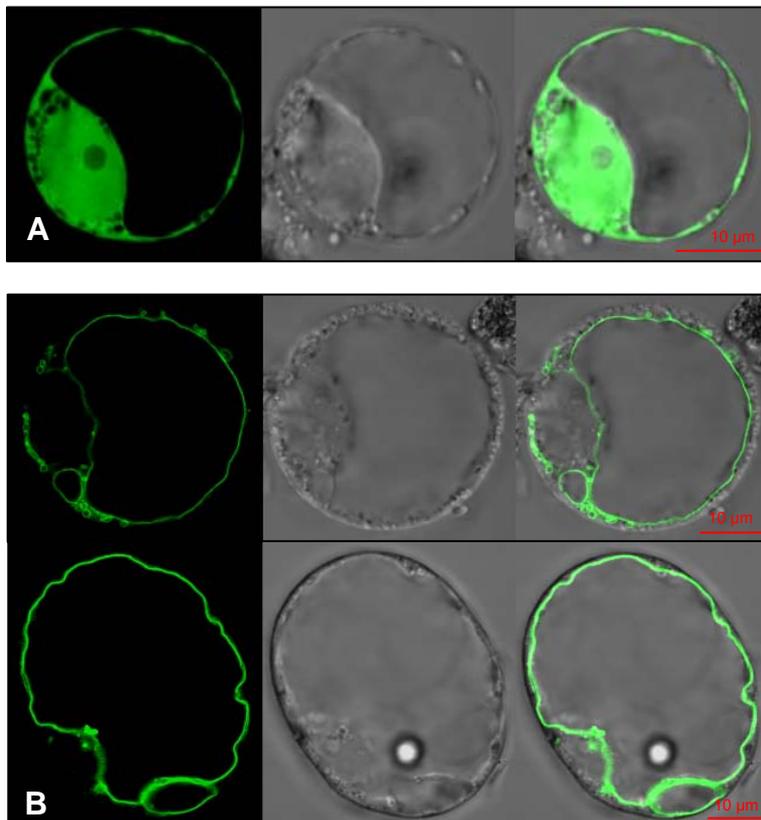


Abb. 3.13: Nachweis der GFP-Fluoreszenz des VfPTR1/GFP-Fusionsproteins an der Vakuolenmembran von *V. faba* Protoplasten. A: p35S/GFP (Kontrolle); B, C: VfPTR1GFP; links: GFP-Fluoreszenz, Mitte: Hellfeldaufnahme, rechts: Überlagerung beider Bilder. Die Protoplasten wurden nach der Transformation für 48 h bei 20°C dunkel inkubiert und anschließend mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Es wurden mehrere unabhängige Versuche mit jeweils frischem Material durchgeführt.

VfPTR1 ist ein in *S. cerevisiae* funktionell charakterisierter Peptidtransporter. Für die Komplementation einer Hefemutante mit Defekt im eigenen Peptidtransportsystem muss VfPTR1 folglich in transgenen Hefen an die Plasmamembran transportiert werden. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass PTR1 auch in der pflanzlichen Zelle in der Plasmamembran lokalisiert ist. Da die intrazelluläre Lokalisierung von VfPTR1 über eine GFP-Fusion ein anderes Bild lieferte, sollte das Fusionskonstrukt in Hefezellen transformiert und auf seine Funktionalität getestet werden. Dazu wurde es mit *Xho*I aus dem Plasmid pFF19 ausgeschnitten und in den ebenfalls *Xho*I verdauten und dephosphorylierten Hefeexpressionsvektor pDR196 kloniert.



Abb. 3.14: VfPTR1GFP-Konstrukt für die funktionelle Testung in *S. cerevisiae*. pPMA1: Promotor der Plasmamembran-ATPase 1 aus *S. cerevisiae*, VfPTR1: Peptidtransporter 1 aus *V. faba*, eGFP: enhanced GFP, t-ADH: Terminator der Alkoholdehydrogenase aus *S. cerevisiae*. Die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen sind angegeben.

Dieses Konstrukt wurde in den Hefestamm LR2 transformiert, der Mutationen in den Genen für die Histidin- und Argininpermease sowie im *PTR2*-Gen trägt. Außerdem ist er *his*-auxotroph. LR2 kann Histidin nicht selbst synthetisieren und ist nicht in der Lage auf SC-Medium zu wachsen, welches Histidin nur in Form von Dipeptiden enthält. Die transformierten Hefezellen wurden zunächst auf Minimalmedium ohne Uracil (SD-ura), aber unter Zusatz von 20 mM Histidin ausplattiert. Als Selektionsmarker diente das *ura3*-Gen, das sich ebenfalls auf dem Plasmid pDR196 befindet. Zwei unabhängige Kolonien wurden auf nicht-selektivem und selektivem Medium ausgestrichen. Das Selektivmedium enthält das Dipeptid His-Ala als einzige Quelle für Histidin. Wie in der Abbildung 3.15 zu erkennen ist, waren AtPTR2 und VfPTR1 (Positivkontrollen) in der Lage, die Mutation zu komplementieren und die Hefezellen konnten His-Ala als Histidinquelle verwenden. Hefezellen, die mit dem PTR1GFP-Fusionskonstrukt transformiert wurden, zeigten hingegen kein Wachstum auf dem Selektivmedium. Folglich komplementiert PTR1GFP die Mutation nicht.

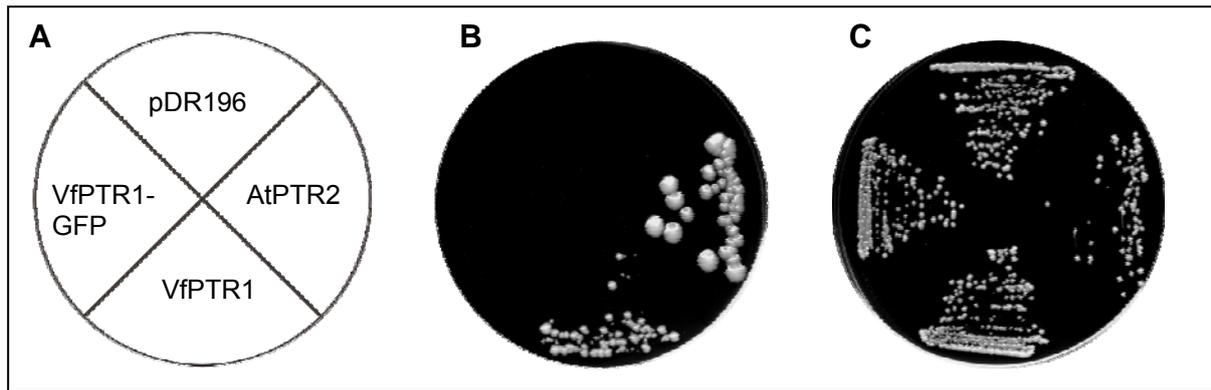


Abb. 3.15: Funktionelle Komplementation des *S.cerevisiae* Stammes LR2 durch VfPTR1. A: Ausstreich-Schema; B: Selektives Wachstum der Hefekolonien, die die cDNAs von *AtPTR2*, *VfPTR1* (Positivkontrollen), *VfPTR1GFP* oder den Leervektor pDR196 (Negativkontrolle) tragen, auf SC-Medium mit 20 mM His-Ala; C: nicht-selektives Wachstum auf SC-Medium mit 20 mM Histidin.

Integration eines c-myc-tag in die PTR1-Sequenz und Lokalisation mit anti-c-myc

Antikörpern

Da die Lokalisierungsversuche mit GFP ein anderes Ergebnis lieferten als zunächst erwartet und das VfPTR1GFP-Fusionsprotein nicht mehr funktionell ist, wurden weitere Strategien angewandt, um VfPTR1 intrazellulär zu lokalisieren. Das *c-myc* Peptid ist ein aus 10 As bestehender *tag*, der C- oder N-terminal an die cDNA-Sequenz seiner Zielgene angehängt oder *in frame* in die Sequenz eingebaut werden kann. Der spezifisch gegen dieses Epitop gerichtete murine Antikörper 9E10 erlaubt den immunologischen Nachweis des Fusionsproteins innerhalb der Zelle. Da der *c-myc* tag nur 10 As groß ist, sollte er sich wenig störend auf die Konformation und Funktionalität des zu untersuchenden Proteins auswirken. Die Analyse der Aminosäuresequenz mit Programmen für die Vorhersage der Membrantopologie von Proteinen (<http://us.expasy.org>) ergab, dass VfPTR1 ein Transmembranprotein mit wahrscheinlich zehn membrandurchspannenden Domänen ist (Abb. 3.16). N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Zwischen Helix 4 und 5 befindet sich ein *loop* von 100 As Länge, der wahrscheinlich zur zytoplasmatischen Seite des Proteins gerichtet ist. Von den Saccharosetransportern aus Arabidopsis ist bekannt, dass ein solcher *loop* nicht für die Funktionalität des Proteins in mit diesen Transportern transformierten Hefezellen notwendig ist (Meyer et al., 2000). Für das folgende Experiment sollte daher der *c-myc* tag in den intrazellulären *loop* von *VfPTR1* kloniert werden.

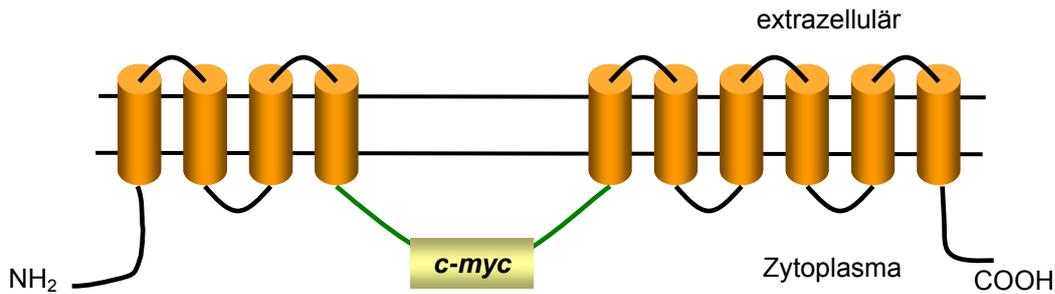


Abb. 3.16: Putative Transmembrandomänen des VfPTR1 Transporters. NH₂: Aminoterminus, COOH: Carboxyterminus, *c-myc*: aus 10 Aminosäuren bestehender tag. Die membranspannenden Domänen sind orange, der loop grün dargestellt.

Eine innerhalb des *loop* gelegene *SacI*-Schnittstelle wurde für die Klonierung verwendet. Zwei *c-myc* Oligonukleotide mit *SacI*-Schnittstellen an beiden Enden wurden unter Beibehaltung des *VfPTR1* Leserahmens synthetisiert. Anschließend wurden beide Einzelstränge zu einem Doppelstrang hybridisiert und mit *SacI* geschnitten. Es wurden zwei Konstrukte hergestellt, zum einen für die intrazelluläre Lokalisierung von VfPTR1 in Protoplasten und zum anderen für die funktionelle Testung im Hefestamm LR2. *VfPTR1* wurde zunächst unter Einbau der Schnittstellen *NcoI* und *XbaI* mittels PCR amplifiziert, mit den genannten Restriktionsenzymen gespalten und in den ebenso geschnittenen Vektor pRT103 ligiert. Durch *NcoI/XbaI*-Spaltung verliert pRT103 dabei seine interne *SacI*-Schnittstelle. pRT103 enthält den 35S Promotor und das 35S Polyadenylierungssignal und kann für die Transformation von Protoplasten verwendet werden. Das so entstandene Plasmid VfPTR1/pRT103 wurde anschließend mit *SacI* geschnitten und dephosphoryliert, um das ebenfalls *SacI* geschnittene *c-myc* Peptid einzuklonieren. Für die Ligation wurden Plasmid und *c-myc* Fragment in unterschiedlichen molaren Verhältnissen eingesetzt (1:1, 1:3 und 1:10). Das so entstandene Plasmid pVfPTR1c-myc wurde mittels Sequenzierung auf einen korrekten Einbau des *c-myc tag* mit einem durchgängigen Leserahmen überprüft. Für das Konstrukt zur Expression in Hefe wurde VfPTR1c-myc mit *NcoI/XbaI* aus pRT103 ausgeschnitten, die Enden mit T4 Polymerase geglättet und in den mit *SmaI* gespaltenen Hefeexpressionsvektor pDR196 ligiert.

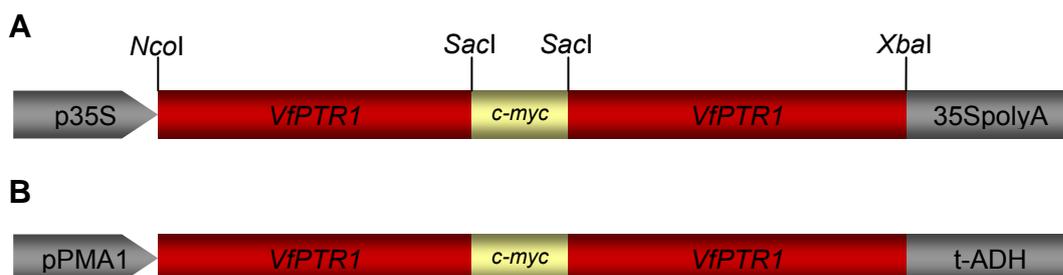


Abb. 3.17: VfPTR1c-myc Konstrukte für die Expression in Protoplasten (A) bzw. *S. cerevisiae* (B). p35S, 35SpolyA: 35S Promotor und Terminator des Blumenkohlmosaikvirus; VfPTR1: Peptidtransporter 1 aus *V. faba*; c-myc: DNA-Sequenz des c-myc Peptids, pPMA1: Promotor der Plasmamembran-ATPase 1 aus *S. cerevisiae*; t-ADH: Terminator der Alkoholdehydrogenase aus *S. cerevisiae*. Die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen sind angegeben.

Die Hefemutante LR2 wurde anschließend mit dem VfPTR1c-myc-Konstrukt transformiert und die erhaltenen Kolonien wurden selektiv ausgestrichen. Wie in der Abbildung 3.18 zu erkennen ist, können Hefezellen, die mit VfPTR1c-myc transformiert wurden, auf dem Selektivmedium mit 15 mM His-Ala wachsen, die PTR2-Mutation des LR2-Stammes wird komplementiert. Die Positivkontrollen VfPTR1 und AtPTR2 komplementieren die Mutation ebenfalls, VfPTR1GFP ist, wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, nicht funktionell.

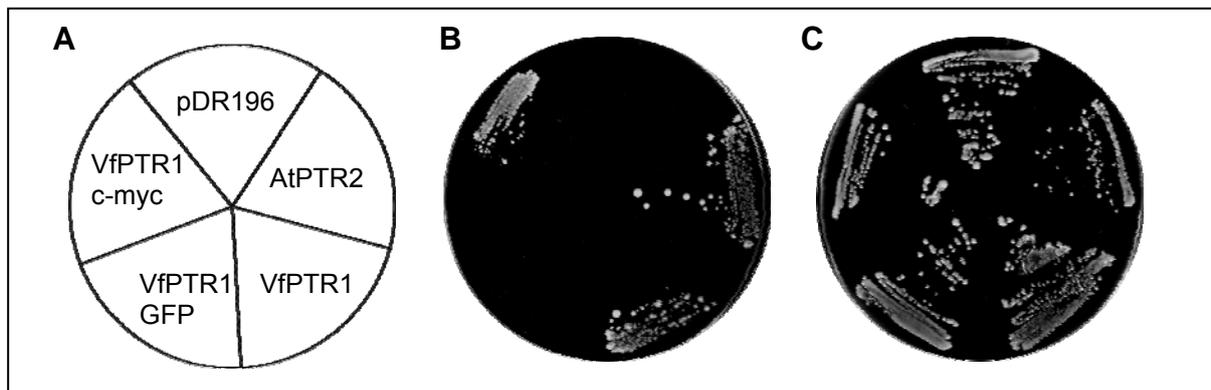


Abb. 3.18: Funktionelle Komplementation des *S.cerevisiae* Stammes LR2 durch VfPTR1c-myc. A: Ausstreich-Schema; B: Selektives Wachstum der Hefekolonien, die die cDNAs von *AtPTR2*, *VfPTR1* (Positivkontrollen), *VfPTR1GFP*, *VfPTR1c-myc* oder den Leervektor pDR196 (Negativkontrolle) tragen, auf SC-Medium mit 15 mM His-Ala; C: nicht-selektives Wachstum auf SC-Medium mit 20 mM Histidin.

Das Plasmid pVfPTR1c-myc wurde durch PEG vermittelte Transformation in *V. faba* Protoplasten übertragen und diese dann 24 h dunkel inkubiert. Anschließend wurden die Protoplasten fixiert und eingebettet. Das VfPTR1c-myc Fusionsprotein sollte mittels anti-c-myc Antikörper und Immunogoldmarkierung nachgewiesen werden. Bei den Experimenten stellte sich allerdings heraus, dass keine Aussage über die intrazelluläre Lokalisierung von VfPTR1 gemacht werden kann. Die Protoplasten reagierten sehr empfindlich auf die Fixierung und Einbettung und sind zum Teil plasmolysiert, d. h. sie haben ihre typische runde Struktur verloren. Intrazelluläre Strukturen waren kaum erkennbar. Es gab zwar Goldmarkierungen an Membranstrukturen, aber der Membrantyp konnte nicht näher bestimmt werden. Außerdem waren auch andere Bereiche der Protoplasten markiert (Daten nicht gezeigt).

Herstellung eines Peptidantikörpers gegen VfPTR1

Eine alternative Strategie zur intrazellulären Lokalisierung von VfPTR1, die parallel zu den Versuchen mit dem *c-myc tag* durchgeführt wurde, war die Immunlokalisierung mittels Peptidantikörper. Der Peptidantikörper kann für die Lokalisierung *in planta* verwendet werden, eine Transformation und transiente Expression des Transgens ist somit nicht notwendig. Aus der Aminosäuresequenz von VfPTR1 wurden zwei hydrophile Peptidsequenzen vom N- bzw. C-Terminus (14 bzw. 15 As lang) abgeleitet, da diese als besonders immunogen eingestuft worden (Epitopanalyse nach (Parker et al., 1986)). Außerdem wiesen beide Sequenzen keine (N-Terminus) bzw. nur sehr geringe Homologien zu anderen Proteinen auf. Die beiden Peptide wurden anschließend von der Firma Pineda-Antikörper-Service synthetisiert, an das Glykoprotein *Keyhole limpet Hemocyanin* (KLH) gekoppelt und als Peptidcocktail für die Immunisierung von drei Kaninchen verwendet.

```

1  MGSVEDDSSRLEEALIQDEESKLYTGDGSVDFKGRPVLKKNTGNWKACPFILGNECCERLAYYGIATNLV
71  TYLTRKLHEGNVSAARNVTTWQGTCYLAPLIGAVLADSYWGRYWTIAIFSMIYFIGMGTLTLSASIPALK
141 PAECLGAVRPPATPAQYAVFFIGLYLIALGTGGIKPCVSSFGADQFDDTDSRERVKKGSFFNWFYFSINI
211 GALISSSFIVWIQENAGWGLGFGIPALFMGLAIGSFFLGTPLYRFQKPGGSPLTRMCQVVAASFRKRNLT
281 VPEDSSLLYETPKSSAIEGSRKLQHSDELRCLDRAAVISDDERKRGDYSNLWRLCTVTQVEELKILIRM
351 FPVWATGIVFSAVYAQMSTMFVEQGTMMDTSVGSFKIPAASLSTFDVISVIFWVVPVYDRFIVPIARKFTG
421 KERGFSELQRMGIGLFISVLCMSAAAIVEIKRLQLAKELDLVDKAVPVPLTIFLQIPQYFLLGAAEVFTF
491 VGQLEFFYDQSPDAMRSLCSALSLLTTSLGNYLSSFILTAVLYFTTRGGNPGWIPDNLNKGHLDYFFWLL
561 AGLSFLNMFLYIVAAKRYKSKKAS

```

Abb. 3.19: Aminosäuresequenz des Peptidtransporters VfPTR1. Die für die Synthese der Peptide verwendeten Bereiche sind rot dargestellt. Mögliche N-Glykosylierungsstellen sind grau hinterlegt.

Serumproben der Kaninchen wurden nach dem 61., 90., und 115. Immunisierungstag entnommen und im Vergleich mit Präimmunseren im Western Blot getestet. Für den Western Blot wurden Proteinextrakte aus *V. faba* Keimlingswurzeln und Suspensionszellkulturen verwendet, da bekannt war, dass VfPTR1 auf mRNA-Ebene in diesen Geweben exprimiert wird. Das Serum von Tier 1 zeigte die beste Reaktion und das entsprechende Präimmunserum die geringsten Kreuzreaktionen, so dass nach dem 115. Immunisierungstag das gesamte Serum dieses Tieres gewonnen wurde. Das Antiserum wurde zunächst mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung gefällt und anschließend gegen die synthetisierten Peptide über eine Säule affinitätsgereinigt.

Für den Western Blot mit dem affinitätsgereinigten Serum wurden Proteinrohextrakte aus 100 mg *V. faba* Keimlingswurzeln und Suspensionszellkulturen hergestellt. In der Nachweisreaktion wurde der anti-VfPTR1-Antikörper auf seine Spezifität untersucht. Das VfPTR1-Protein hat ein theoretisch berechnetes Molekulargewicht von 64 kDa. Wie in Abbildung 3.20 zu erkennen ist, wurden in den *V. faba* Suspensionszellkulturextrakten zwei Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 55 und 28 kDa und in den Wurzelextrakten drei Banden mit 72, 55 und 28 kDa detektiert. Somit könnte die 55 kDa Bande dem VfPTR1-

Protein entsprechen (Abb. 3.20, roter Pfeil). Dass das im Western Blot beobachtete Molekulargewicht unter dem theoretisch errechneten Wert liegt, wird bei Membranproteinen häufig beobachtet und beruht auf deren hoher Lipophilität. Die stärkste Intensität hat die Bande bei etwa 28 kDa. Die Bande bei 72 kDa tritt nur in Extrakten der Keimlingswurzel auf, nicht aber in den Suspensionsextrakten, somit ist dies möglicherweise eine unspezifische Reaktion des Antikörpers. Von den beiden OVA-gekoppelten Peptiden, die als Positivkontrolle aufgetragen wurden, wurde nur das N-terminale Peptid durch den Antikörper erkannt.

Um die Spezifität des Antiserums weiter zu untersuchen, wurden zusätzlich Konkurrenzexperimente mit den Peptiden mittels Western Blot durchgeführt. Dazu wurde der anti-VfPTR1-Antikörper mit 20 µg/ml OVA-konjugierten Peptiden vorinkubiert, um spezifische Bindungsstellen abzusättigen. Diese Konzentration reichte aus, um eine detektierbare Bindung bei einem Molekulargewicht von 55 kDa zu verhindern. Die anderen beiden Banden bei 72 kDa (Wurzelextrakt) und 28 kDa sind noch vorhanden. Somit scheint nur die Bande auf der Höhe von 55 kDa spezifisch für VfPTR1 zu sein. Da die 28 kDa Bande von sehr starker Intensität ist, reichte hier womöglich die eingesetzte Konzentration bei der Vorinkubation nicht aus, um das Signal sichtbar zu verringern.

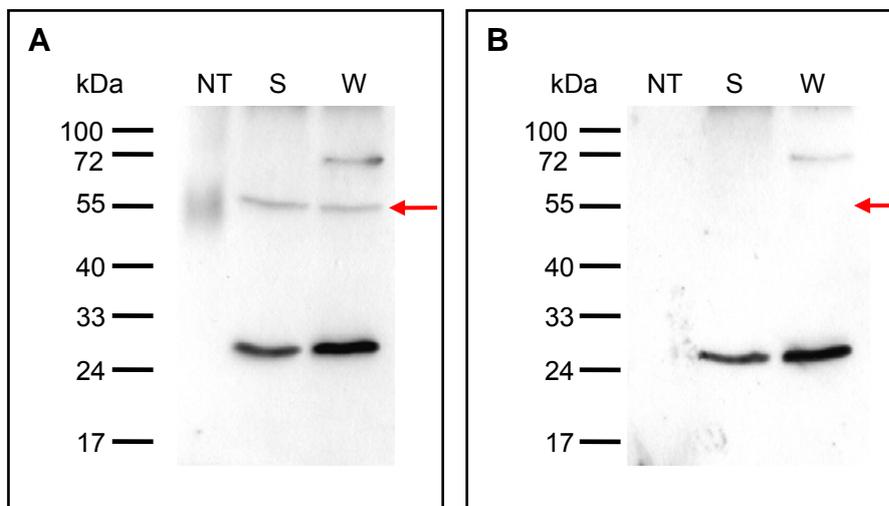


Abb. 3.20: Western Analysen mit anti-VfPTR1 Antiserum.

A: 20 µl Proteinrohextrakt aus *V. faba* Suspensionskulturzellen und Keimlingswurzeln bzw. 20 ng des OVA-Peptids wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran überführt und mit dem gereinigten anti-VfPTR1 Antiserum (1:1000) inkubiert. Die Bindung des Antikörpers wurde durch Inkubation mit einem anti-Kaninchen IgG Antikörper mit Peroxidaseaktivität detektiert.

B: Dieselben Proteinextrakte wurden mit dem anti-VfPTR1 Antiserum (1:1000) analysiert, welches mit den OVA-konjugierten Peptiden vorinkubiert wurde (Endkonzentration der Peptide: 20 µg/ml in Blockierlösung, Inkubation 2 h bei RT). NT: Peptid vom N-Terminus, S: Suspensionszellkultur, W: Keimlingswurzel

Lokalisierung mittels Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von VfPTR1 wurden *V. faba* Suspensionszellkulturen in einem Gemisch aus Paraformaldehyd und Glutaraldehyd fixiert und anschließend in das Harz HM20 eingebettet. Die Polymerisation erfolgte in Gelatinekapseln. Für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden Semidünnschnitte der eingebetteten Proben angefertigt und mit dem anti-VfPTR1 Antikörper inkubiert. In der Nachweisreaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 568 (Abb. 3.21 A) konnte eine deutliche Markierung im Bereich der Zellwände gezeigt werden. Zusätzlich scheint aber auch der Zellkern markiert zu sein. Bei Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa 488 (Abb. 3.21 B) konnte nur eine diffuse Verteilung der Fluoreszenz entlang der Plasmamembran beobachtet werden. Es gab aber auch Signale im Zellinneren.

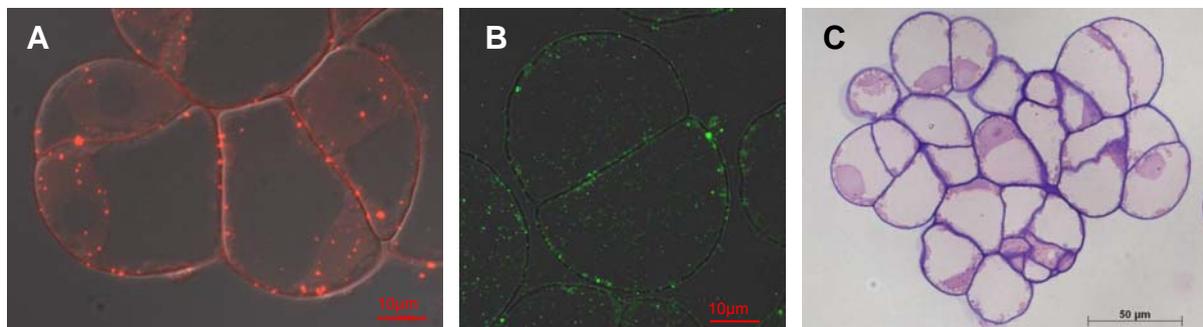


Abb. 3.21: Immunlokalisierung von VfPTR1 in Schnitten von *V. faba* Suspensionszellkulturen. Die Semidünnschnitte wurden mit dem gereinigten anti-VfPTR1 Antiserum (1: 50), gefolgt von einem anti-Kaninchen IgG, der an einen Fluoreszenzfarbstoff (Alexa 568, Alexa 488) gekoppelt ist, inkubiert. Die rote (A) bzw. grüne Fluoreszenz (B) weist auf VfPTR1 hin. C: Färbung der Schnitte mit Lugolscher Lösung.

Für die Untersuchungen am Transmissionselektronenmikroskop wurden Ultradünnschnitte von den fixierten und eingebetteten Proben (s.o.) angefertigt. Die Strukturhaltung der Suspensionszellen war nicht optimal, vor allem bei geringeren Vergrößerungen waren wellenartige Bereiche im Präparat zu sehen. Dies schien aber auf die Antikörperreaktion keinen Einfluss zu haben. Somit konnte nach der Inkubation mit dem anti-VfPTR1 Antikörper eine spezifische Markierung detektiert werden. Mit Hilfe der Immunogoldmarkierung gelang es, VfPTR1 an der Plasmamembran zu lokalisieren (Abb. 3.22 A-C). Der anti-VfPTR1 Antikörper zeigte eindeutige, spezifische Signale entlang der inneren Seite der Zellwand. Bei dieser Struktur handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die Plasmamembran. Die Hintergrundmarkierung war sehr gering, im Zytoplasma sowie an inneren Membranstrukturen wurden nur sehr wenige Goldpartikel gefunden. Im Kontrollexperiment mit Präimmunserum zeigte sich keine Markierung (Abb. 3.22 D).

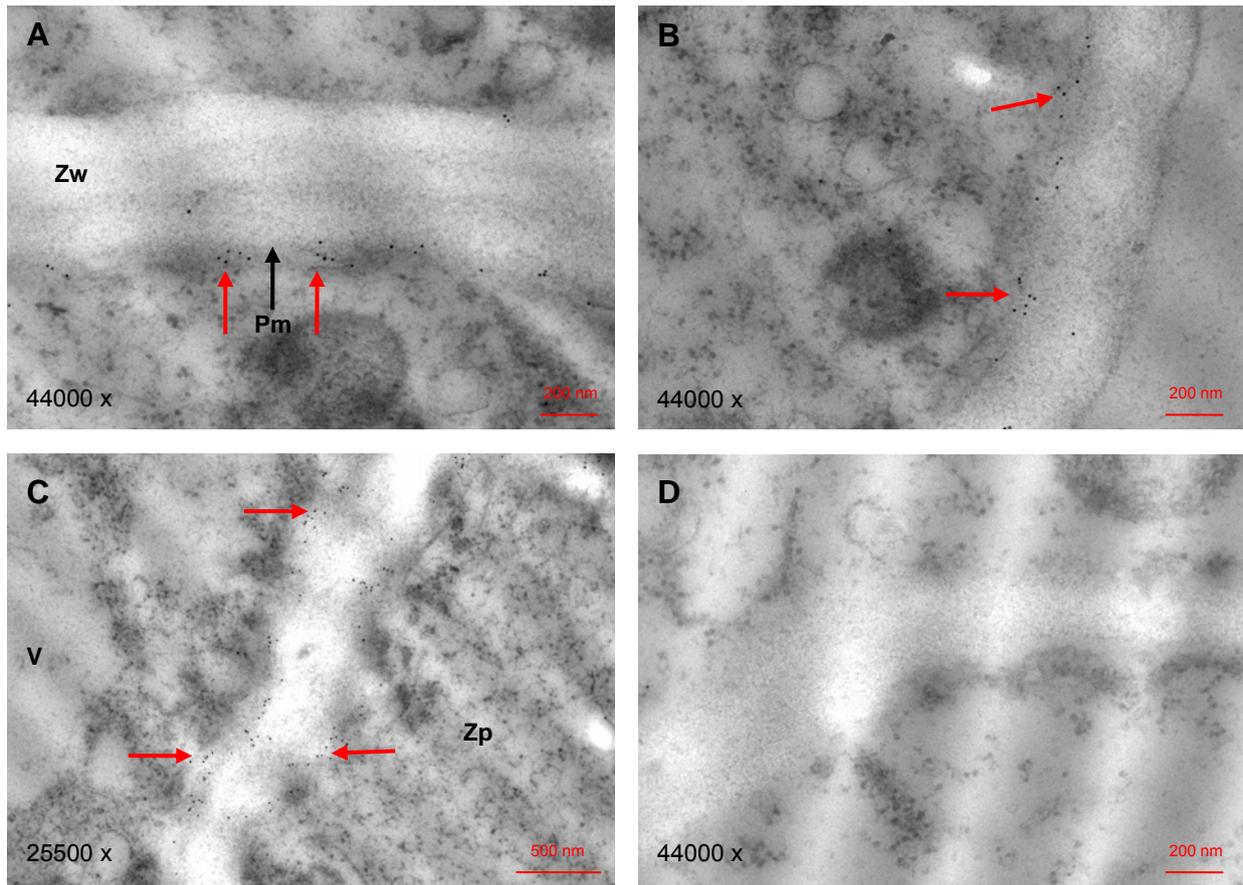


Abb. 3.22: Immunogoldmarkierungen von *V. faba* Suspensionsgewebekulturzellen mittels anti-VfPTR1 Antikörper. Die Ultradünnschnitte wurden nacheinander mit dem anti-VfPTR1 Antikörper (1:50; A-C) bzw. dem Präimmunserum (1:50; D), gefolgt von einem Gold-markierten anti-Kaninchen IgG (1:30) inkubiert. Rote Pfeile markieren beispielhaft spezifische Signale entlang der Plasmamembran. Zw: Zellwand, Pm: Plasmamembran, V: Vakuole, Zp: Zellplasma. Die Vergrößerungen sind in den jeweiligen Bildern angegeben.

3.1.4 Phloemspezifische Expression der Aminosäurepermease VfAAP1 und des Peptidtransporters VfPTR1 in *P. sativum*

VfAAP1 und VfPTR1 sind funktionell charakterisierte N-Transporter aus *V. faba*. Die Überexpression von VfAAP1 unter Kontrolle des samenspezifischen *LeB4*-Promotors führt zu einer Erhöhung des Proteingehaltes in den Samen von *V. narbonensis* und *P. sativum* (Rolletschek et al., 2005). In diesem Teil der Arbeit sollten beide Transporter unter Kontrolle eines phloemspezifischen Promotors in Erbse exprimiert werden. Dazu wurde mir der Promotor des Saccharosetransporters 2 aus Arabidopsis (*AtSUC2*) von der Arbeitsgruppe N. Sauer (Erlangen) zur Verfügung gestellt. Dieser Promotor ist in den Geleitzellen des Phloems aktiv. *AtSUC2* zeigt die höchste Expression in *source*-Blättern, wird aber auch in *sink*-Blättern und Wurzeln exprimiert (Truernit and Sauer, 1995). Da der *AtSUC2*-Promotor auch in einem heterologen System (*N. tabacum*) deutliche Aktivitäten zeigte (Wright et al.,

2003), wurde angenommen, dass dies auch auf *P. sativum* anwendbar ist. VfAAP1 und VfPTR1 sind möglicherweise an der aktiven Phloembeladung beteiligt. Die Expression von VfAAP1 und VfPTR1 unter Kontrolle eines phloemspezifischen Promotors könnte die Translokation von Aminosäuren und Peptiden in das Phloem erhöhen und damit die Beladung des Phloems verbessern. Dadurch soll indirekt auch die Versorgung der wachsenden Samen mit N-Metaboliten gesteigert werden, was sich in einem höheren Proteingehalt der reifen Samen ausdrücken kann.

Vektorkonstruktion für die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte

Pflanzentransformation

Die Überexpressionskonstrukte pSucAAP und pSucPTR wurden zunächst in das Plasmid pBluescript SK⁻ subkloniert. Ein 2128 bp großes DNA-Fragment des *AtSUC2*-Promotors wurde mittels PCR unter Einbau der Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Bam*HI aus genomischer DNA von *A. thaliana* amplifiziert. Nach der Aufreinigung aus dem Gel wurde es mit den genannten Enzymen geschnitten und in den ebenfalls *Xba*I/*Bam*HI gespaltenen und mit SAP dephosphorylierten Vektor pBluescript SK⁻ ligiert. Eine Sequenzierung des erhaltenen Plasmids bestätigte, dass die korrekte *AtSUC2*-Promotorsequenz amplifiziert wurde. Die 1590 bp lange vollständige VfAAP1 cDNA wurde mit *Eco*RI/*Xho*I aus dem Plasmid pVfAAP1 ausgeschnitten und in den genauso geschnittenen Vektor pBluescript SK⁻, der bereits den *AtSUC2*-Promotor enthielt, ligiert. Die 2028 bp lange cDNA von VfPTR1 wurde mit *Bam*HI/*Xho*I aus pVfPTR1 ausgeschnitten und auch in den *AtSUC2*-enthaltenden pBluescript SK⁻ (*Bam*HI/*Xho*I geschnitten) kloniert. Die korrekte Orientierung der Fragmente wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Die gesamte Expressionskassette wurde dann in den Binärvektor pBAR umkloniert, um das Konstrukt in Agrobakterien und schließlich in Erbse transformieren zu können. Als Terminator wurde für beide Konstrukte die 3'-Region des Octopinsynthase-Gens (*ocs*) verwendet. Das entsprechende, 760 bp lange Fragment wurde dazu mit *Bam*HI/*Hind*III aus dem Plasmid pLePocs ausgeschnitten und in den ebenso verdauten Binärvektor pBAR kloniert. Dadurch entstand das Plasmid pBAR-ocs. Die Expressionskassetten pAtSUC2VfAAP1 und pAtSUC2VfPTR1 wurden mit *Xba*I/*Xho*I aus pBluescript SK⁻ ausgeschnitten, die Enden mit T4-Polymerase geglättet und die Fragmente anschließend in den mit *Sma*I gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pBAR-ocs kloniert. Der richtige Einbau der Fragmente wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt. Die so entstandenen Plasmide wurden in den *A. tumefaciens* Stamm EHA105 transformiert und anschließend in *P. sativum* L. cv Erbi bzw. Eiffel überführt.

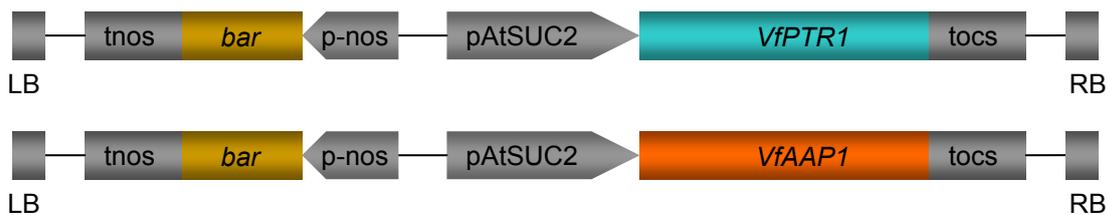


Abb. 3.23: Konstrukte für die phloemspezifische Expression von *VfAAP1* und *VfPTR1* in *P. sativum*. LB und RB: linke und rechte Bordersequenz, p-nos und tnos: Promotor bzw. Terminator der Nopalinsynthese, *bar*: Phosphinotricin-Acetyltransferase aus *Streptomyces hygrosopicus*, (vermittelt Basta[®]-Resistenz), pAtSUC2: Promotor des Saccharosetransporters 2 aus *A. thaliana*, *VfPTR1*: Peptidtransporter 1 aus *V. faba*, *VfAAP1*: Aminosäurepermease 1 aus *V. faba*, tocs: Terminator der Octopinsynthese

Charakterisierung der transgenen Pflanzen *sucAAP* und *sucPTR*

Der für die Transformationen verwendete Binärvektor pBAR trägt als Selektionsmarker das *bar*-Gen, welches die Selektion transgener Pflanzen mit Phosphinotricin (Basta[®]) erlaubt. Für *sucAAP* wurden 20 unabhängige Erbsenpflanzen regeneriert, von denen 18 mittels PCR unter Verwendung von Primern aus der Promotor- und cDNA-Sequenz positiv getestet wurden. Für *sucPTR* konnten insgesamt elf Pflanzen regeneriert werden, acht von ihnen waren PCR-positiv. Zusätzlich wurden einzelne Blätter der Pflanzen mit dem Herbizid Basta[®] bestrichen, um resistente Pflanzen zu identifizieren. Um die Kopienanzahl des Transgens im Genom der selektierten Pflanzen zu bestimmen, wurden Southern Blot Analysen durchgeführt und anschließend mit Pflanzen, die nur eine Insertion tragen, weitergearbeitet. Mittels Segregationsanalyse in der T₁ und T₂ Generation konnten homozygote Linien identifiziert werden, die dann im Folgenden für Analysen verwendet wurden. Bei den *sucPTR*-Pflanzen tragen die Linien 15 und 37 zwei Kopien des *VfPTR1*-Transgens, fünf Linien weisen eine Kopie auf (vgl. Abb. 3.24 A). Bei den Linien (35, 36, 38, 39) scheint sich der Integrationsort des Transgens im Genom nicht zu unterscheiden. Die Linien *sucPTR*-31, -35 und -38 wurden nach der Segregationsanalyse für weiterführende Analysen ausgewählt, da diese bereits in der T₂-Generation homozygot waren. Mit den *sucAAP*-Pflanzen wurde eine Segregationsanalyse der Linien 1-12 gemacht, die später regenerierten Linien wurden aus Zeitgründen nicht analysiert. Von diesen 12 regenerierten Linien waren 10 in der T₀-Generation PCR- und Basta-positiv. Die Analyse der folgenden Generation zeigte, dass vier Linien das Transgen verloren hatten, alle Nachkommen reagierten sensitiv auf ein Bestreichen der Blätter mit Basta[®] und waren PCR-negativ. Für die weitere Segregationsanalyse wurden die Linien 5, 6, 7, 8 und 12 verwendet. Die Linien 5, 7 und 8 tragen eine Kopie des *VfAAP1*-Transgens, wobei Nr. 7 und 8 wahrscheinlich einen identischen Integrationsort haben. Linie 6 weist zwei Insertionen auf und Linie 12 drei bis vier *VfAAP1*-Kopien (vgl. Abb. 3.24 B).

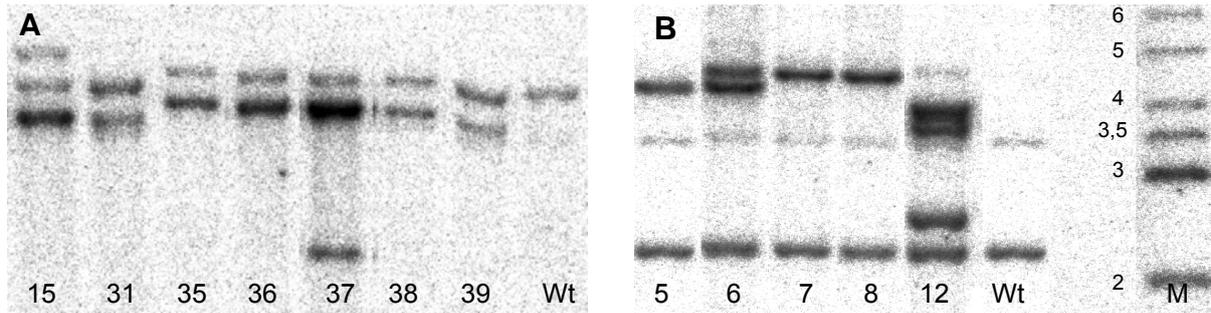
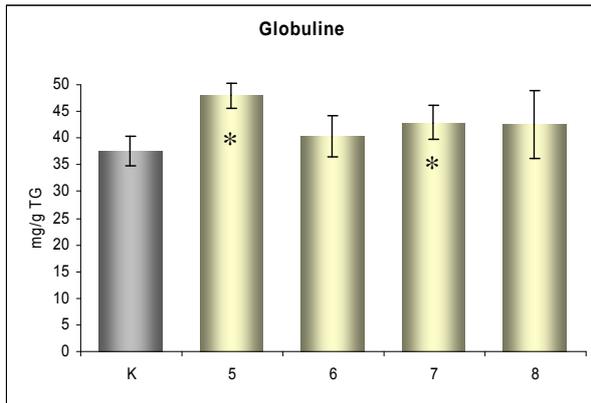
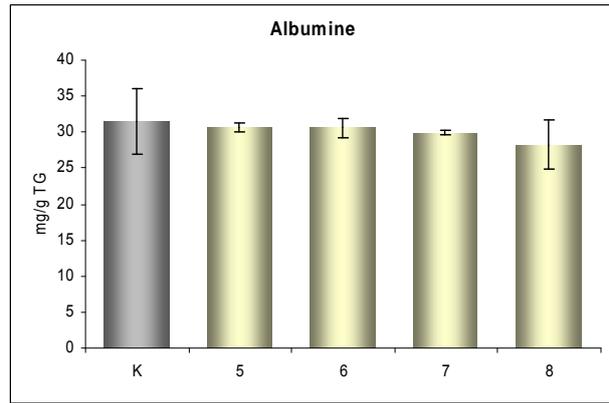
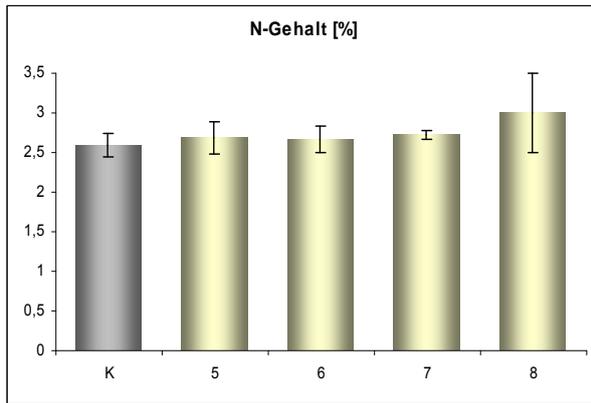


Abb. 3.24: Southern Analysen der sucPTR (A) und sucAAP (B) Erbsenpflanzen. 10 µg genomische DNA aus Blättern wurde mit *EcoRV* (sucPTR) bzw. *HindIII* (sucAAP) geschnitten, auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten von *VfPTR1* bzw. *VfAAP1* hybridisiert. Die Membran wurde ü/N exponiert und die Signale mit dem Phosphorimager detektiert.

Bereits die Samen der T_2 -Generation wurden einer ersten Analyse hinsichtlich Stickstoff- und Speicherproteingehalt unterzogen, um interessante Linien zu identifizieren, die weitergeführt und mit denen alle nachfolgenden Analysen gemacht werden sollten. Die Samen der sucAAP Pflanzen zeigten keine Unterschiede im N-Gehalt im Vergleich zu nicht transgenen Kontrollpflanzen. Der Globulingehalt war in den Linien 5 und 7 signifikant erhöht (Abb. 3.25 A) wohingegen die Albuminfraktion unverändert blieb. Aufgrund der Hinweise, dass die Linie sucAAP 5 einen höheren Proteingehalt in den Samen hat und dieser Effekt deutlicher ist als in Linie 7, wurde entschieden, nur mit dieser Linie weiterzuarbeiten.

Ähnlich war die Situation auch bei den sucPTR-Pflanzen. Zwei Linien (35 und 31, Abb. 3.25 B) zeigten eine Erhöhung der Globuline, wohingegen der Stickstoffgehalt nicht signifikant geändert war. Es wurden zwei verschiedene Wildtypkontrollen mitgeführt, Eiffel und Erbi, da transgene Pflanzen verschiedener Kultivare regeneriert wurden. Die Linien 35 und 38 gehören der Sorte Eiffel an und die Linie 31 der Sorte Erbi. In den nachfolgenden Generationen wurde nur mit der Linie 31 weitergearbeitet, da hier die Erhöhung im Globulingehalt am deutlichsten war und diese Linie außerdem als erste homozygot vorlag.

A: sucAAP



B: sucPTR

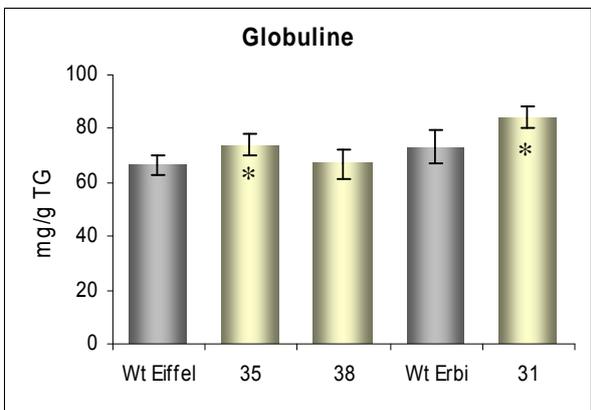
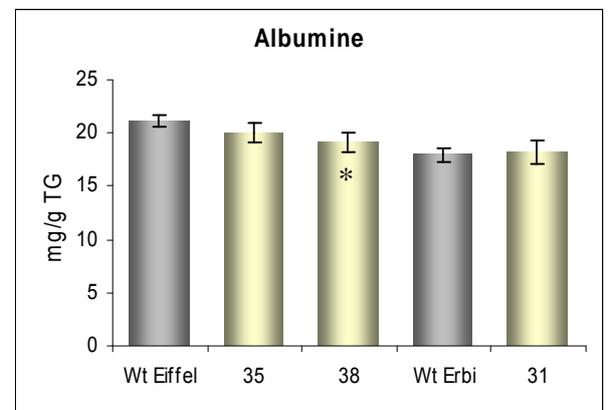
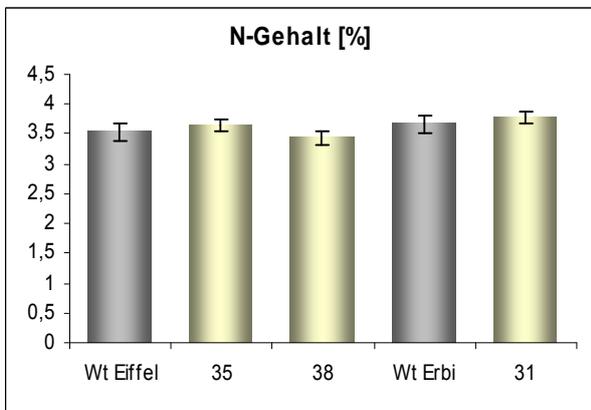


Abb. 3.25: Analyse des N- und Speicherprotein-
 gehaltes in sucAAP (A) und sucPTR (B) Samen. Der
 Proteingehalt ist in mg/g Trockengewicht (TG)
 angegeben. K: nicht transgene Kontrollpflanzen.
 Statistisch signifikante Änderungen ($p \leq 0,05$)
 sind durch Sterne gekennzeichnet.

Um die Expression von *VfAAP1* bzw. *VfPTR1* unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors zu überprüfen, wurden RT-PCR Analysen gemacht. Dazu wurde von je fünf Pflanzen einer homozygoten Linie ein *source*-Blatt (4. DAF) geerntet, daraus RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In diesem Gewebe und zu diesem Zeitpunkt sollte der Promotor aktiv sein. Die Primer für die RT-PCR wurden, sofern möglich, aus den 3'-nicht-translatierten Regionen von *VfAAP1* bzw. *VfPTR1* abgeleitet, da in diesen Sequenzabschnitten die Homologie zu den internen Transportern aus *P. sativum* am geringsten ist. *VfAAP1* und *VfPTR1* haben im Vergleich mit den entsprechenden Genen aus *P. sativum* über 90% identische Nukleotide. Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass *VfPTR1* in den transgenen sucAAP Erbsen exprimiert wird (Abb. 3.26 A). Dabei zeigten sich geringfügige Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen individuellen Pflanzen. In der Wildtypkontrolle wurde keine Bande detektiert. Als Beladungskontrolle wurde ein Bereich aus einem *PsActin*-Gen amplifiziert, welches in Blättern konstitutiv exprimiert wird.

In den sucAAP Erbsen konnten mittels RT-PCR ebenfalls *VfAAP1*-Transkripte nachgewiesen werden, jedoch wurde auch in der Wildtypkontrolle eine schwache Bande detektiert, die aufgrund der hohen Homologie wahrscheinlich von *PsAAP2* stammt (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde entschieden, eine quantitative real-time PCR mit demselben Ausgangsmaterial durchzuführen. Die hierfür abgeleiteten Primer liefern Amplifikate von nur etwa 60 bp Größe, es kann somit einfacher als bei der RT-PCR eine Region mit möglichst geringer Homologie zu *PsAAP2* ausgewählt werden. Die Abbildung 3.26 B zeigt das Ergebnis der qRT-PCR. Es ist zu erkennen, dass die transgenen Nachkommen der Linie sucAAP5 (5/3 und 5/8) *VfAAP1* in Blättern exprimieren und im Wildtyp kein Produkt amplifiziert wurde.

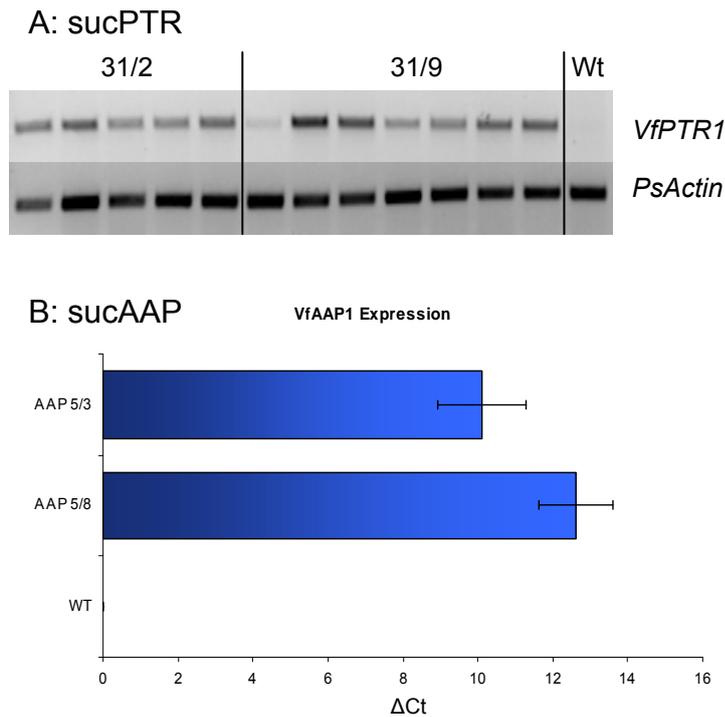
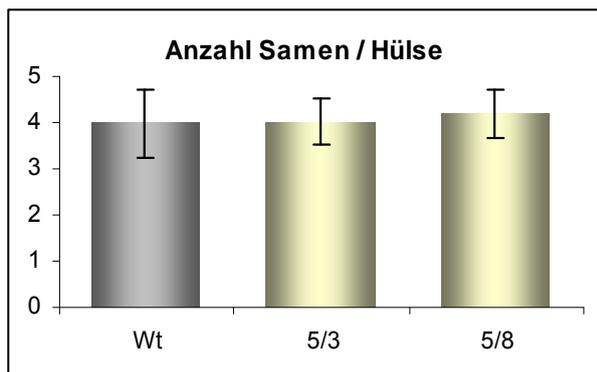
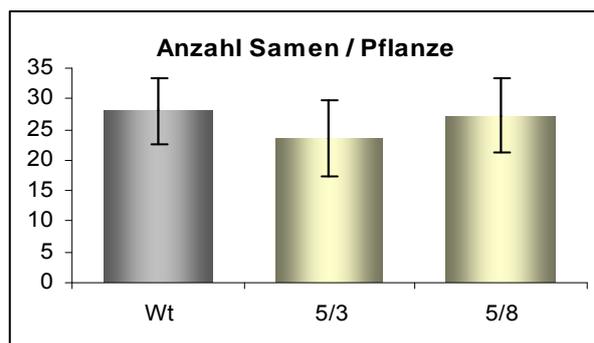
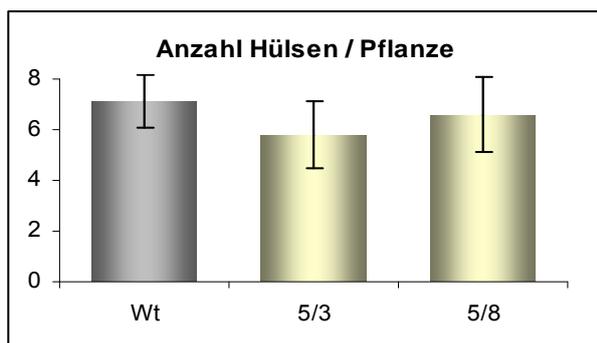


Abb. 3.26: A: RT-PCR zum Nachweis der *VfPTR1*-Transkripte in Blättern transgener Erbsenpflanzen. Als Beladungskontrolle wurde auf die mRNA des konstitutiv exprimierten *PsActin*-Gens getestet. Wt: Wildtyp
B: qRT-PCR zum Nachweis der *VfAAP1*-Transkripte. Die Expressionsstärke ist als ΔCt ($Ct \text{ VfAAP1} - Ct \text{ Referenzgen } PsActin$) angegeben, je geringer ΔCt , desto höher die Expression. Berechnet wurde der Mittelwert von drei unabhängigen Pflanzen.

Während des Wachstums zeigten die Pflanzen keinen sichtbaren Phänotyp. Nach dem Abreifen wurden ertragsrelevante Parameter wie die Anzahl der Hülsen, Anzahl der Samen pro Hülse und Pflanze sowie das durchschnittliche Samengewicht bestimmt. Für die statistische Auswertung wurden die Samen ausgewählter Linien der T_5 -Generation (sucAAP) bzw. der T_4 -Generation (sucPTR) verwendet. Die Anzahl der Hülsen, reifer Samen sowie die Samengröße waren bei sucAAP und sucPTR-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen unverändert.

A: sucAAP



B: sucPTR

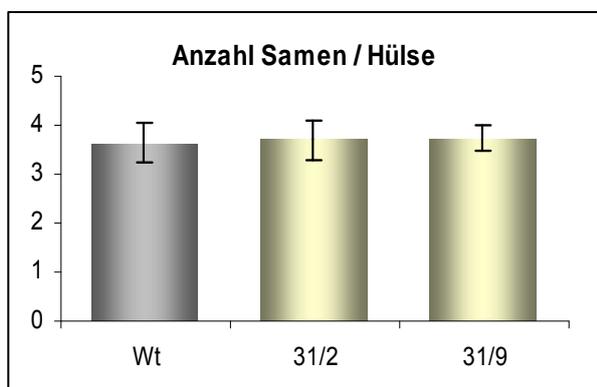
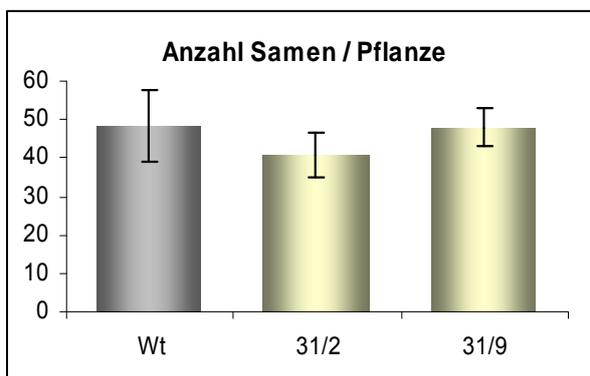
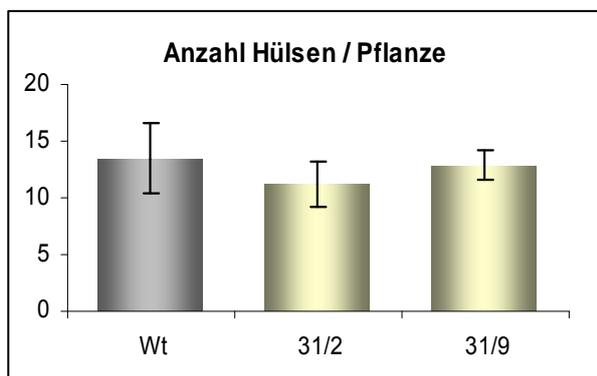


Abb. 3.27: Bestimmung ertragsrelevanter Parameter der transgenen Erbsenpflanzen sucAAP (A) und sucPTR (B). Für die statistische Analyse wurden jeweils 10 Pflanzen verwendet. Wt: Wildtyp

Inhaltsstoffanalyse reifer Samen

Die transgenen Pflanzen wurden einerseits in Phytokammern unter konstanten Temperatur- und Lichtbedingungen und andererseits in Gewächshäusern ohne zusätzliche Licht- oder Temperaturregulation (März bis Juli) angezogen. Pro Linie wurden zehn Samen ausgelegt, ebenso von den Wildtyp-Kontrollen. Um Aussagen zum Gehalt an Gesamt-N und -C, Proteinen und Zuckern der transgenen Pflanzen machen zu können, wurden die reifen Samen einer Inhaltsstoffanalyse unterzogen. Dazu wurden die Samen von verschiedenen Pflanzen einer homozygoten Linie gemischt und aus dieser Mischung sechs Proben à vier Samen entnommen. Die Samen wurden zu Mehl verarbeitet und dieses dann nach dem Trocknen für die verschiedenen Analysen verwendet. 3 mg des Mehls wurden für die Bestimmung des C- und N-Gehaltes mit Hilfe eines Elementaranalysators entnommen. Aus weiteren 50 mg des Mehls wurden nacheinander mit einem Azetat- bzw. Phosphatpuffer die löslichen Proteinfractionen Albumine und Globuline extrahiert und deren Konzentration mittels Bradfordbestimmung ermittelt (Bradford, 1976). Stärke und Saccharose wurden aus 20 mg getrocknetem Mehl mittels Ethanol extrahiert. Die Vermessung der Proben erfolgte mit dem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 340 nm.

sucAAP

Die sucAAP Pflanzen der vierten und fünften Generation wurden in zwei aufeinanderfolgenden Jahren in Gewächshäusern ohne zusätzliche Licht- oder Temperaturregulation angezogen. Die Pflanzen 5/3 und 5/8 stammen von derselben Mutterpflanze (Linie 5) und sind genetisch identisch. Sie wurden aber für die Analysen unabhängig behandelt, somit wird der Probenumfang für die Messungen erhöht. Die Samen beider Anzuchten zeigten signifikante Erhöhungen im Speicherproteingehalt im Vergleich zu Kontrollpflanzen (Abb. 3.28). Die Proteinerhöhung betrifft dabei nur die Globulinfraction, die Albumine sind unverändert. Während in der T₄-Generation nur die Samen der 5/8 diese Erhöhung zeigte, waren in der T₅-Generation die Globulinwerte in den Samen beider Nachkommen, 5/3 und 5/8, erhöht. Diese Tendenz zeigte sich auch, wenn die Pflanzen in Phytokammern angezogen wurden (Daten nicht gezeigt). Das Samengewicht war im Vergleich zu Wildtyppflanzen unverändert und auch der Gesamt-N-Gehalt zeigte keine signifikanten Änderungen in den transgenen Linien. Aus dem N-Gehalt kann auf den Gesamtproteingehalt geschlossen werden. Da die Globuline erhöht sind, wäre zu erwarten gewesen, dass auch der N-Gehalt höher ist.

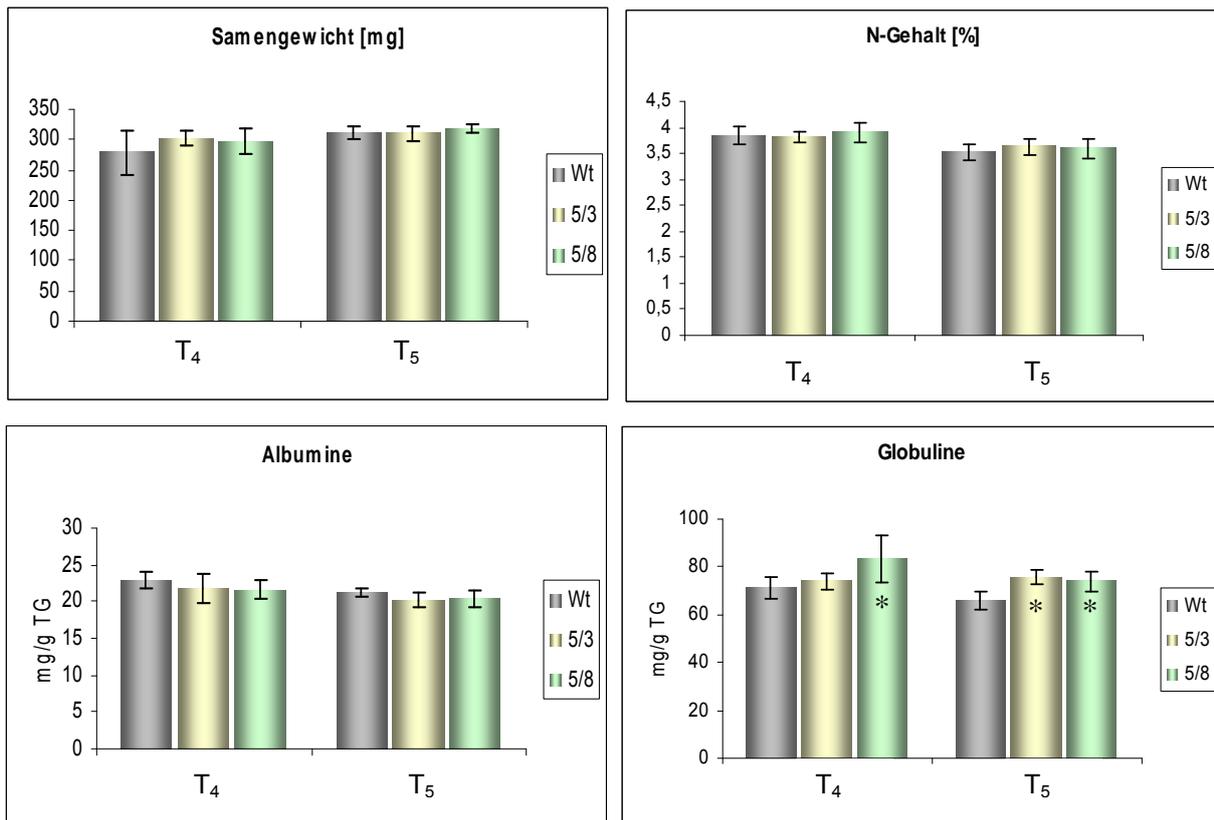


Abb. 3.28: Samengewicht und Inhaltsstoffe reifer sucAAP-Samen. Der Proteingehalt ist in mg pro g Trockengewicht (TG) angegeben. Die Diagramme zeigen die gemittelten Werte aus je sechs Wiederholungen von zwei verschiedenen Anzuchten (T₄ und T₅, Gewächshaus). Sterne markieren statistisch signifikante Änderungen ($p \leq 0,05$) in den transgenen Linien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Wt).

Des Weiteren wurden aus dem Samenmehl der T₅-Generation noch Stärke und Saccharose extrahiert und deren Gehalt bestimmt. Damit sollte überprüft werden, ob der Gehalt dieser Inhaltsstoffe in den transgenen Samen verändert ist. Sowohl Stärke- als auch Saccharosegehalt sind in den transgenen Linien im Vergleich zu Wildtyppflanzen nicht signifikant verändert.

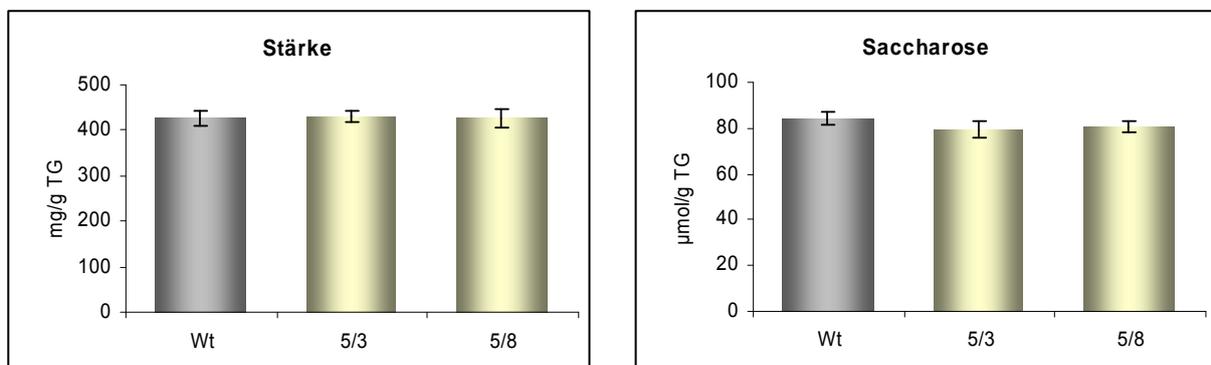


Abb. 3.29: Bestimmung des Stärke- und Saccharosegehalts der sucAAP-Erbensamen. Der Stärkegehalt ist in mg pro g Trockengewicht (TG), der Saccharose-Gehalt in µmol/g TG angegeben.

sucPTR

Für die Inhaltsstoffanalyse der sucPTR-Samen wurden homozygote Pflanzen (31/2 und 31/9) der T₄- und T₅-Generation verwendet. Diese stammen von derselben Mutterpflanze (Linie 31) ab und sind genetisch identisch. Die Pflanzen der T₄ wuchsen unter konstanten Bedingungen in der Phytokammer, die der T₅ in Gewächshäusern ohne Licht- und Temperaturregulation. Für die Analyse wurden die Samen von zehn Pflanzen einer Linie (Wt und transgene Pflanzen 31/2 und 31/9) gemischt und aus diesem Mix sechs Proben à vier Samen entnommen und zusammen gemahlen. Das Samenmehl wurde getrocknet und auf C/N- sowie Proteingehalt untersucht.

Die Samen der Pflanze 31/9 zeigten in der T₄ eine signifikante Erhöhung im Gesamtstickstoffgehalt, in den Samen der Pflanze 31/2 gab es im Vergleich zum Wildtyp keine Änderungen. Bei der Bestimmung der Speicherproteine wurde festgestellt, dass die Globulinfraction beider Nachkommen der transgenen Linie 31 signifikant erhöht war. Die Albuminfraction war von dieser Erhöhung nicht betroffen. Das durchschnittliche Samengewicht war in den Pflanzen 31/2 und 31/9 erhöht. Das Expressionslevel des *PTR1*-Gens auf mRNA-Ebene war in beiden untersuchten Nachkommen nahezu gleich. Die T₄-Samen der transgenen sucPTR-Pflanzen weisen einen erhöhten Speicherproteingehalt auf und sind etwas schwerer als die entsprechenden Wildtyp-Samen. Die Samen der T₅-Pflanzen, die in Gewächshäusern angezogen wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede im N-Gehalt. Der Globulingehalt war nur in der Pflanze 31/2 im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht, Albumine waren wieder unverändert. Das Samengewicht der 31/9-Pflanzen war leicht erhöht. Die Proteinerhöhung konnte über zwei Generationen hinweg und unter verschiedenen Umweltbedingungen zumindest für einen der untersuchten Nachkommen (31/2) bestätigt werden. Insgesamt haben die Samen aus Gewächshäusern einen höheren Stickstoff- und Speicherproteingehalt als Samen aus Phytokammermaterial. Beim Samengewicht verhält es sich genau anders herum.

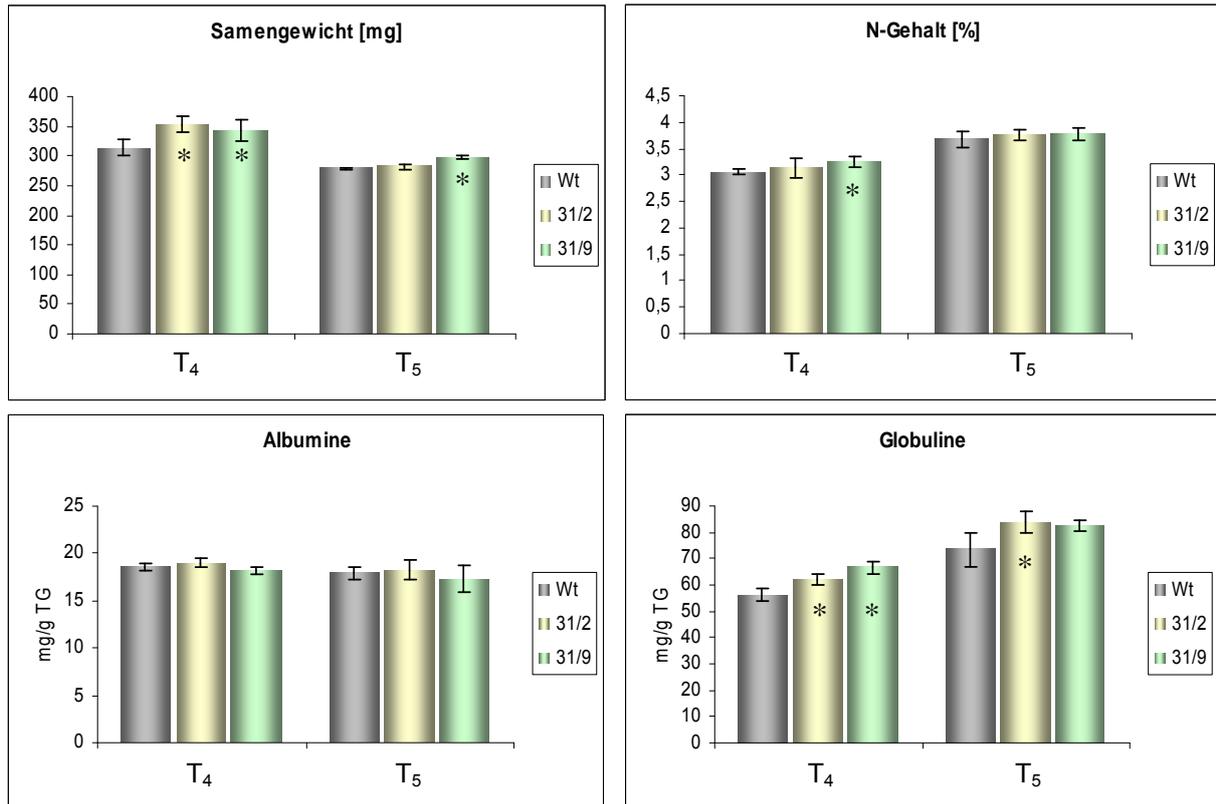


Abb. 3.30: Samengewicht und Inhaltsstoffe reifer sucPTR-Samen. Der Proteingehalt ist in mg pro g Trockengewicht (TG) angegeben. Die Diagramme zeigen die gemittelten Werte aus je sechs Wiederholungen von zwei verschiedenen Anzuchten (T₄: Phytokammer, T₅: Gewächshaus). Sterne markieren statistisch signifikante Änderungen ($p \leq 0,05$) in den transgenen Linien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Wt).

3.1.5 Kreuzung zweier VfAAP1 Erbsenlinien

Kreuzung von sucAAP-Linien mit einer Markergen-freien LeB4AAP-Linie, die VfAAP1 samenspezifisch exprimiert

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits beschrieben, konnte in den sucAAP-Pflanzen nur eine leichte Proteinerhöhung, die die Globuline betraf, nachgewiesen werden. Es wurde zunächst angenommen, dass eine Kopie des VfAAP1 Gens unter Kontrolle eines phloemspezifischen Promotors wahrscheinlich nur zu geringen Änderungen im Samenspeicherproteingehalt von Erbse führt. Deshalb wurde ein zusätzlicher Ansatz geplant, die Kreuzung zweier verschiedener Erbsenlinien, die VfAAP1 zum einen phloemspezifisch exprimieren (sucAAP) und zum anderen samenspezifisch unter Kontrolle des *Legumin B4*-Promotors (LeB4AAP). Aus früheren Versuchen mit LeB4AAP ist bekannt, dass dieses Konstrukt zu einem höheren Speicherproteingehalt in Samen von *V. narbonensis* und *P. sativum* führt (Rolletschek et al., 2005). Die homozygote Linie sucAAP 5/8 wurde mit der homozygoten Linie LeB4AAP 14/10 gekreuzt. Ziel dieses Versuchs war es, doppelt homozygote VfAAP1-Erbsepflanzen für die Expression des

Transgens im Phloem und im Samen zu erzeugen. Durch die *AAP1*-Expression im Phloem soll die Translokation von Reservestoffen aus der Speicherproteinhydrolyse in das Phloem verbessert werden und somit indirekt auch mehr N-Metabolite für die Beladung des sich entwickelnden Samens zur Verfügung stehen. Mit der Expression von *AAP1* unter Kontrolle des *LeB4*-Promotors wird die Samenbeladung beeinflusst, indem mehr Aminosäuren eintransportiert werden können. Letztlich soll der Effekt des Transgens im Vergleich zu den Ausgangslinien verstärkt werden, um einen höheren N- und Proteingehalt der reifen Samen zu erzielen.

Nachkommenschaftsanalyse zur Identifizierung doppelt homozygoter Pflanzen

Für die Erzeugung der sucAAP-Pflanzen wurde der pBAR-Vektor verwendet, der als Selektionsmarker das *bar*-Gen trägt, welches eine Resistenz gegen Phosphinotricin (Basta®) vermittelt. Die LeB4AAP-Pflanzen hingegen wurden durch Kotransformation erzeugt, d. h. es wurde mit zwei Plasmiden transformiert, auf dem einen befand sich das *VfAAP1*-Gen und auf dem anderen das Resistenzgen. In den nachfolgenden Generationen segregierte das Resistenzgen, so dass Markergen-freie Pflanzen selektiert werden konnten, die homozygot für LeB4VfAAP1 waren. Das Vorhandensein des *bar*-Gens in den sucAAP-Pflanzen erleichtert die Analyse der Kreuzungsprodukte.

AAbb x aaBB

F₁

	Ab	Ab
Ba	AaBb	AaBb
Ba	AaBb	AaBb

A LeB4AAP
a Wt
B sucAAP
b Wt

AaBb x AaBb

F₂

	AB	Ab	aB	ab
AB	ABAB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

■ Basta negativ
 ■ Southern Blot, Linien mit nur einem Allel
 ■ LeB4AAP homozygot, sucAAP heterozygot
 ■ sucAAP homozygot, LeB4AAP heterozygot
 ■ heterozygot für sucAAP und LeB4AAP
 ■ homozygot für sucAAP und LeB4AAP

Abb. 3.31: Kreuzungsschemen für die F₁ und F₂ Generation. Die homozygote Linie LeB4AAP 14/10 (A) wurde mit der homozygoten Linie sucAAP 5/8 (B) gekreuzt, die klein geschriebenen Buchstaben indizieren das jeweilige Wildtypallel.

Die Abbildung zeigt Kreuzungsschemen für die F₁ und F₂ Generation der gekreuzten Pflanzen. Die Samen der gekreuzten Pflanzen (F₁) sind uniform, d. h. heterozygot für beide *VfAAP1*-Allele unter den verschiedenen Promotoren. Alle F₁-Nachkommen waren resistent gegen Phosphinotricin, wie durch Bestreichen der Blätter mit Basta[®] festgestellt wurde. Für die nachfolgende F₂-Generation müssten nach den theoretischen Vererbungsgesetzen nach Mendel 6,25 % der Pflanzen homozygot für beide *VfAAP1*-Allele sein. Ausgehend von 58 F₁-Samen sollten doppelt homozygote Nachkommen identifiziert werden. Theoretisch segregiert bei 25 % der Pflanzen das sucAAP-Konstrukt wieder heraus (3:1 Spaltung), so dass diese wieder sensitiv auf Basta[®] reagieren. 14 Pflanzen waren nach Bestreichen der Blätter mit Basta[®] negativ und wurden nicht weitergeführt. Von den 44 restlichen Pflanzen wurden Southern Blot Analysen gemacht, um Pflanzen zu identifizieren, die beide *VfAAP1*-Gene tragen, dies sind theoretisch 50 % der F₂-Pflanzen. Da in den Elternpflanzen die sucAAP bzw. LeB4AAP-Konstrukte an unterschiedlichen Stellen im Genom integriert sind, kann dies im Southern Blot unterschieden werden (vgl. Abbildung 3.32).

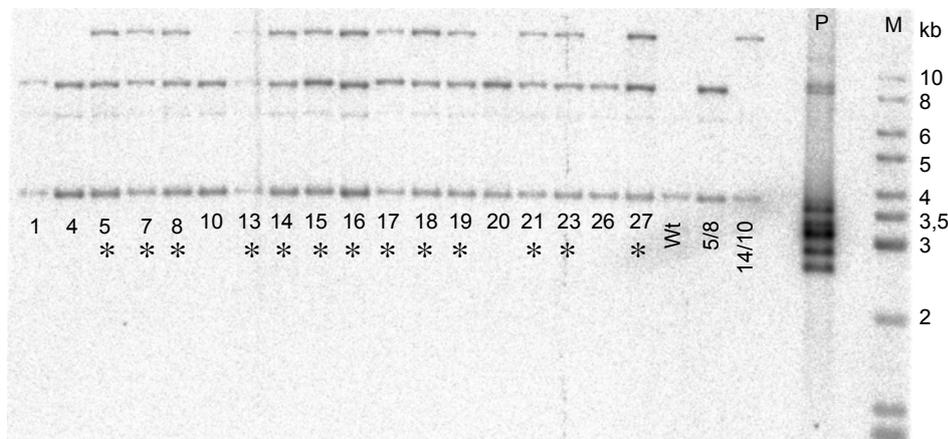


Abb. 3.32: Southern Analyse der F₂-Kreuzungsprodukte. 10 µg genomische DNA aus Blättern wurde mit *Hind*III geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Nylonmembran immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgte unter stringenten Bedingungen mit einem 1000 bp großen, radioaktiv markierten Fragment der *VfAAP1* cDNA. Die Membran wurde über Nacht exponiert. Die Abbildung zeigt beispielhaft einige der gekreuzten Pflanzen, die Elternlinien 5/8 und 14/10 sowie eine Wildtypkontrolle (Wt). Mit Stern markierte Linien tragen beide *AAP1*-Allele. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid mit dem sucAAP-Konstrukt aufgetragen (P). Der Größenstandard (M) ist in kb angegeben.

Für die folgenden Nachkommenschaftsanalysen wurden nur die Pflanzen ausgewählt, die beide *VfAAP1*-Insertionen tragen (31 Pflanzen). Bei diesen Pflanzen war zu dem Zeitpunkt aber noch nicht bekannt, ob das *VfAAP1*-Gen heterozygot oder homozygot vorliegt, denn dies kann mit der Methode nicht festgestellt werden. Laut Theorie sollten 25 % der Pflanzen

heterozygot für beide Konstrukte sein und jeweils 12,5 % tragen entweder *sucAAP* oder *LeB4AAP* homozygot, sind aber heterozygot für das jeweils andere Allel. Die 6,25 % doppelt homozygoten Pflanzen sind erst durch Nachkommenschaftsanalyse in der F_3 -Generation eindeutig zu identifizieren. Dazu wurden mindestens 10 Samen der nach dem Southern Blot selektierten Linien ausgelegt und die Pflanzen mittels Basta[®] und PCR auf beide Konstrukte getestet. Mit Primern, die aus *VfAAP1* und dem *AtSUC2*- bzw. *LeB4*-Promotor abgeleitet wurden, kann zwischen beiden Konstrukten unterschieden werden. Wenn die Nachkommen einer Linie nicht mehr aufspalten, d. h. keine negativen Individuen darunter sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Linie homozygot für beide *VfAAP1*-Konstrukte ist. Auf diese Weise konnten insgesamt vier Pflanzen (Nr. 27, 52, 56 und 58) identifiziert werden, die beide *VfAAP1*-Konstrukte homozygot tragen und genetisch identisch sind. Diese Pflanzen wurden für die Inhaltsstoffanalysen der reifen Samen ausgewählt.

Nachweis der *VfAAP1* Expression in Blättern der Kreuzungsprodukte

Um auch in den gekreuzten Pflanzen eine Expression von *VfAAP1* unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors in Blättern nachzuweisen, wurde eine qRT-PCR durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.1.4). Unter Verwendung der 3' *VfAAP1* Primer konnte gezeigt werden, dass alle Kreuzungsprodukte *VfAAP1* in Blättern exprimieren. Im Wildtyp hingegen und in der Elternlinie *LeB4AAP* 14/10, die *VfAAP1* nur samenspezifisch exprimiert, konnte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Das Expressionslevel ist in der Pflanze 58 am höchsten, gefolgt von der Pflanze 27.

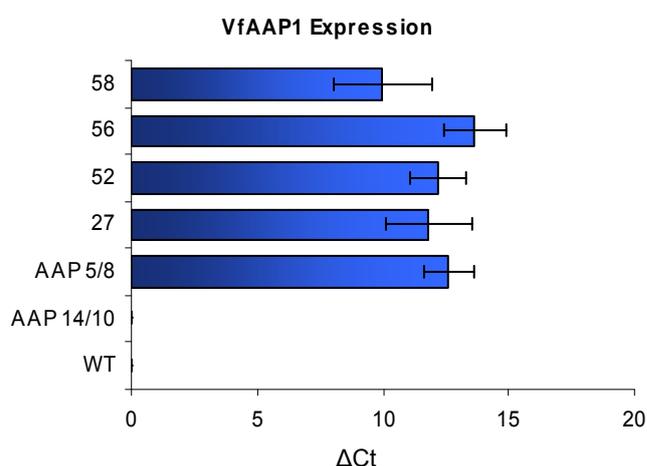
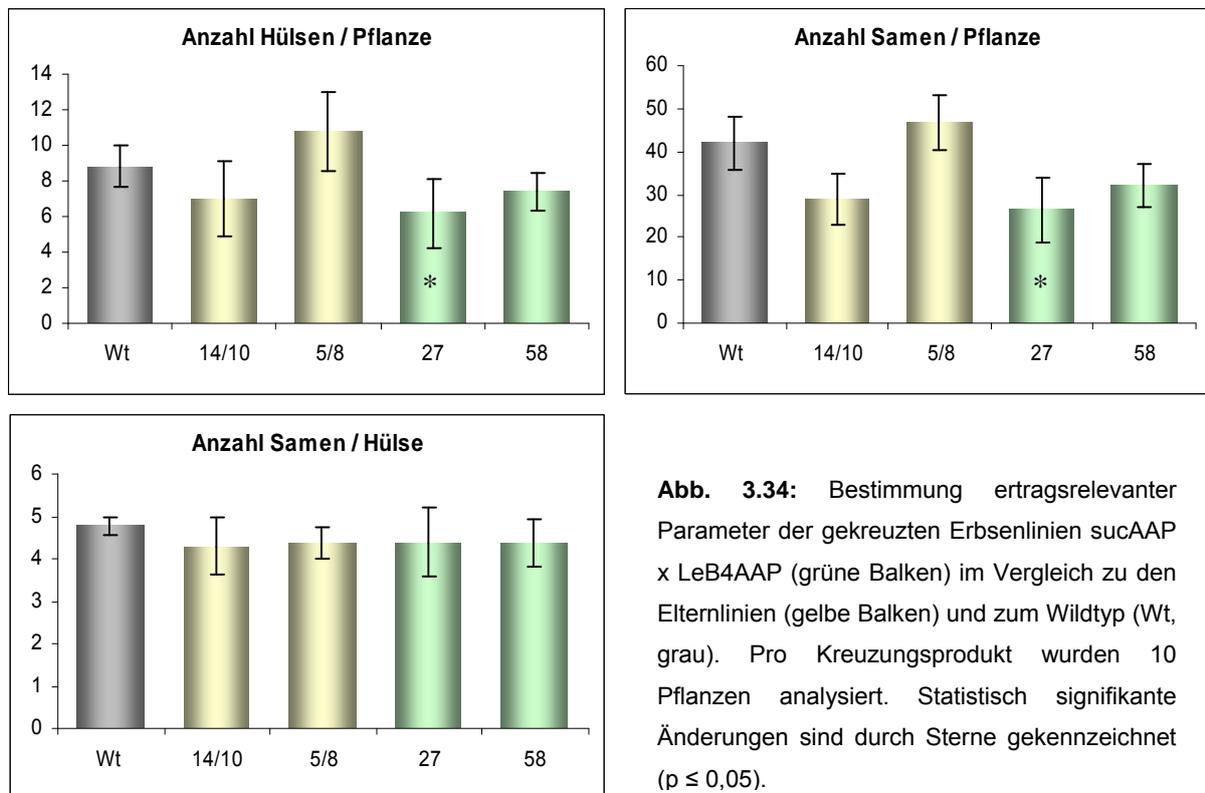


Abb. 3.33: qRT-PCR zum Nachweis der *VfAAP1*-Transkripte in den Kreuzungspflanzen. Die Expressionsstärke ist als ΔC_t (C_t *VfAAP1* – C_t Referenzgen *PsActin*) angegeben. Je geringer ΔC_t , desto höher die Expression. Berechnet wurde der Mittelwert von drei unabhängigen Pflanzen. Wt: Wildtyp

Bestimmung von Ertragsparametern und Analyse des Samenspeicherproteingehaltes der doppelt homozygoten Pflanzen

Von den doppelt homozygoten Kreuzungsprodukten 27 und 58 wurde analog zu den anderen transgenen Pflanzen der Gesamtstickstoff- und Speicherproteingehalt der reifen Samen bestimmt. Als Vergleich wurden zusätzlich zum Wildtyp auch die Ausgangslinien für

die Kreuzung (sucAAP 5/8 und LeB4AAP 14/10) parallel angezogen und analysiert. Pro Kreuzungsprodukt wurden zehn Pflanzen in der Phytokammer bzw. in Gewächshäusern angezogen. Bei der Ernte der reifen Samen wurden ertragsrelevante Parameter wie Anzahl der Hülsen und Samen pro Pflanze, Anzahl der Samen pro Hülse und das durchschnittliche Samengewicht bestimmt. Die Abbildung 3.34 zeigt beispielhaft Daten der Samen von Phytokammer-Pflanzen. Es fiel auf, dass die Pflanze 27 eine signifikant reduzierte Anzahl an Hülsen und Samen hatte. Die Anzahl der Samen pro Hülse war jedoch nicht verändert. Bei Pflanze 58 und der Linie 14/10 lagen die Mittelwerte der Hülsen- und Samenanzahl ebenfalls unter dem des Wildtyps, die Änderungen waren jedoch nicht signifikant.



Die folgende Abbildung 3.35 zeigt eine Erhöhung des N- und Globulingehaltes in den Samen der Kreuzungsprodukte 27 und 58 in der dritten (Pflanzen aus der Phytokammer) und vierten Generation (Pflanzen aus dem Gewächshaus). Diese Änderungen waren in der F_3 -Generation in Bezug auf den Wildtyp sowie auch auf die Ausgangslinien 14/10 und 5/8 statistisch signifikant. Samen der Kreuzungsprodukte aus dem Gewächshaus zeigten hingegen gegenüber der Elternlinie LeB4AAP 14/10 keine weitere N- und Proteinerhöhung (F_4). Die N- und Proteinerhöhung der Linie LeB4AAP 14/10 konnte bestätigt werden, die Erhöhung der Globuline der Linie sucAAP 5/8 dagegen nur für Samen von Gewächshauspflanzen. Die Albuminfraktion der Speicherproteine war in der F_3 -Generation in den Samen der Linie 14/10 und der Pflanze 27 sowie in der F_4 -Generation in den Samen der

Pflanze 27 leicht erniedrigt. Generell hatten alle Samen von Gewächshauspflanzen einen höheren Stickstoff- und Proteingehalt im Vergleich zu Samen von Phytokammerpflanzen, das Samengewicht war hingegen niedriger. Samen der Linie 14/10 und des Kreuzungsproduktes 58 hatten in der F₃-Generation einen signifikant niedrigeren Stärkegehalt und einen höheren Saccharosegehalt als Wildtypsamen. Transgene Samen aus dem Gewächshaus (F₄) zeigten hingegen keine Änderungen des Stärkegehaltes im Vergleich zu Wildtypsamen. Reife F₄-Samen des Kreuzungsproduktes 58 enthielten weniger Saccharose als entsprechende Wildtypsamen.

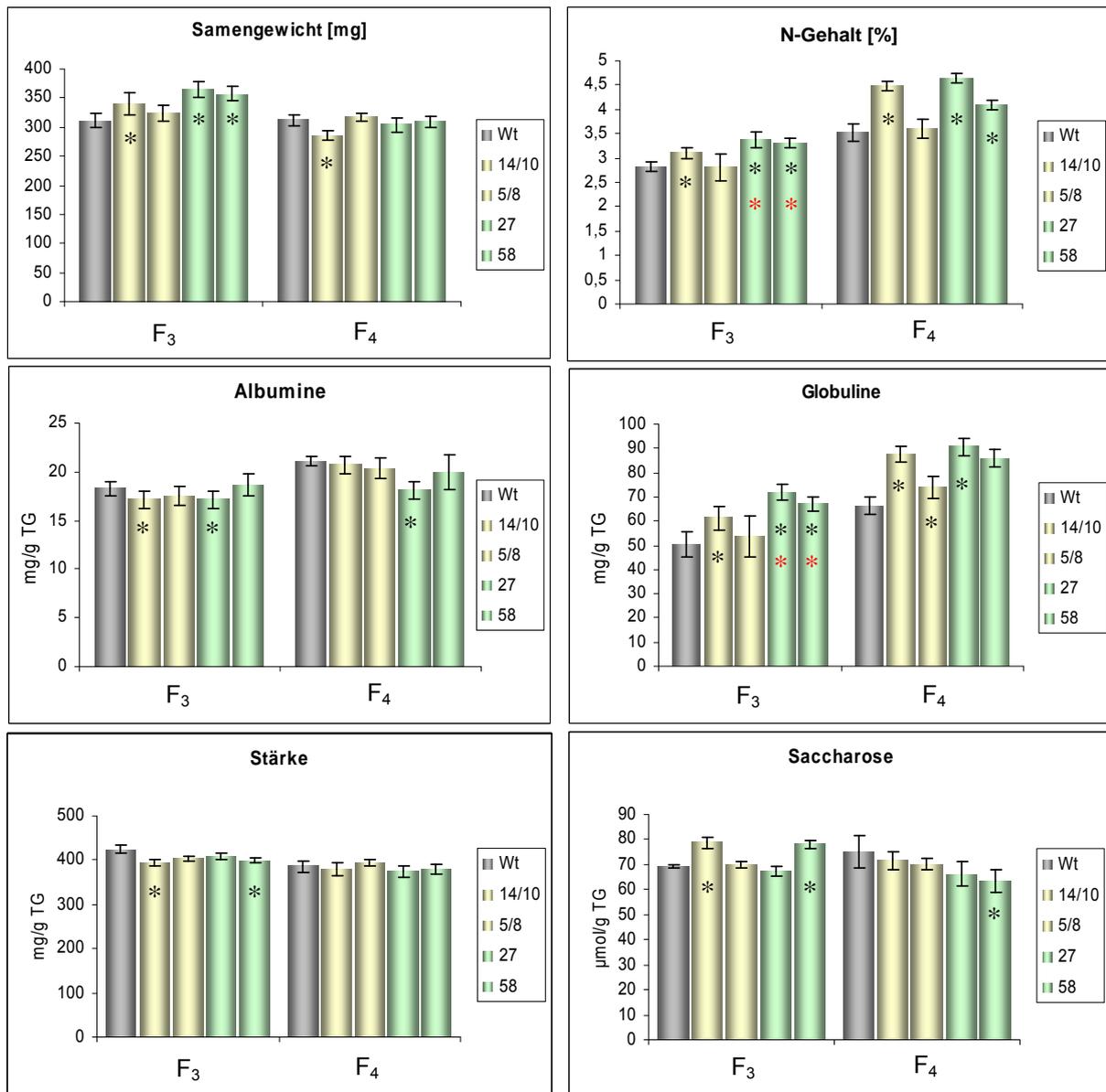


Abb. 3.35: Samengewicht und Inhaltsstoffe reifer Samen der Kreuzungsprodukte sucAAP x LeB4AAP (grün) im Vergleich zu den Elternlinien (gelb) und zum Wildtyp (Wt, grau). Messwerte sind analog zur Abb. 3.28 angegeben. TG: Trockengewicht, F₃: Anzucht Phytokammer, F₄: Anzucht Gewächshaus. Schwarze Sterne markieren statistisch signifikante Änderungen ($p \leq 0,05$) in den transgenen Linien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Rote Sterne geben zusätzlich statistisch signifikante Änderungen der Kreuzungsprodukte im Vergleich zu beiden Elternlinien 5/8 und 14/10 an.

Inhaltsstoffanalyse sich entwickelnder Samen

Um zu untersuchen, inwieweit Stickstoff- und Proteingehalt, Stärke, Saccharose und Aminosäuren während der Samenentwicklung in den Kreuzungsprodukten im Vergleich zu den Ausgangslinien und zum Wildtyp verändert sind, wurden diese Metabolite zu verschiedenen Zeitpunkten während der Samenentwicklung gemessen. Für die Entwicklungsreihe wurden Erbsenpflanzen der Nr. 27, der zugehörigen Elternlinien sucAAP 5/8 und LeB4AAP 14/10 sowie des Wildtyps in Gewächshäusern ohne Licht- und Temperaturregulation angezogen. Die selbstbestäubten Blüten wurden am Tag der Befruchtung markiert und unreife Samen von je drei Hülsen unterschiedlicher Pflanzen zu sechs verschiedenen Zeitpunkten geerntet (15., 18., 22., 26., 30. und 35. DAF). Nach dem Abreifen wurden die reifen Samen geerntet und ebenfalls analysiert. Während der frühen Samenentwicklung (15. DAF) war der N-Gehalt in allen Linien hoch, wobei der Wildtyp mit fast 6 % den höchsten Wert erreichte. Bis zum 22. DAF sank der N-Gehalt beim Wildtyp und der Linie sucAAP 5/8 auf 3,7 – 3,8 %, in der Linie LeB4AAP 14/10 und im Kreuzungsprodukt 27 nur auf 4,4 %. In den späten Entwicklungsstadien blieb der N-Gehalt in den Samen der 27 und 14/10 deutlich höher als in der Linie 5/8 und im Wildtyp. Das Kreuzungsprodukt 27 erreichte dabei noch etwas höhere Werte als die Elternlinie 14/10, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Diese Tendenz war auch in den reifen Samen zu beobachten. Die Linie 5/8 unterschied sich im N-Gehalt nicht vom Wildtyp, wie bereits aus der T₅-Generation (Anzucht 2006) hervorging. Für die Proteinbestimmung wurden Samen vom 18., 22., 26., 30. und 35. DAF sowie reife Samen verwendet. Der Gehalt an Albuminen stieg zu Beginn der Entwicklung von etwa 5 mg/g Trockengewicht (TG) auf 23 – 27 mg/g TG am 35. DAF an und fiel in den reifen Samen wieder geringfügig ab. Ähnlich verhielt es sich auch bei den Globulinen. In 18 Tage alten Samen lag die Konzentration der Globuline bei ca. 18 – 20 mg/g TG, stieg dann an und erreichte ihr Maximum am 30. DAF mit ca. 80 – 100 mg/g TG abhängig von der Linie. In reifen Samen war der Globulingehalt etwas unter dem Maximum vom 30. DAF. Der Globulingehalt war zu Beginn der Entwicklung im Wildtyp und den transgenen Pflanzen bzw. Kreuzungsprodukten nahezu gleich, erst während der Speicherphase (ab 30. DAF) wiesen die Samen der Pflanze 27 höhere Werte auf. In der Elternpflanze AAP14/10 trat der Unterschied zum Wildtyp erst ab dem 35. DAF auf, in der Linie AAP5/8 sogar erst in den reifen Samen. Bei den Albuminen fiel auf, dass die Pflanze 27 am 35. DAF sowie in reifen Samen einen geringeren Gehalt aufwies als der Wildtyp und die Elternpflanzen. In jungen Entwicklungsstadien (18. und 22. DAF) war die Albuminkonzentration analog zu den Globulinen in allen Linien nahezu identisch. Zwischen dem 26. und 30. DAF war die Albuminkonzentration im Wildtyp höher als in den transgenen Linien.

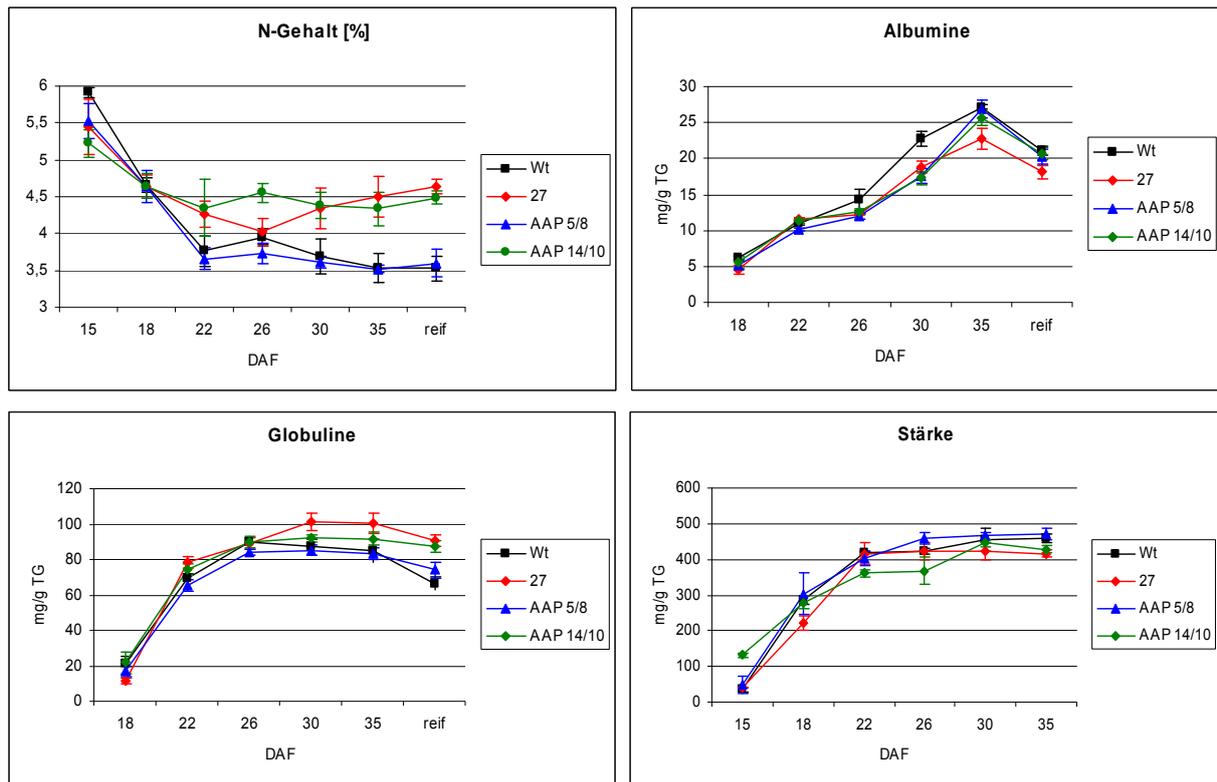


Abb. 3.36: Bestimmung des N-, Protein- und Stärkegehaltes während der Samenentwicklung im Kreuzungsprodukt 27, den Elternlinien sucAAP 5/8 und LeB4AAP 14/10 und im Wildtyp. Für die Entwicklungsreihe wurden je drei Kotyledonen von drei verschiedenen Pflanzen gefriergetrocknet und gemahlen. Zusätzlich wurden reife Samen verwendet. Das getrocknete Mehl wurde wie bereits zuvor beschrieben für die verschiedenen Messungen eingesetzt. Protein- und Stärkegehalte sind in mg/g Trockengewicht (TG) angegeben.

3.2 Aminosäuretransporter aus Gerste

3.2.1 Identifizierung putativer Aminosäuretransporter aus einer Gersten-EST-Kollektion

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Identifizierung und Charakterisierung von putativen Aminosäuretransportern aus Gerste. Bisher sind noch keine Aminosäuretransporter aus Gerste funktionell beschrieben worden. Die Grundlage für diese Arbeiten bildet die Gersten-EST-Kollektion des Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben (CR-EST, Crop-EST Database) mit momentan 206.640 EST-Klonen aus 22 verschiedenen cDNA-Banken. Zum Zeitpunkt der Suche enthielt die Datenbank 187.281 EST-Klone.

Vergleichende Sequenzanalyse putativer Aminosäuretransporter unter Verwendung verschiedener Datenbanken

Ausgehend von 100 cDNA-Sequenzen putativer Aminosäure- und Peptidtransporter aus *A. thaliana* sollte versucht werden, Aminosäuretransporter aus Gerste zu identifizieren. Auf Grundlage dieser cDNA-Sequenzen wurde zunächst die ARAMEMNON-Datenbank (Schwacke et al., 2003) nach orthologen Sequenzen im Reis-Genom durchsucht. ARAMEMNON ist eine spezielle Datenbank für alle putativen Membranproteine aus Arabidopsis und Reis, zusätzlich enthält sie derzeit noch ungefähr 4800 Sequenzen von Membranproteinen 270 weiterer Samenpflanzen. Über die Eingabe des Namens eines charakterisierten Proteins oder die *accession*-Nummer kann entweder nach paralogen oder orthologen Sequenzen gesucht werden. Reis ist als Vertreter der monokotyledonen Pflanzen vollständig sequenziert und steht der Gerste phylogenetisch näher als Arabidopsis. Daher sollten den 100 Ausgangssequenzen zunächst orthologe Sequenzen aus Reis zugeordnet werden. Aus dem jeweiligen Suchergebnis für jede der Ausgangssequenzen wurden zehn Reissequenzen mit der größten Homologie auf Proteinebene zu den Arabidopsis-Transportern ausgewählt. Insgesamt konnten auf diese Weise 165 verschiedene genomische Reissequenzen identifiziert werden, die sich nach Translation in die Aminosäuresequenz zu N-Transporterfamilien mit bereits funktionell charakterisierten Mitgliedern zuordnen ließen. Mit diesen 165 translatierten Reissequenzen wurde anschließend ein Blastx gegen alle verfügbaren Weizen-ESTs durchgeführt, dies waren zum damaligen Zeitpunkt 565.133 ESTs (EMBL *release*, Juli 2004). Aus dieser Suche resultierten 61 Weizen-ESTs mit einer möglichen Funktion im Aminosäure- oder Peptidtransport, darunter 28 ESTs für putativen Aminosäuretransport. Für die weitere Suche in der Gersten-EST-Kollektion wurden nur diese 28 EST-Sequenzen ausgewählt. Die durchgeführte Blast-

Suche nach Gersten-ESTs mit der höchsten Homologie zu den Weizen-ESTs ergab 84 ESTs mit einer putativen Funktion im Aminosäuretransport. Nach einer *cluster*-Analyse dieser Sequenzen konnten 22 putative Aminosäuretransporter identifiziert werden, die sich verschiedenen Familien zuordnen ließen. 13 Mitglieder gehören der ATF-Familie an und neun Mitglieder der APC-Familie (vgl. Abb. 3.37).

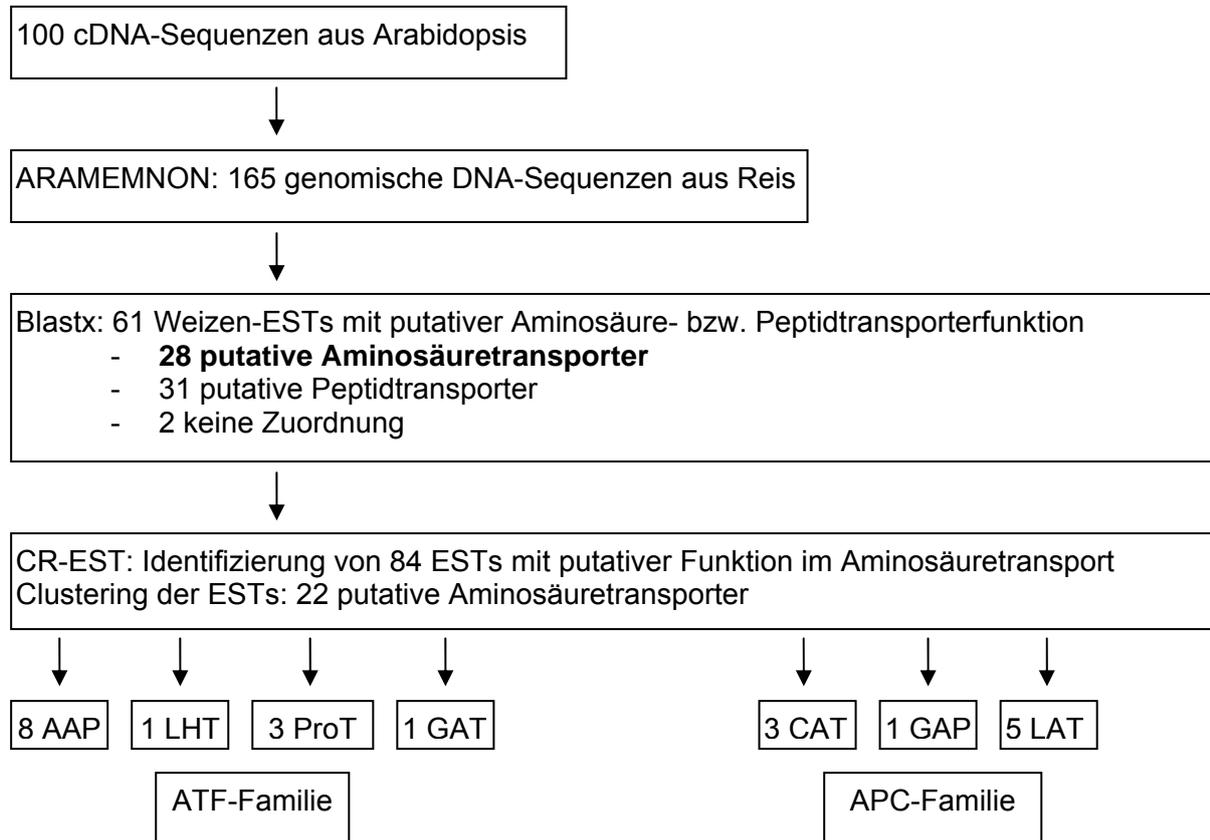


Abb. 3.37: Schematische Darstellung des Weges zur Identifizierung putativer Aminosäuretransporter aus Gerste mit Hilfe von verschiedenen Datenbanken. AAP: Aminosäurepermeasen, LHT: Lysin-Histidin-Transporter, ProT: Prolintransporter, GAT: GABA-Transporter, CAT: kationische Aminosäuretransporter, GAP: GABA-Permeasen, LAT: L-Typ Aminosäuretransporter, ATF: Aminosäuretransporter, APC: Aminosäure/Polyamin/Choline Transporter.

Sequenzanalyse und phylogenetische Beziehungen von HvAAP1 und HvAAP2 zu anderen Aminosäuretransportern

In den bisher untersuchten Pflanzenarten umfasst die Familie der Aminosäurepermeasen (AAP) die meisten Mitglieder. Funktionell charakterisierte AAPs aus Arabidopsis, *V. faba* und *P. sativum* transportieren ein breites Spektrum an Aminosäuren, zeigen aber organ-, gewebe- und entwicklungspezifische Expressionsmuster, was auf unterschiedliche Funktionen innerhalb der Pflanze schließen lässt. Im Folgenden liegt der Schwerpunkt auf der AAP-Familie, mit dem Ziel, funktionelle AAPs aus Gerste zu identifizieren. Die Auswertung der EST-Sequenzen aus der CR-EST Datenbank zeigte, dass es in Gerste

genau wie in Arabidopsis acht AAP-Mitglieder zu geben scheint. Unter diesen acht identifizierten Gersten-ESTs befanden sich zwei Klone mit einer vollständigen cDNA-Sequenz, die als *HvAAP1* und *HvAAP2* bezeichnet wurden. Eine vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen der identifizierten putativen Gersten-AAPs ergab, dass *HvAAP1* und *HvAAP2* 71 % identische Aminosäuren besitzen. Mit Ausnahme der ersten 35 Aminosäuren gibt es innerhalb der gesamten Sequenz konservierte Bereiche.

HvAAP1	MEKK--QASYGKGAARMAPMEVSVEAGNGRESDWLDDDGRRSGTVWTASAHIIITAVIG	58
HvAAP2	MGQNGVGKNNYYQGTAAAAAMEVSSVEHGQAAAASKCYDDDGRLKRTGTMWTASAHIIITAVIG	60
	* *	
HvAAP1	SGVLSLAWAIAQLGWAAAGPAIMLLFALVIYYTSTLLAECYRSGDPETGKRHYTYMDAVRS	118
HvAAP2	SGVLSLAWAIGQLGWVAGPAVMLLFSLVTYTSSLLSDCYRSGDETTGKRNYTYMDAVNA	120
	***** *	
HvAAP1	YLPGTKVKVLCGVIQYANLVGVAIGYTIAASISMRAVRRADCFHYHDVGRSGKDSCKSSS	178
HvAAP2	NLSGIKVLQCGFLQYANIVGVAIGYTIAASISMLAIKKANCFH---VKGHVN--PCHISS	175
	* *	
HvAAP1	NPYMIVFGVVQILFSQIPDFDQIWWLSIVAAVMSFTYSTIGLGLGIAQTVANGGIQGSLT	238
HvAAP2	TPYMIIFGVAEIFFSQIPDFDQISWLSILAAIMSFTYSIIIGLSLGIQVQVANKGVKGSLT	235
	***** *	
HvAAP1	GLSVGPGVTSMQKVWRSLQAFGNIAFAYSYSIILIEIQDQTVKAPPSEAKVMKKATGISV	298
HvAAP2	GISIG-VVTPMDKVWRSLQAFGDIAFAYSYSILILIEIQDQIRAPPSESKVMRRATVVS	294
	* *	
HvAAP1	ATTTVFYMLCGCMGYAAFAGDAAPDNLLTGFGFYEPFWLLDVANAAIVVHLVGAYQVFCQP	358
HvAAP2	ATTTLFYMLCGCMGYAAFAGDNAPGNLLTGFGFYEPFWLLDIANAAIVVHLVGAYQVYCQP	354
	***** *	
HvAAP1	LFASFVEKWAAARWPDSAFIARELRVGPLA----ISVFRLTWRTAFVCLTTVVSMMLLPFFG	414
HvAAP2	LFASFVEKWAAARWPDSAFIARELRVGPLA----ISVFRLTWRTAFVCLTTVVSMMLLPFFN	414
	***** *	
HvAAP1	DVVGLLGAVAFWPLTVYFPVEMYIVQRGVPRGSTRWVCLQMLSAACLVSVAAGSIAD	474
HvAAP2	DVVGFLGAIWFPLTVYFPVEMYIVQKIKPKWSSQVWVCLQLLSLACLIIITIAAGSIAG	474
	***** *	
HvAAP1	VIGELKEYRPFSG- 487	
HvAAP2	IMSDLKVYKPFSTT 488	
	* * * * *	

Abb. 3.38: Vergleich der Aminosäuresequenzen von *HvAAP1* und *HvAAP2* ([http:// www.ebi.ac.uk/;Clustal W](http://www.ebi.ac.uk/Clustal_W) Methode). Identische Aminosäuren sind durch Sterne gekennzeichnet.

Die nähere Analyse der AAP-Aminosäuresequenzen mit Programmen über die Voraussage der Membrantopologie von Transportern (z. B. TMHMM Server v. 2.0, <http://us.expasy.org>) schlägt für *HvAAP1* eine Struktur mit neun und für *HvAAP2* mit zehn membranspannenden Domänen vor. Bei *HvAAP1* befindet sich der N-Terminus wahrscheinlich auf der intrazellulären Seite und der C-Terminus extrazellulär. *HvAAP2* hat beide Termini auf der extrazellulären Seite, wobei die Wahrscheinlichkeit, dass der N-Terminus extrazellulär liegt,

nur geringfügig höher ist als für eine intrazelluläre Lokalisierung. Beide AAPs besitzen einen intrazellulären *loop* von etwa 70 Aminosäuren Länge. Bei HvAAP1 liegt dieser *loop* zwischen den Membrandomänen vier und fünf, bei HvAAP2 zwischen den Membrandomänen fünf und sechs.

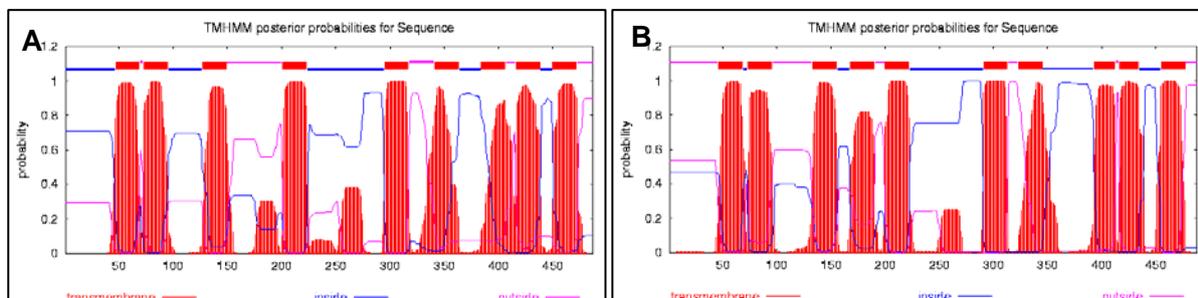


Abb. 3.39: Schematische Darstellung der putativen Membrandomänen von HvAAP1 (A) und HvAAP2 (B). Die Abbildungen wurden mit dem Programm TMHMM Server v. 2.0 erstellt.

Eine Blastp-Analyse (vgl. Tabelle 3.3) ergab, dass 70 % der Aminosäuren von HvAAP1 identisch zu denen von AAP3 und AAP2 aus Arabidopsis sind. Die Aminosäuresequenz von HvAAP2 ist zu 72 % bzw. 71 % identisch zu AtAAP2 bzw. AtAAP4.

HvAAP1	Identische AS [%]	Homologe AS [%]	HvAAP2	Identische AS [%]	Homologe AS [%]
AtAAP3	70	84	AtAAP2	72	86
AtAAP2	70	82	AtAAP4	71	84
AtAAP4	68	81	AtAAP3	71	84
VfAAP4	66	81	VfAAP4	69	83
PsAAP1	65	80	PsAAP1	68	84
AtAAP5	65	78	AtAAP5	66	82
PsAAP2	63	78	PsAAP2	66	80
VfAAP1	60	76	VfAAP1	63	77
VfAAP3	59	74	VfAAP3	61	77
AtAAP1	59	77	AtAAP6	60	77
AtAAP6	58	77	AtAAP8	60	76
AtAAP8	57	74	AtAAP1	59	77
AtAAP7	47	67	AtAAP7	47	68

Tab. 3.3: Ergebnis der Blastp-Analyse von HvAAP1 und HvAAP2 (PubMed Datenbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Für die Erstellung eines phylogenetischen Baums wurden die Proteinsequenzen von HvAAP1 und HvAAP2 mit denen der beschriebenen AAPs aus Arabidopsis, *V. faba* und

P. sativum verglichen. Wie in Abbildung 3.40 zu sehen ist, liegen HvAAP1 und HvAAP2 zusammen auf einem separaten Ast.

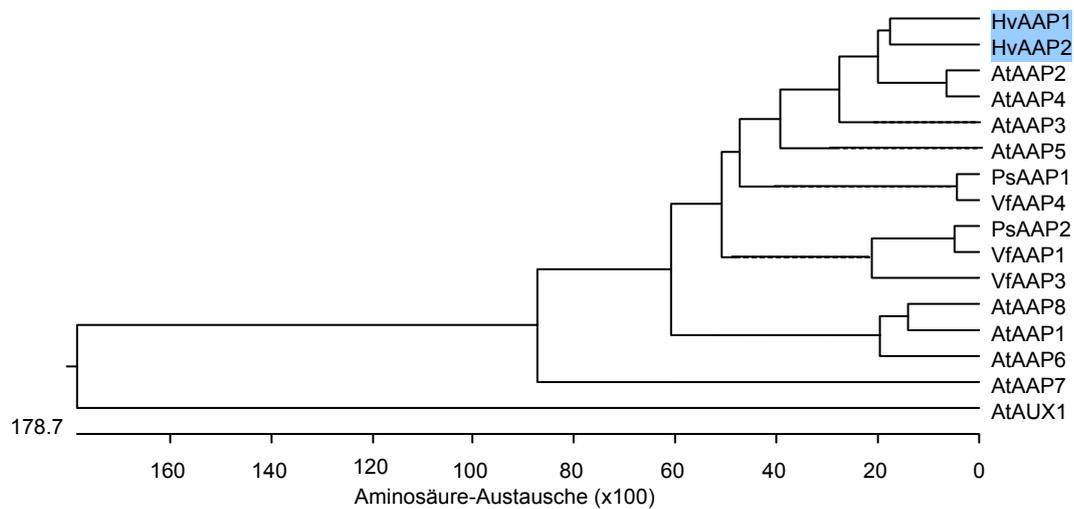


Abb. 3.40: Phylogenetischer Baum basierend auf dem Sequenzvergleich der Proteinsequenzen von HvAAP1 und HvAAP2 mit denen anderer AAP-Mitglieder. Für das Alignment wurde die Clustal W Methode (MegAlign, DNASTar) verwendet.

3.2.2 HvAAP1 und HvAAP2 sind funktionelle Mitglieder der AAP-Familie

Die Analyse der Gersten-EST-Kollektion ergab, dass HvAAP1 und HvAAP2 zu einer Gen-Familie mit wahrscheinlich acht Mitgliedern gehören. Vorläufige Southern Blot Analysen mit den vollständigen cDNAs von *HvAAP1* bzw. *HvAAP2* als Sonden weisen ebenfalls darauf hin, dass im Genom von Gerste mehrere AAP-Gene existieren (Daten nicht gezeigt). Um genaue Auskünfte über die Anzahl der homologen Sequenzbereiche von *HvAAP1* bzw. *HvAAP2* im Gerstengenom zu erhalten, müssen diese Analysen mit für beide Transporter spezifischen Sonden wiederholt werden.

Um zu testen, ob es sich bei den identifizierten AAPs um funktionelle Aminosäuretransporter handelt, sollte eine funktionelle Komplementation in *S. cerevisiae* Mutanten durchgeführt werden. Dazu wurden *HvAAP1* und 2 in den bereits im ersten Teil der Arbeit erwähnten Hefeexpressionsvektor pDR196 kloniert. Dieser enthält den Promotor der Plasmamembran-ATPase für eine konstitutive Expression des Zielgens. *HvAAP1* und *HvAAP2* wurden mittels PCR unter Einbau von *SpeI*-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende aus Plasmid-DNA (EST-Klon) amplifiziert, die erhaltenen Fragmente mit *SpeI* geschnitten und in den ebenfalls *SpeI*-verdauten und dephosphorylierten Vektor pDR196 ligiert. Die korrekte Orientierung der Fragmente wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

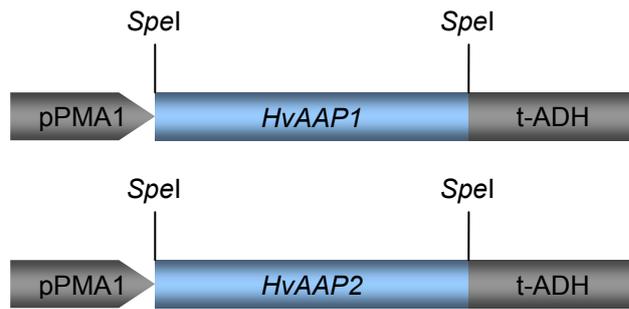


Abb. 3.41: Konstrukte für die funktionelle Komplementation von *S. cerevisiae* Mutanten. pPMA1: Promotor der Plasmamembran-ATPase 1 aus *S. cerevisiae*; *HvAAP1*, *HvAAP2*: putative Aminosäurepermeasen 1 und 2 aus *H. vulgare*. t-ADH: Terminator der Alkoholdehydrogenase aus *S. cerevisiae*. Ferner sind die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen angegeben.

Die Konstrukte wurden anschließend in sechs verschiedene Hefestämme transformiert, die Mutationen in unterschiedlichen Aminosäuretransportsystemen aufweisen. Die detaillierten Genotypen der verwendeten Hefestämme sind im Abschnitt 2.1.2 beschrieben. Alle verwendeten Hefemutanten können auf Selektivmedium, welches die dem jeweiligen Stamm entsprechenden Aminosäuren als einzige Stickstoffquelle enthält, nicht wachsen. Erst durch das Einbringen eines funktionellen Aminosäuretransporters kann die Mutation komplementiert werden und der Hefestamm ist in der Lage, auf Selektivmedium zu wachsen. Der Stamm 22574d trägt Mutationen in drei Aminosäuretransportsystemen (generelle Aminosäurepermease GAP1, Prolinpermease PUT4 und GABA-Permease UGA4). 22574d ist nicht in der Lage auf Minimalmedium mit Prolin, Citrullin oder GABA als einziger N-Quelle zu wachsen. Hefestamm 22Δ6AAL hat zusätzlich zu den genannten Mutationen von Stamm 22574d noch eine Mutation im Gen für den Lysintransporter. Dieser Stamm wird verwendet, um putative Aminosäuretransporter auf Wachstum auf Lysin zu untersuchen. JT16 ist eine Hefemutante mit einem Defekt im Gen für die Histidinpermease *hip1-614* und kann auf Minimalmedium mit geringen Histidinkonzentrationen nicht wachsen. Außerdem ist JT16 *his*-auxotroph, d.h. der Stamm ist nicht fähig, Histidin selbst zu synthetisieren. Mit den Stämmen 21.983c und 30.537a können mögliche Aminosäuretransporter auf Wachstum auf Arginin bzw. Glutamat überprüft werden. Der Stamm YDR544 trägt die gleichen Mutationen wie Stamm 22574d, wird aber für einen Wachstumstest auf Methionin, Phenylalanin, Valin und Isoleucin benutzt. Somit können die mit den putativen Transporter-cDNAs transformierten Hefezellen auf Wachstum auf unterschiedlichen Aminosäuren getestet und ein grober Überblick über das Substratspektrum der AAPs gewonnen werden. Nach der Transformation wurden transgene Hefen zunächst über den Selektionsmarker *ura3* (siehe Material und Methoden, 2.2.13) bestimmt und dann für den Wachstumstest auf Selektivmedium ausgestrichen.

HvAAP1 und HvAAP2 sind in der Lage, Hefestämme mit Defekten im Aminosäuretransport zu komplementieren (Abb. 3.42). Es handelt sich folglich um funktionelle Aminosäurepermeasen. Die Abbildung zeigt beispielhaft die funktionelle Komplementation anhand der Stämme 22574d und 21.983c. Wachstumsversuche mit den anderen oben genannten Hefemutanten sind im Anhang dargestellt. Das Substratspektrum beider AAPs ist unterschiedlich. Hefezellen, die mit HvAAP1 transformiert wurden, sind in der Lage auf Minimalmedium mit GABA (Stamm 22574d) und Arginin (Stamm 21.983c) als einziger N-Quelle zu wachsen. Die Mutationen werden von HvAAP1 komplementiert. Hefezellen, die den HvAAP2 in sich tragen, können auf Minimalmedium mit Prolin, Citrullin (22574d) und Arginin wachsen. Bei dem Stamm 21.983c zeigen auch Hefezellen, die nur mit dem leeren Vektor transformiert wurden ein leichtes Hintergrundwachstum auf Minimalmedium mit Arginin. Dies ist aber im Vergleich zum nicht-selektiven Medium deutlich schwächer und kann somit vernachlässigt werden. Bei dem Stamm 22574d wurde zusätzlich AtProT1 aus Arabidopsis als Positivkontrolle verwendet, da dieser Transporter in der Lage ist, GABA zu transportieren, wozu der AtAAP2 nicht fähig ist.

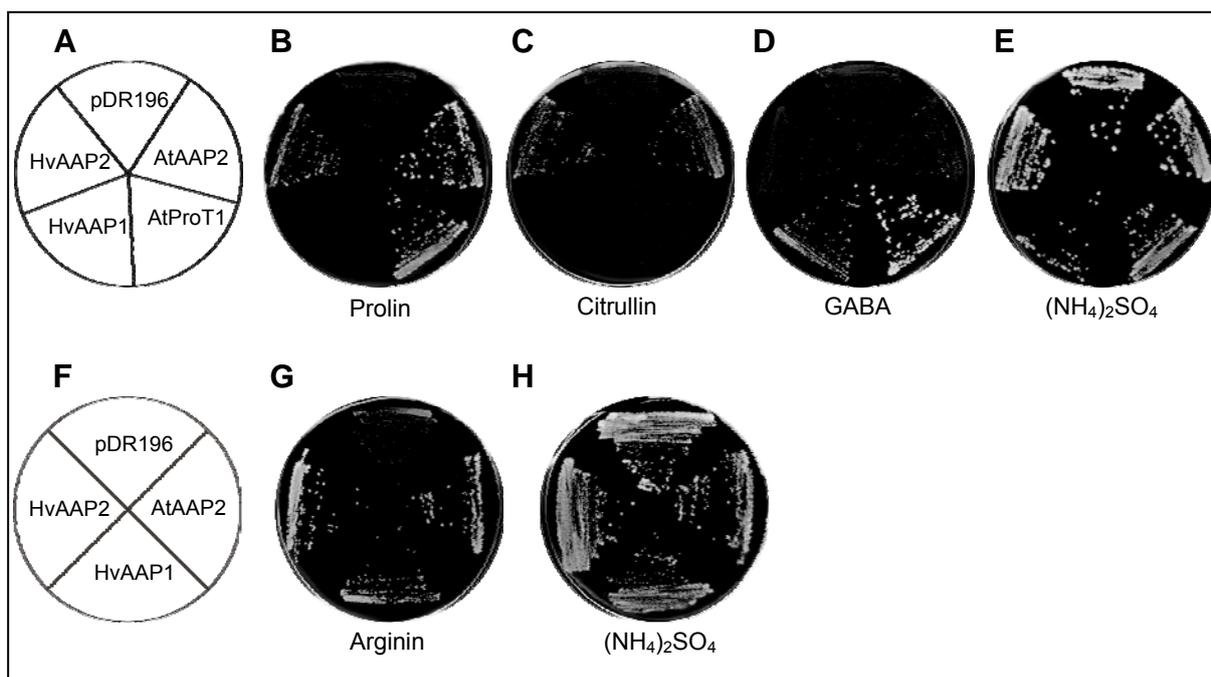


Abb. 3.42: Funktionelle Komplementation von *S. cerevisiae* Mutanten durch HvAAP1 und HvAAP2. A - E: Hefestamm 22574d, F - H: Hefestamm 21.983c. A, F: Ausstreichschema; B - D, G: selektives Wachstum von Kolonien, die die cDNAs von *AtAAP2*, *AtProT1* (Positivkontrollen), *HvAAP1* und *HvAAP2* sowie den leeren Vektor pDR196 (Negativkontrolle) tragen, auf SC-Medium mit 1 g/l Prolin, Citrullin, GABA oder Arginin. E, H: nicht-selektives Wachstum auf SC-Medium mit 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Die folgende Tabelle listet alle getesteten Aminosäuren auf, die von HvAAP1 bzw. HvAAP2 transportiert wurden.

Transporter	Aminosäuren
HvAAP1	Glutamat, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Valin, Isoleucin, GABA, Arginin
HvAAP2	Prolin, Citrullin, Glutamat, Lysin, Histidin, Arginin, Methionin, Phenylalanin, Valin, Isoleucin

Tab. 3.4: Übersicht über die von HvAAP1 und HvAAP2 in *S. cerevisiae* transportierten Aminosäuren.

3.2.3 Expression der Gersten-AAPs in vegetativen Geweben und während der Kornentwicklung

Um zu untersuchen, in welchen Geweben *HvAAP1* und *HvAAP2* exprimiert werden, wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Es sollte die Frage geklärt werden, ob einer der beiden Transporter möglicherweise samenspezifisch exprimiert wird. Deshalb wurden vegetative Pflanzenteile sowie sich entwickelnde Karyopsen analysiert. Das vegetative Gewebe wurde am 4. und 12. Tag nach der Blüte (days after flowering, DAF) geerntet. Damit sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Expression auch in den vegetativen Geweben in Bezug auf frühe und mittlere Samenentwicklungsstadien gibt. Von den Karyopsen wurden das filiale Endosperm mit dem Embryo (ES) und das maternale Perikarp (P) getrennt präpariert und für die RNA-Isolation verwendet. Es wurden insgesamt sechs Entwicklungsstadien analysiert, vom 0. bis 20. DAF im Abstand von vier Tagen. Ab dem 12. DAF wurde der Embryo vom Endosperm getrennt und separat analysiert. Neben vegetativen Geweben und Karyopsen wurden auch Keimlinge (Wurzel, Hypokotyl und Spross) untersucht, die auf verschiedenen Nährböden angezogen wurden (Agar, feuchtes Filterpapier, Erde). Die verschiedenen Böden weisen eine unterschiedliche Nährstoffzusammensetzung und -konzentration auf, was zu Unterschieden in der Expression der AAPs führen könnte. Die Expression einiger N-Transporter wird durch Nährstoffmangel induziert.

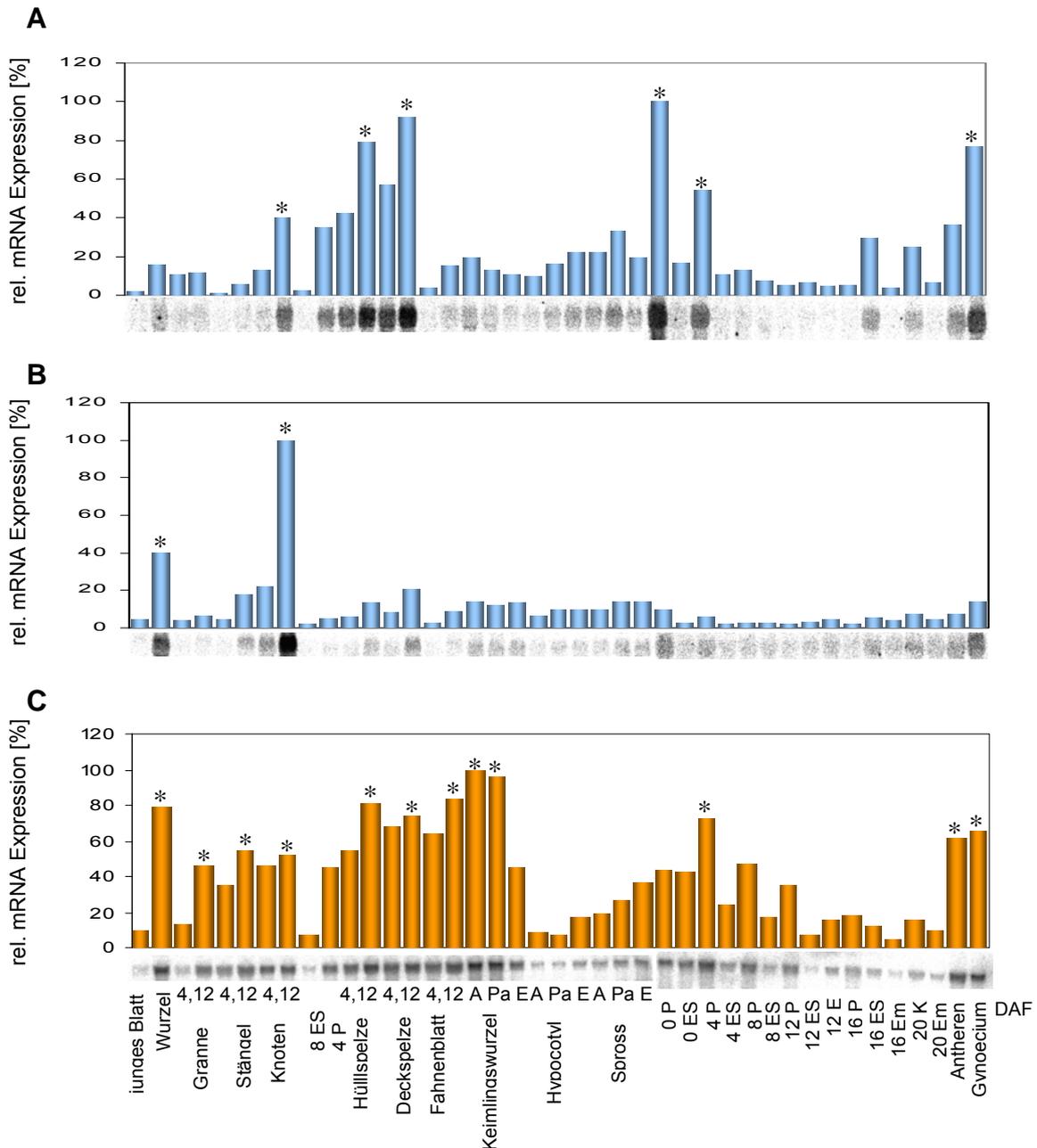


Abb. 3.43: Northern Blot Analysen der *HvAAP1* (A) bzw. *HvAAP2* (B) Transkripte in vegetativen Geweben und während der Samenentwicklung in *H. vulgare* im Vergleich mit der Expression einer Cysteinproteinase aus *H. vulgare* (EST-Klon HY07K19). 10 µg Gesamt-RNA der aufgeführten Gewebe wurden mit den radioaktiv markierten cDNAs von *HvAAP1*, *HvAAP2* und der Cysteinproteinase hybridisiert. Die relativen mRNA-Mengen wurden nach der Exposition mit dem Phosphorimager detektiert und mit der Software „Aida“ quantifiziert. Das stärkste Signal wurde auf 100 % gesetzt. ES: Endosperm mit Embryo, P: Perikarp, A: Agar, Pa: Papier, E: Erde, Em: Embryo, K: Karyopse. Die Zahlen stehen für das jeweilige Entwicklungsstadium (DAF: days after flowering). Die höchsten Transkriptmengen sind durch Sterne gekennzeichnet.

HvAAP1 wird am stärksten in den frühen maternalen Samentteilen (Perikarp, Gynoecium) sowie in den ährennahen Organen (Deckspelze, Hüllspelze, Knoten) exprimiert. Das stärkste Signal ist im Perikarp am 0. DAF zu verzeichnen, am 4. DAF und im Gynoecium ist das Transkriptlevel ebenfalls hoch. In der Deckspelze, der Hüllspelze und im ersten Knoten

unterhalb der Ähre ist die *AAP1* mRNA-Expression jeweils am 12. DAF höher als am 4. DAF. In den Spelzen finden sich am 12. DAF höhere *HvAAP1*-Transkriptmengen als im Knoten. Am 12. DAF findet in den genannten Organen bereits Seneszenz statt, d.h. Reservestoffe werden remobilisiert und für die Entwicklung der Samen verwendet. In den filialen Teilen der Karyopse wird *HvAAP1* hingegen nur sehr schwach exprimiert. Im Vergleich zu den jüngeren Entwicklungsstadien sind die mRNA-Level am 16. DAF im Endosperm und am 20. DAF in der Gesamtkaryopse leicht erhöht. In Gersten-Keimlingen sind *HvAAP1* Transkripte ebenfalls nur in relativ geringen Mengen zu finden.

HvAAP2 zeigt im Vergleich zu *HvAAP1* eine höhere Spezifität der mRNA-Expression für bestimmte Gewebe. Die höchsten Transkriptmengen finden sich im Knoten am 12. DAF. In Wurzeln älterer Pflanzen wird *HvAAP2* ebenfalls stark exprimiert. In allen anderen vegetativen Geweben und vor allem auch in sich entwickelnden Karyopsen konnten nur sehr geringe Mengen *HvAAP2* mRNA nachgewiesen werden. Obwohl *HvAAP1* Transkripte auch im Samen gefunden wurden, werden beide Aminosäurepermeasen nicht samenspezifisch exprimiert.

Die Expression der Cysteinproteinase (EST-Klon HY07K19) ist in Keimlingswurzeln, die von Papier oder Agar stammen, am höchsten und auch in älteren Wurzeln noch sehr hoch. Außerdem wird die Cysteinproteinase in den vegetativen Geweben (Granne, Stängel, Knoten, Spelzen, Fahnenblatt) jeweils am 12. DAF stärker exprimiert als am 4. DAF, was mit den zunehmenden Seneszenzvorgängen in diesen Geweben korreliert. Transkripte der Cysteinproteinase konnten auch in Antheren und Gynoecium sowie in der Perikarp-Fraktion während der Samenentwicklung nachgewiesen werden. Vergleicht man die Expression des Aminosäuretransporters *HvAAP1* mit der der Cysteinproteinase findet man einige Übereinstimmungen. Dies betrifft vor allem die Expression in den Spelzen am 12. DAF und im frühen Perikarp (4. DAF). *HvAAP1* wird ähnlich wie die Cysteinproteinase auch in Antheren und Gynoecium exprimiert.

3.2.4 Intrazelluläre Lokalisierung von *HvAAP1* und *HvAAP2*

Erstellung von GFP-Fusionskonstrukten und transiente Expression in Gerste-Protoplasten

Für die Lokalisierung der beiden Gersten-AAPs innerhalb der Zelle wurden C-terminale translationale Fusionen mit GFP erstellt. Dazu wurden *HvAAP1* und *HvAAP2* unter Einbau der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI/*Xba*I (*HvAAP1*) bzw. *Xba*I/*Sal*I (*HvAAP2*) und gleichzeitiger Entfernung der internen Stoppcodons mittels PCR aus den Gersten-EST-Klonen amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden gereinigt, mit den angegebenen

Enzymen gespalten und in den entsprechend verdauten Vektor pFF19-GFP kloniert. Der korrekte Einbau der AAP-Fragmente und die Beibehaltung des offenen Leserahmens wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt.

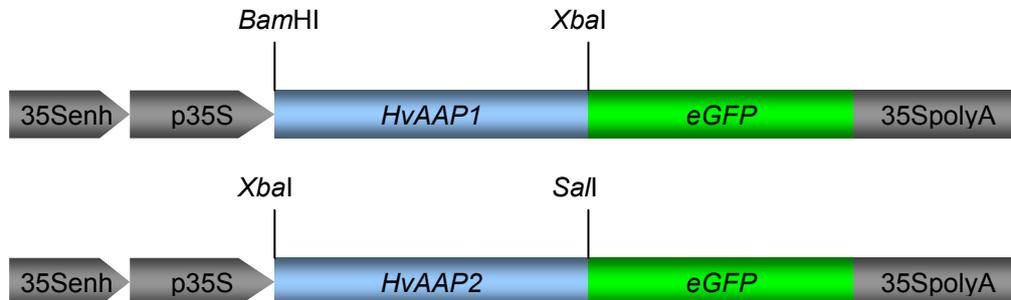


Abb. 3.44: Fusionskonstrukte für die transiente Expression von *HvAAP1GFP* und *HvAAP2GFP* in Protoplasten. 35Senh, p35S: 35S-Enhancer- bzw. Promotorsequenz aus dem Blumenkohlmosaikvirus, 35SpolyA: 35S-Polyadenylierungssignal; *HvAAP1GFP*, *HvAAP2GFP*: *HvAAP1* bzw. *HvAAP2* cDNA fusioniert an *eGFP*. Die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen sind angegeben.

Anschließend wurden die Konstrukte durch PEG-vermittelte Transformation sowohl in *H. vulgare* als auch in *A. thaliana* Suspensionsprotoplasten eingebracht. Die Isolierung, Kultivierung und Transformation von Protoplasten verschiedener Spezies ist eine Routine-Methode in unserer Arbeitsgruppe. Nach 24 bis 48-stündiger Inkubation wurden die Protoplasten mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning Mikroskops auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Wie in der Abbildung 3.46 zu erkennen ist, zeigen Protoplasten, die mit *HvAAP1GFP* transformiert wurden, eine Fluoreszenz im Bereich der Plasmamembran, aber auch im Zellplasma. Dabei sieht die Verteilung des GFP-Signals bei Gerste (B) und Arabidopsis (C) sehr ähnlich aus. In der Kontrolle (A: 35S/GFP) ist GFP-Fluoreszenz im Zytoplasma und den Kernen zu finden. In *HvAAP2GFP* Protoplasten konnte hingegen keine GFP-Fluoreszenz detektiert werden, möglicherweise wurden die Protoplasten nicht transformiert oder aber das Konstrukt wurde nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt).

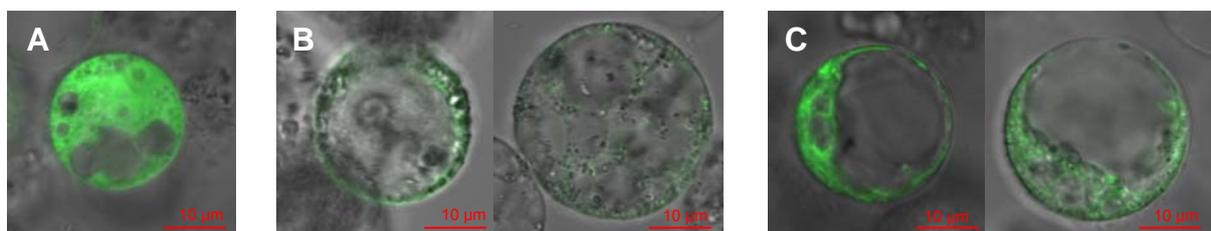


Abb. 3.45: Nachweis der GFP-Fluoreszenz des *HvAAP1GFP*-Fusionsproteins in *H. vulgare* und *A. thaliana* Protoplasten. A: 35Sp/GFP (Kontrolle), B: *HvAAP1GFP*, *H. vulgare*; C: *HvAAP1GFP*, *A. thaliana*. Die Protoplasten wurden nach der Transformation für 48 h bei 20°C dunkel inkubiert und anschließend mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Es wurden mehrere unabhängige Versuche mit jeweils frischem Material durchgeführt.

Stabile Transformation von Arabidopsis thaliana

Da der transiente Test mit Protoplasten keine eindeutige Aussage über die intrazelluläre Lokalisierung von HvAAP1 und HvAAP2 zuließ, sollten zusätzlich stabil transformierte Pflanzen erzeugt werden. Aus Zeitgründen wurde *A. thaliana* verwendet, denn die Transformation von Arabidopsis ist eine schnelle, unkomplizierte Methode und bereits die reifen Samen der für die Transformation verwendeten Pflanzen sind transgen. Von selektierten Pflanzen sollten Protoplasten isoliert und auf GFP-Fluoreszenz untersucht werden. Die Etablierung stabiler homozygoter Linien war in diesem Fall nicht notwendig. Die *HvAAP1GFP* und *HvAAP2GFP* Fusionskonstrukte inklusive 35S Promotor und 35S PolyA-Signal wurden zu diesem Zweck mit den Restriktionsenzymen *HindIII/EcoRI* aus dem Vektor pFF19 ausgeschnitten, die Enden mit T4-Polymerase geglättet und in den mit *SmaI* geschnittenen und anschließend dephosphorylierten pflanzlichen Expressionsvektor pBAR kloniert. Die richtige Orientierung der Fragmente wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Die Konstrukte wurden durch Agrobacterium vermittelte Transformation in Arabidopsis-Pflanzen eingebracht. Pro Konstrukt wurden etwa 25 Pflanzen transformiert. Etwa 200 reife Samen dieser Pflanzen wurden dann in Erde ausgesät und die Keimlinge nach ca. 14 Tagen mit dem Herbizid Basta[®] besprüht. Der pBAR-Vektor vermittelt den Pflanzen eine Resistenz gegen Phosphinotricin und positive Pflanzen können auf diese Weise schnell selektiert und weiterkultiviert werden. Von den selektierten Pflanzen wurde zusätzlich mittels PCR auf die Anwesenheit des Transgens getestet und aus den Blättern PCR-positiver Pflanzen wurden Mesophyll-Protoplasten isoliert. Nach 24 h Inkubation wurden diese mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht. Die Abbildung 3.46 zeigt an ausgewählten Protoplasten eine GFP-Fluoreszenz des HvAAP1GFP-Fusionsproteins entlang der Plasmamembran. Schwache GFP-Signale finden sich auch im Zytoplasma in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran. Somit konnte HvAAP1 an der Plasmamembran lokalisiert werden. Protoplasten, die aus HvAAP2GFP Arabidopsis-Pflanzen isoliert wurden, zeigten keine GFP-Fluoreszenz, das Konstrukt wurde möglicherweise nicht exprimiert.

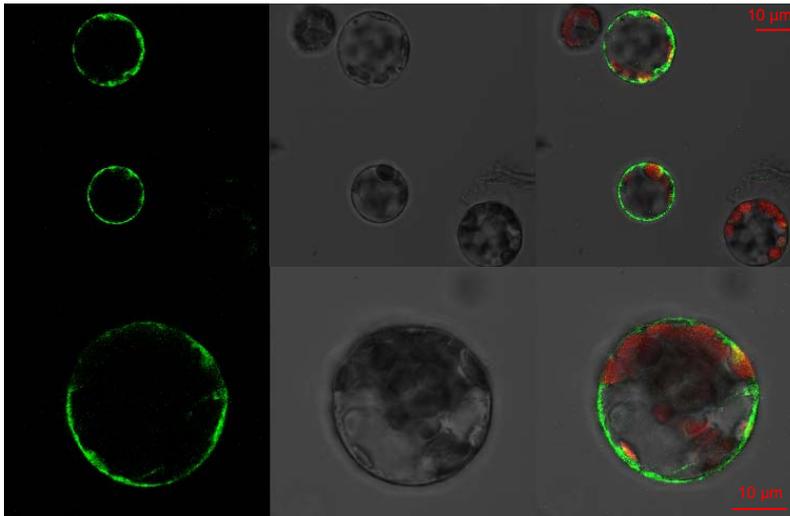


Abb. 3.46: Nachweis der GFP-Fluoreszenz des HvAAP1GFP-Fusionsproteins an der Plasmamembran von *A. thaliana* Protoplasten. Die Protoplasten wurden aus verschiedenen transgenen Arabidopsis-Pflanzen isoliert, 24 h dunkel inkubiert und dann am konfokalen Laserscanning Mikroskop auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Links: GFP-Fluoreszenz, Mitte: Hellfeldaufnahme, rechts: zusätzlich zur GFP-Fluoreszenz ist die Autofluoreszenz der Chloroplasten in rot dargestellt.

Überprüfung der Funktionalität der GFP-Fusionskonstrukte in *S. cerevisiae*

Um herauszufinden, ob die Aminosäurepermeasen HvAAP1 und HvAAP2 nach der Fusion mit GFP immer noch funktionell sind und Hefemutanten komplementieren können, wurden die Fusionskonstrukte in den Hefestamm 22574d transformiert. *HvAAP1GFP* wurde dazu mit dem Restriktionsenzym *XhoI* aus dem Plasmid pFF19 ausgeschnitten und in den ebenfalls *XhoI*-geschnittenen, dephosphorylierten Hefeexpressionsvektor pDR196 ligiert. *HvAAP2GFP* konnte aufgrund unpassender Schnittstellen nicht direkt aus pFF19 herausgeschnitten werden und musste mittels PCR unter Einbau von *SpeI*-Restriktionsschnittstellen am 5'- und 3'-Ende aus pFF19 amplifiziert werden. Das entsprechend verdaute Fragment wurde anschließend in den ebenfalls *SpeI*-gespaltenen, dephosphorylierten Vektor pDR196 kloniert. Der korrekte Einbau der Fragmente wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung bestätigt. Auf diese Weise entstanden die Plasmide pDR-HvAAP1GFP und pDR-HvAAP2GFP. Transgene Hefezellen wurden auf Selektivmedium mit den entsprechenden Aminosäuren als einzige N-Quelle ausgestrichen und auf Wachstum getestet. Die Hefezellen, die die AAPGFP-Fusionskonstrukte tragen, zeigten kein Wachstum auf den verwendeten selektiven Medien. Beide Konstrukte waren folglich nicht mehr in der Lage, die Mutationen des Stammes 22574d zu komplementieren. HvAAP1 und HvAAP2 allein konnten die Mutationen komplementieren. Das GFP-Fusionskonstrukt ist nicht mehr funktionell.

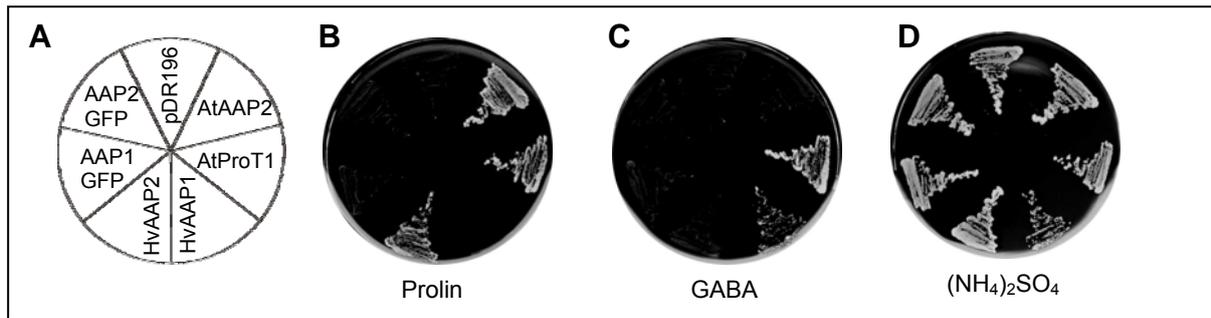


Abb. 3.47: Test auf funktionelle Komplementation der *S. cerevisiae* Mutante 22574d durch HvAAP1GFP und HvAAP2GFP. A: Ausstreichschema, B, C: Selektives Wachstum von Kolonien, die die cDNAs von *AtAAP2*, *AtProT1*, *HvAAP1* und 2 (Positivkontrollen), *HvAAP1GFP*, *HvAAP2GFP* sowie den leeren Vektor pDR196 (Negativkontrolle) tragen, auf MM-Medium mit 1 g/l Prolin (B) bzw. GABA (C). D: nicht-selektives Wachstum mit 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.2.5 HvGAP1 – eine putative GABA-Permease aus Gerste

Unter den 22 identifizierten putativen Aminosäuretransportern aus der Gersten-EST-Bank befand sich auch ein Mitglied der GAP-Familie (GABA-Permeasen), welche der übergeordneten APC-Familie angehört. Dieser mögliche GABA-Transporter wurde als HvGAP1 bezeichnet. Bisher wurde noch kein Mitglied der GAP-Familie aus Pflanzen beschrieben. Es gibt einen Transporter aus Arabidopsis (*AtGAT1*), der spezifisch GABA mit hoher Affinität transportiert, dieser gehört aber zur ATF-Familie (Meyer et al., 2006). Verschiedene Programme sagen für HvGAP1 12 membranspannende Domänen voraus, es handelt sich daher wahrscheinlich um ein membranständiges Protein. In Reis gibt es acht zu HvGAP1 ähnliche Sequenzen und eine in Arabidopsis. Die Blastp-Analyse ergab, dass HvGAP1 75 % identische Aminosäuren mit einer putativen GABA-Permease aus Reis und 65 % identische Aminosäuren mit einer putativen GABA-Permease aus Arabidopsis (*At2g01170*) hat. In *S. cerevisiae* gibt es drei GABA-Transportsysteme, die Gene *gap1*, *put4* und *uga4*. UGA4 ist eine auf Transkriptionsebene induzierbare GABA-spezifische Permease, die in der Vakuolenmembran der Hefezellen lokalisiert ist. Die Homologie zu HvGAP1 beträgt auf Aminosäureebene 30 %.

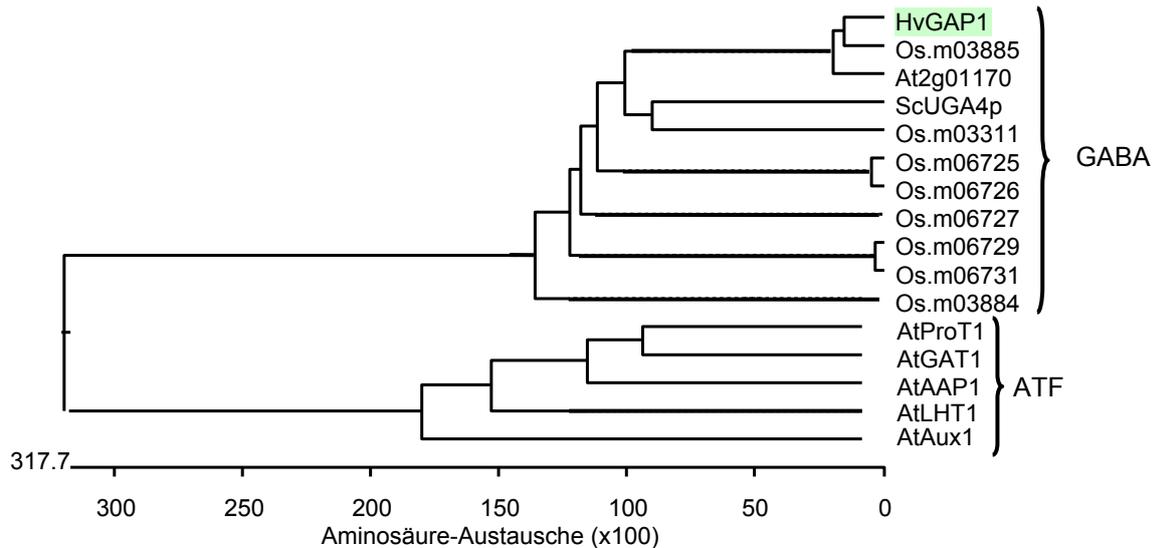


Abb. 3.48: Phylogenetischer Baum basierend auf dem Sequenzvergleich der Proteinsequenzen von HvGAP1 mit denen anderer putativer GABA-Permeasen. Mitglieder der ATF-Familie wurden als Abgrenzung zu den GABA-Permeasen mit einbezogen. (Clustal W Methode, MegAlign, DNASTar).

HvGAP1-Transkriptakkumulation während der Kornentwicklung und in vegetativen Geweben

Um zu untersuchen, in welchen Geweben und zu welchen entwicklungspezifischen Zeitpunkten *HvGAP1* vorrangig exprimiert wird, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Auch hier sollte die Frage geklärt werden, ob *HvGAP1* während der Samenentwicklung in maternalen und / oder filialen Geweben aktiv ist. Dazu wurde dieselbe Membran verwendet, die bereits mit den cDNAs der Aminosäurepermeasen *HvAAP1* und *HvAAP2* (vgl. Abschnitt 3.2.3) hybridisiert wurde. Für die Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte vollständige cDNA von *HvGAP1* verwendet. Wie die Abbildung 3.49 zeigt, wird *HvGAP1* am stärksten in Gerste-Keimlingen exprimiert. Die höchsten Transkriptmengen konnten in Keimlingswurzeln nachgewiesen werden. Das stärkste Signal stammt von Keimlingswurzeln, die auf feuchtem Filterpapier gewachsen sind. Hier trägt wahrscheinlich der Nährstoffmangel als Stressfaktor zu der starken Expression von *HvGAP1* bei. Weiterhin wurde *HvGAP1*-mRNA in Antheren und Gynoecium, also in männlichen und weiblichen Blütenbestandteilen, gefunden. Außerdem wird *HvGAP1* im Knoten am 4. DAF, in der Granne und in den Spelzen am 12. DAF sowie im frühen Perikarp (0. und 4. DAF) exprimiert. Das *HvGAP1*-Expressionsmuster weist Korrelationen mit dem der Cysteinproteinase auf (vgl. Abb. 3.44). Dies betrifft vor allem die Expression in den Spelzen und in Keimlingswurzeln. In der Endosperm-Fraktion sind während der gesamten Kornentwicklung keine *HvGAP1*-Transkripte nachweisbar. Auch dieser putative Transporter ist offensichtlich nicht samenspezifisch.

Die HvGAP1-Expression ist lichtreguliert

Mit *HvGAP1* wurden mehrere Northern Analysen durchgeführt, deren Ergebnisse zum Teil nicht miteinander vergleichbar waren. Es wurde spekuliert, dass die unterschiedliche *HvGAP1*-Expression möglicherweise auf die unterschiedliche Tageszeit der Ernte des Pflanzenmaterials zurückgeführt werden kann. Deshalb wurde eine Northern Blot Analyse mit Keimlingen durchgeführt, die zu sechs verschiedenen Tageszeiten geerntet wurden. Die Auswertung der Hybridisierungssignale zeigte eine kontinuierliche Zunahme der Signalintensität von 6 Uhr über 10 Uhr bis zu einem Maximum der *HvGAP1*-Transkriptakkumulation um 14 Uhr (Abb. 3.51). Danach nahm das mRNA-Expressionslevel wieder ab und war zwischen 22 Uhr und 6 Uhr kaum nachweisbar. *HvGAP1* ist folglich in starkem Maße lichtreguliert, mit Beginn der Tagphase steigt die Expression an, hat ihren Höhepunkt am frühen Nachmittag und fällt zum Abend hin wieder ab.

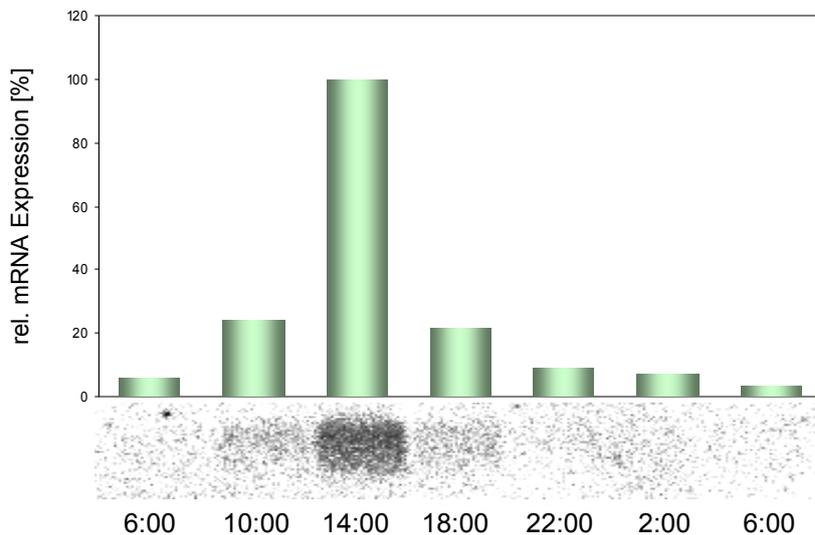


Abb. 3.51: Northern Analyse der *HvGAP1* Transkripte in Keimlingen von *H. vulgare*. Von 8 Tage alten Keimlingen wurde beginnend mit 6:00 Uhr morgens alle vier Stunden eine Blattprobe entnommen und daraus RNA isoliert. 10 µg RNA wurde anschließend auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit der radioaktiv markierten *HvGAP1* cDNA-Sonde hybridisiert. Die Auswertung der Signalintensität erfolgte mit dem Phosphorimager. Das stärkste Signal wurde auf 100 % gesetzt.

Funktionelle Testung in *S. cerevisiae*

Um auch für den putativen GABA-Transporter *HvGAP1* eine Funktionalität nachzuweisen, wurde dieser analog zu den beiden Aminosäurepermeasen in den Hefeexpressionsvektor pDR196 kloniert. *HvGAP1* wurde dazu unter Einbau der Restriktionsschnittstellen *SpeI* an beiden Enden mittels PCR amplifiziert und in den entsprechend verdauten und dephosphorylierten pDR196 ligiert. Es entstand das Plasmid pDR-*HvGAP1*. Zusätzlich wurde ein *HvGAP1GFP*-Fusionskonstrukt mit *BamHI* und *SphI* aus dem Plasmid pFF19

ausgeschnitten, die Enden geglättet und in den mit *Sma*I geschnittenen und dephosphorylierten pDR196 kloniert. Das *HvGAP1GFP*-Fusionskonstrukt (Plasmid pFF19) sollte für Lokalisierungsversuche benutzt werden und die Erstellung ist im nächsten Abschnitt genauer beschrieben. Die beiden Konstrukte wurden in den Hefestamm 22574d transformiert. Sowohl *HvGAP1* ohne GFP als auch das *HvGAP1GFP*-Fusionskonstrukt sind beide nicht in der Lage, eine der Mutationen im Hefestamm 22574d zu komplementieren. Hefezellen, die mit diesen Konstrukten transformiert wurden, können auf Minimalmedium, das Prolin oder GABA als einzige N-Quelle enthält, nicht wachsen. Auf der Kontrollplatte mit Ammoniumsulfat als N-Quelle wachsen alle Hefezellen, somit sind die Konstrukte in Ordnung. *HvGAP1* ist demzufolge in diesem Hefestamm nicht funktionell, ebenso das GFP-Fusionskonstrukt. Es wäre aber denkbar, dass *HvGAP1* in der Pflanze in anderen Organellen als der Plasmamembran eine Funktion übernimmt und dies kann mit dem verwendeten Hefestamm nicht überprüft werden.

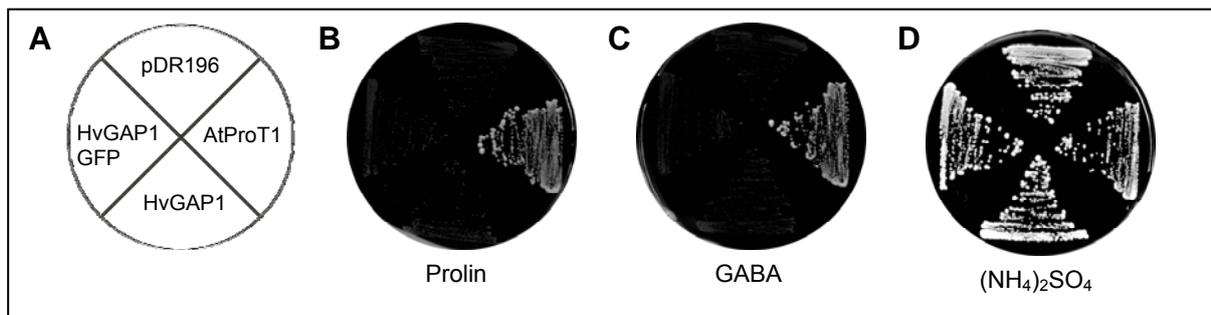


Abb. 3.52: Test auf funktionelle Komplementation der *S. cerevisiae* Mutante 22574d durch *HvGAP1* und *HvGAP1GFP*. A: Ausstreichschema, B, C: Selektives Wachstum von Kolonien, die die cDNAs von *AtProT1* (Positivkontrolle), *HvGAP1* und *HvGAP1GFP* sowie den leeren Vektor pDR196 (Negativkontrolle) tragen, auf MM-Medium mit 1 g/l Prolin (B) bzw. GABA (C). D: nicht-selektives Wachstum mit 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Intrazelluläre Lokalisierung von *HvGAP1*

Ein *HvGAP1GFP* Fusionskonstrukt wurde erstellt, um *HvGAP1* über die GFP-Fluoreszenz innerhalb der Zelle zu lokalisieren. Dazu wurde *HvGAP1* unter Einbau der Schnittstellen *Bam*HI und *Xba*I und gleichzeitiger Entfernung des GAP1-internen Stoppcodons mittels PCR amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde nach Restriktionsspaltung in den mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pFF19 ligiert und dabei C-terminal mit GFP fusioniert. Der korrekte Einbau des GAP1-Fragments und die Beibehaltung des offenen Leserahmens am Übergang zum GFP-Gen wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt.

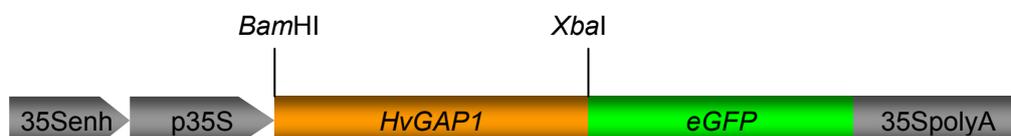


Abb. 3.53: HvGAP1GFP-Fusionskonstrukt. 35Senh, p35S: 35S-Enhancer- bzw. Promotorsequenz aus dem Blumenkohlmosaikvirus, 35SpolyA: 35S-Polyadenylierungssignal, *HvGAP1GFP*: *HvGAP1* cDNA fusioniert an GFP, *eGFP*: enhanced GFP

Das erhaltene Konstrukt wurde für die transiente Expression in Protoplasten aus Gerste-Suspensionskulturen transformiert und diese nach ein bis zwei Tagen am konfokalen Laserscanning Mikroskop auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Die erhaltenen Bilder lieferten jedoch keine eindeutige Aussage über die Lokalisierung von *HvGAP1*. Es gab GFP-Signale entlang der Membransysteme der Zelle, zum Teil war die Plasmamembran markiert (Abb. 3.54 A und B). Zusätzliche Markierungen wurden an der Kernmembran und Vakuolenmembran detektiert. Einige Protoplasten zeigten eine fleckenartige GFP-Verteilung innerhalb der Zelle. Ob es sich dabei um zelluläre Strukturen (z.B. Organellen) oder aber um GFP-Artefakte handelt, konnte nicht entschieden werden. Abbildung 3.54 C zeigt einen Protoplasten mit solchen fleckenartigen Strukturen, möglicherweise handelt es sich dabei um eine Markierung der Mitochondrien.

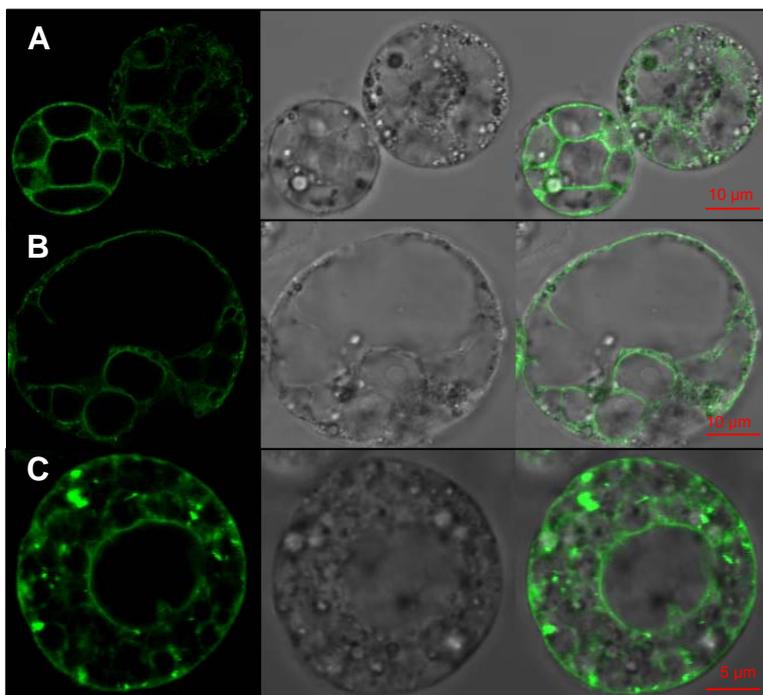


Abb. 3.54: Nachweis der GFP-Fluoreszenz von *HvGAP1GFP* in *H. vulgare* Protoplasten. Die Protoplasten wurden nach 48 h nach der Transformation am konfokalen Laserscanning Mikroskop auf GFP-Fluoreszenz untersucht.

Ist HvGAP1 ein mitochondrialer Transporter?

Der sogenannte „GABA-shunt“, ein Stoffwechselweg, über den GABA metabolisiert wird, läuft teilweise in den Mitochondrien ab. Dabei handelt es sich um einen Nebenweg des Zitratzyklus, an dem drei verschiedene Enzyme beteiligt sind (Abb. 3.55). Für den GABA-Eintransport in die Mitochondrien ist ein Transporter nötig. Möglicherweise übernimmt *HvGAP1* diese Funktion.

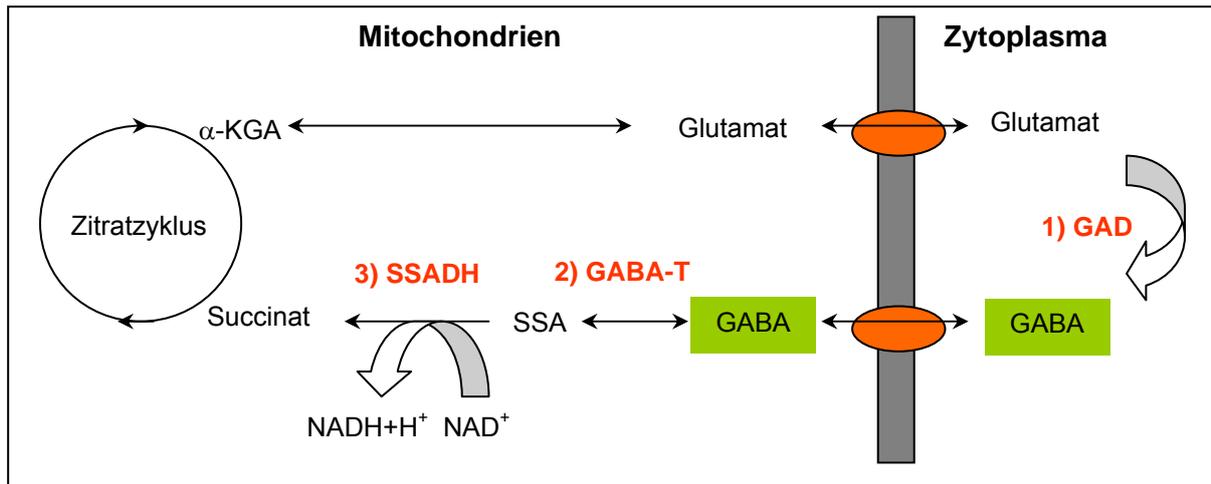


Abb. 3.55: Schematische Darstellung des „GABA-shunt“ (modifiziert nach Bouché et al. (2003a)). GAD: Glutamat-Dehydrogenase, GABA-T: GABA-Transaminase, SSADH: Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase, α-KGA: α-Ketoglutarat. Die GAD katalysiert die irreversible Decarboxylierung von Glutamat zu GABA. Dieser Schritt findet im Zytoplasma statt. Dann wird GABA über einen bisher unbekanntem Transportmechanismus in die Mitochondrien transportiert und dort von der GABA-Transaminase in einem reversiblen Schritt zu Succinatsemialdehyd umgewandelt. Das dritte Enzym, die SSADH, oxidiert das Succinatsemialdehyd zu Succinat, welches dann in den Zitratzyklus fließt. Bei diesem Schritt entstehen NADH und Protonen.

Da der „GABA-shunt“ in ähnlicher Weise auch in Hefen abläuft, wurde ein Versuch zur funktionellen Testung von HvGAP1 als mitochondrialer Transporter mit isolierten Mitochondrien aus einem mit *HvGAP1* transformierten *S. cerevisiae* Stamm durchgeführt. Über die Messung der Atmungsrate in einer Mitochondriensuspension nach Zugabe von Succinat bzw. GABA sollte indirekt bestimmt werden, ob HvGAP1 am Transport von GABA in die Mitochondrien beteiligt sein könnte und somit in der Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Succinat als direktes Substrat für die Zellatmung diente dabei als Positivkontrolle. Wenn bei Zugabe von Succinat Atmungsrate gemessen werden können, sind die Mitochondrien intakt. Wird GABA verwendet, muss es in den Mitochondrien zunächst zu Succinat umgewandelt werden, es stellt somit ein indirektes Substrat dar. Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Suspensionsmedium ist ein Maß für die Atmung. Der *S. cerevisiae* Stamm 22574d wurde mit dem Konstrukt pDRHvGAP1 transformiert, und aus einer 11-Kultur transgener Hefezellen wurden mittels differentieller Zentrifugation intakte Mitochondrien isoliert. Anschließend wurden die Atmungsrate der Mitochondrien bei Zugabe von Succinat bzw. GABA verglichen. Dabei wurde der Sauerstoffverbrauch in nmol pro mg Protein pro Minute berechnet. Nach Zugabe von Succinat zur Mitochondriensuspension liegt der O₂-Verbrauch bei etwa 10 nmol und steigt bei Zusatz von Gramicidin auf ca. 18 nmol an. Gramicidin bewirkt als Entkoppler den Einstrom von Protonen in die Mitochondrien, ohne dabei ATP aus ADP zu generieren. Bei Zugabe von GABA anstelle des Succinats zur Mitochondriensuspension konnte kein O₂-Verbrauch nachgewiesen werden. Auch die Zugabe von Gramicidin führte zu keiner gravierenden

Änderung. Erst der Zusatz von Succinat führte wieder zu einem Anstieg des O₂-Verbrauchs in der Mitochondriensuspension. Damit GABA von den Mitochondrien als Substrat verwendet werden kann, muss es zunächst in die Mitochondrien eintransportiert werden. Dort wird es dann in Succinat umgewandelt (vgl. Abbildung 3.55). Mitochondrien aus mit *HvGAP1* transformierten Hefezellen sind offensichtlich nicht in der Lage, GABA einzutransportieren. Es kann demzufolge davon ausgegangen werden, dass HvGAP1 in Hefen nicht in der Mitochondrienmembran lokalisiert ist.

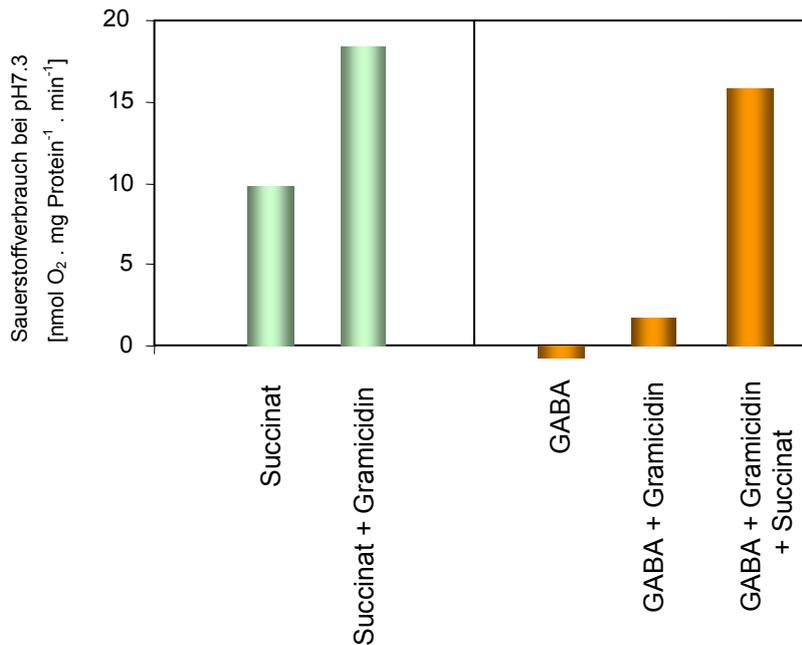


Abb. 3.56: Bestimmung der Atmungsrate in einer Mitochondriensuspension. Die Mitochondrien wurden aus dem Hefestamm 22574d isoliert, der zuvor mit *HvGAP1* transformiert wurde.

4 Diskussion

4.1 N-Transporter aus Leguminosen

Teil eins der vorliegenden Arbeit befasste sich zunächst mit der weiterführenden Charakterisierung des Peptidtransporters 1 aus *V. faba* (VfPTR1). Dabei sollte das Expressionsmuster von *VfPTR1* mit Hilfe von Promotor/Reporterfusionen genauer untersucht und der Transporter außerdem innerhalb der Zelle lokalisiert werden. Hauptanliegen dieses Teils der Arbeit war jedoch die Erzeugung und Analyse transgener Erbsenpflanzen, die die funktionell charakterisierten Transporter *VfAAP1* und *VfPTR1* unter Kontrolle des phloemspezifischen *AtSUC2*-Promotors exprimieren.

4.1.1 Charakterisierung des Peptidtransporters VfPTR1

Ausgehend vom 5'-Ende der *VfPTR1* cDNA-Sequenz konnten mittels *genome walking* zwei putative *PTR1*-Promotorfragmente amplifiziert werden, die jeweils typische *cis*-regulatorische Promotorelemente enthielten. Nur eines dieser Fragmente konnte in transient transformierten Protoplasten die Expression des GUS-Reportergens vermitteln (vgl. Abb. 3.5) und muss folglich alle nötigen regulatorischen Elemente für eine Expression in Protoplasten enthalten. In der Sequenz des nicht aktiven Fragments befinden sich putative *core*-Promotorelemente wie TATA- und CAAT-Box stromabwärts des vorhergesagten Transkriptionsstartpunktes. Möglicherweise ist dies ein Grund dafür, dass keine Transkription des GUS-Gens initiiert werden konnte. Ein *genome walking* ausgehend von beiden Promotorfragmenten in 3'-Richtung resultierte in der Amplifizierung von zwei zu *VfPTR1* ähnlichen Sequenzen, die jedoch nur innerhalb der ersten 157 bp identische Nukleotide aufwiesen. Die ausgehend vom aktiven Promotorfragment amplifizierte Sequenz entspricht *VfPTR1*, in der Sequenz ausgehend vom inaktiven Promotorfragment wurde durch eine Punktmutation an Position 13 ein Stoppcodon eingeführt. Möglicherweise handelt es sich bei diesem amplifizierten Bereich um Teile eines Pseudogens.

Die spezifische Expression eines Gens kann durch das Vorhandensein entsprechender *cis*-Elemente in ihren Promotoren kontrolliert werden. In der Sequenz des *VfPTR1*-Promotors wurden mehrere *cis*-regulatorische Elemente gefunden, darunter ein Endosperm-Element (Stalberg et al., 1996), eine GATA-Box, die in die Lichtregulation involviert ist (Lam and Chua, 1989), ein *auxin responsive element* (Ulmasov et al., 1999) und ein ABRE-Motiv (Simpson et al., 2003). Inwieweit diese Regulatorelemente einen Einfluss auf die

Promotoraktivität haben, bleibt noch zu untersuchen. Außerdem könnte überprüft werden, ob sich die Promotoraktivität auch durch die von VfPTR1 transportierten Substrate beeinflussen lässt. Durch Zugabe des Dipeptids His-Ala in das Protoplasten-Kulturmedium konnte in ersten Versuchen keine Veränderung der Promotoraktivität verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Die Transkriptmengen von *VfPTR1* in Wurzeln sinken leicht bei Zugabe geringer Konzentrationen des Dipeptids Leu-Leu oder der Aminosäure Glutamin (Miranda et al., 2003). Einige N-Transporter wie z. B. VfAAP1 werden durch Aminosäuren negativ reguliert (Miranda et al., 2001).

Northern Blot Analysen haben gezeigt, dass *VfPTR1* stark in Keimlingswurzeln exprimiert wird. *VfPTR1* Transkripte wurden auch im Hypokotyl sowie in den keimenden Kotyledonen gefunden. Promotor/GFP-Untersuchungen an Tabakwurzeln haben Fluoreszenzsignale in den Zellen gezeigt, die den Zentralzylinder umgeben. Die unmittelbare Wurzelspitze war nicht markiert, Signale gab es erst in der Streckungszone. Mittels GUS-Färbungen an transgenen Tabakpflanzen konnte eine Aktivität des *PTR1*-Promotors ebenfalls in Wurzeln nachgewiesen werden. Dabei waren vor allem Parenchymzellen, aber auch die Epidermis und Wurzelhaare gefärbt. Diese Ergebnisse korrelieren mit früheren Northern Analysen und *in situ* Hybridisierungen, in denen bereits eine Expression von *VfPTR1* in keimenden Kotyledonen und in der Wurzel nachgewiesen werden konnte (Miranda et al., 2003). Die Ergebnisse unterstützen die für VfPTR1 vermutete Rolle bei der Aufnahme von Peptiden aus der Speicherproteinhydrolyse in die Leitgewebe des Keimlings. Möglicherweise hat VfPTR1 eine direkte Funktion bei der Phloembeladung. Dies gewährleistet, dass organischer Stickstoff für die wachsenden Gewebe bereitgestellt werden kann. Die Expression in der Wurzelepidermis und in Wurzelhaaren deutet auf eine weitere Funktion von VfPTR1 bei der Aufnahme von Peptiden aus dem Boden hin. In *Ricinus communis* wurde ein protonenabhängiges Aminosäureaufnahmesystem beschrieben und *RcAAP1*-Transkripte in Wurzelhaaren weisen darauf hin, dass dieser Transporter an der Aufnahme von Aminosäuren aus dem Boden beteiligt sein könnte (Bick et al., 1998; Weston et al., 1994). AAP1 aus *Arabidopsis* wird in der Wurzelhaube, der Wurzelepidermis und in den Wurzelhaaren exprimiert und transportiert neutrale Aminosäuren in die Wurzeln (Lee et al., 2007). Es gibt Hypothesen über die mögliche Rolle von Peptidtransportern bei der direkten Aufnahme kleiner Peptide aus dem Boden (Waterworth et al., 2001). Einige Pflanzen scheinen ihren Bedarf an organischem Stickstoff, wie z. B. Aminosäuren und Peptiden, direkt durch die Aufnahme aus dem Boden zu decken (Yamagata et al., 2001). Zusätzlich zu den Markierungen in Wurzeln konnte eine GUS-Aktivität im Stängel im Bereich des Blattansatzes gezeigt werden. Die Blaufärbung der Parenchymzellen nimmt von außen nach innen ab, das Leitgewebe scheint nicht markiert zu sein. Es kann spekuliert werden, dass VfPTR1 hier möglicherweise eine Funktion beim Transport von Peptiden innerhalb des Stängels

übernimmt. Erbsensamen, die pPTRGFP exprimieren, zeigten Fluoreszenzsignale in den Epidermis- und Parenchymzellen der Kotyledonen (26 DAF), wobei die äußeren Zellreihen stärker markiert, die inneren hingegen ohne Fluoreszenz waren. Somit konnte bestätigt werden, dass der *PTR1*-Promotor im mittleren Samenentwicklungsstadium aktiv ist. Die Aktivität von Peptidtransportern der PTR-Familie scheint generell mit intensiver Proteolyse (z. B. Verwundung, Seneszenz, Abbau von Speicherproteinen) assoziiert zu sein (Stacey et al., 2002). In diesen Phasen ist der Transport von Peptiden sehr wichtig, um organischen Stickstoff möglichst schnell zu exportieren (Higgins and Payne, 1978). Es ist denkbar, dass die Substrate für VfPTR1 aus der Remobilisierung während der Blattseneszenz stammen, die parallel zur Samenentwicklung abläuft. Der *VfPTR1*-Promotor ist in der Epidermis der Kotyledonen aktiv und epidermale Transferzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Nährstoffen in die Kotyledonen (Offler et al., 1989; Weber et al., 1998a). Verschiedene Transporter für Saccharose, Hexosen und Aminosäuren von *V. faba* und *P. sativum* werden in diesen Zellen exprimiert (Tegeeder et al., 2000; Tegeeder et al., 1999; Weber et al., 1997b). Die Expression von *VfPTR1* in den Parenchymzellen der Kotyledonen lässt auf eine weitere Funktion beim Transport innerhalb des Samens schließen.

Bisher wurden drei PTR-Mitglieder aus Arabidopsis und ein PTR aus Gerste beschrieben. Ähnlichkeiten im Expressionsmuster finden sich beim Vergleich von *VfPTR1* mit den Arabidopsis-PTRs. *AtPTR1* wird in allen Organen exprimiert, hauptsächlich aber in Leitgeweben und während der Keimung (Dietrich et al., 2004). Dies deutet auf eine Rolle im Langstreckentransport hin, möglicherweise bei der Beladung des Phloems mit Peptiden aus *source*-Organen. *AtPTR1* könnte zusätzlich eine Funktion bei der Versorgung der Samen mit organischem N haben (Hirner et al., 1998) sowie bei der Remobilisierung von Peptiden aus dem Speicherproteinabbau. Auch *AtPTR2*-Transkripte konnten in allen Teilen der Pflanze nachgewiesen werden, vor allem aber in jungen Blättern, Wurzeln und Keimlingen (Song et al., 1996). Für *AtPTR2* wird eine eher generelle Funktion im Peptidtransport vorgeschlagen, bei der Versorgung der Pflanze mit einer Mindestmenge an Peptiden. *VfPTR1* weist auf Proteinebene 76 % identische Aminosäuren zu *AtPTR2* und 62 % zu *AtPTR1* auf und ist somit zumindest hinsichtlich der Sequenz das orthologe Protein zu *AtPTR2*. Die Expression von *AtPTR3* wird durch Verwundung und Salzstress induziert, das Protein ist aber noch nicht funktionell charakterisiert worden (Karim et al., 2005). Im Gegensatz zu *VfPTR1* und den Arabidopsis-PTRs wird *HvPTR1* stark gewebespezifisch im Scutellum des Keimlings exprimiert (West et al., 1998). Während der Keimung werden Peptide wahrscheinlich aus dem Endosperm, in dem die Speicherproteinhydrolyse stattfindet, über das Scutellum in die wachsenden Embryonen aufgenommen.

Ursprünglich war geplant, den *VfPTR1*-Promotor für die Erzeugung von *VfPTR1 antisense* Erbsenpflanzen zu verwenden. Damit sollte untersucht werden, inwieweit VfPTR1 raten-

limitierend in bezug auf Samenproteingehalt bzw. Remobilisierung ist. Zwar gelang die Regeneration transgener Erbsenpflanzen, jedoch konnten keine stabilen Linien erzeugt werden. Die Primärtransformanten verloren das Transgen in der Folgegeneration wieder und somit konnten keine Erkenntnisse über die raten-limitierende Rolle von VfPTR1 in Erbse gewonnen werden. In *Arabidopsis* führt die *antisense*-Expression von *AtPTR2* zu einer verspäteten Blüte und beeinträchtigt die Samenentwicklung. Die Pflanzen haben weniger, dafür aber größere Samen (Song et al., 1997).

4.1.2 Intrazelluläre Lokalisierung von VfPTR1

Der Peptidtransporter VfPTR1 wurde bereits ausführlich charakterisiert, über die Lokalisierung des Proteins innerhalb der Zelle war jedoch nichts bekannt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die subzelluläre Lokalisierung untersucht werden. Um Transporter intrazellulär zu lokalisieren, werden häufig translationale Fusionen mit GFP benutzt. Bei der transienten Expression in *V. faba* Protoplasten gab es zunächst deutliche Hinweise darauf, dass VfPTR1 in der Vakuolenmembran lokalisiert ist. Alle transformierten Protoplasten zeigten die gleiche klare Markierung der Zentralvakuole sowie, wenn vorhanden, von kleineren Vakuolen. Dieses Ergebnis war unerwartet, da VfPTR1 eine PTR-Hefemutante funktionell komplementieren kann und somit zumindest bei der Expression in Hefe in der Plasmamembran lokalisiert sein müsste. Der für die Komplementation verwendete Hefestamm LR2 trägt Mutationen im *PTR2*-Gen, in seinem Histidinpermease-Gen und ist zusätzlich *his*-auxotroph, d.h. dieser Stamm kann nicht auf Medium wachsen, welches Histidin ausschließlich in Form von Dipeptiden enthält (Rentsch et al., 1995). Vom Hefesystem kann allerdings nicht unmittelbar auf die Situation *in planta* geschlossen werden. N-Transporter übernehmen nicht nur eine Funktion beim Transport von Nährstoffen über die Plasmamembran, sondern sind auch in intrazellulären Membranen wie der Vakuolenmembran notwendig. Vakuoläre Transporter sind Teil eines komplexen Netzwerks, das es der Pflanze ermöglicht, schnell auf wechselnde Umweltbedingungen zu reagieren (Martinoia et al., 2007). Tonoplast-lokalisierte Aminosäure- und Peptidtransporter könnten dabei eine wichtige Rolle bei der vorübergehenden Speicherung von Nährstoffen innerhalb der Vakuole spielen. In Zeiten des Nährstoffüberangebotes können diese gespeichert und bei Nährstoffknappheit wieder ins Zytoplasma abgegeben werden. Somit wird eine gleich bleibende Konzentration von Nährstoffen aufrechterhalten. Die putative Funktion von VfPTR1 bei der Beladung des Phloems mit Peptiden lässt sich nicht so einfach mit einer vakuolären Lokalisierung in Einklang bringen. Phloemzellen besitzen nur wenige kleine Vakuolen. Auch die mögliche Rolle bei der Aufnahme von Peptiden aus dem Boden in die

Wurzelhaare spricht eher für eine Lokalisierung von VfPTR1 in der Plasmamembran. Eine Überprüfung des VfPTR1GFP-Fusionskonstruktes auf funktionelle Komplementation der Hefemutante LR2 zeigte, dass das Fusionsprotein nicht mehr funktionell ist, wohingegen VfPTR1 ohne GFP in der Lage war, die Mutation im endogenen Peptidtransporter zu komplementieren. Es kann vermutet werden, dass sich das GFP in irgendeiner Weise störend auf die Funktionalität von VfPTR1 auswirkt. Beispielsweise könnte die korrekte Integration des Fusionsproteins in die Plasmamembran durch GFP am C-Terminus verhindert werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass VfPTR1 zwar in die Plasmamembran gelangt, dort aber aufgrund sterischer Behinderungen durch GFP die Transportfunktion nicht mehr ausführen kann. Möglicherweise ist die Substratbindungsstelle durch GFP nicht mehr zugänglich, folglich könnten keine Peptide gebunden werden. Außerdem könnte die korrekte Faltung des VfPTR1-Proteins nicht mehr gewährleistet sein, was ebenfalls zu einem Funktionsverlust führen würde. Es bleibt zu untersuchen, ob eine Fusion des GFP am N-Terminus von VfPTR1 zu den gleichen Resultaten führt oder ob ein solches Konstrukt funktionell wäre. Von AtPTR1 ist bekannt, dass sowohl N- als auch C-terminale Fusionen mit GFP in Hefe funktionell sind und den Eintransport von Dipeptiden (His-Ala) vermitteln. GFP-AtPTR1 konnte jedoch kein Wachstum auf limitierenden Histidinkonzentrationen bewirken. Das zu VfPTR1 auf Sequenzebene orthologe Protein aus Arabidopsis, AtPTR2, konnte den Transport von Peptiden vermitteln, wenn es heterolog in Hefezellen exprimiert wird (Song et al., 1996). AtPTR2 wurde kürzlich bei verschiedenen Proteom-Untersuchungen an isolierten Vakuolen aus Arabidopsis in der Vakuolenmembran lokalisiert (Carter et al., 2004; Shimaoka et al., 2004).

Alternativ zur Lokalisierung über eine GFP-Fusion wurde ein VfPTR1c-myc Konstrukt erstellt und mittels eines anti-*c-myc* Antikörpers sollte dieses Fusionsprotein intrazellulär lokalisiert werden. Der *c-myc tag* ist deutlich kleiner als GFP und sollte sich weit weniger störend auf Konformation und Funktionalität des Fusionsproteins auswirken. Das *c-myc* Peptid wurde in den intrazellulären *loop* von VfPTR1 eingebaut. Vom Saccharosetransporter AtSUC3 aus Arabidopsis ist bekannt, dass ein solcher *loop* nicht für die Transportfunktion in AtSUC3 exprimierenden Hefezellen benötigt wird (Meyer et al., 2000). Das VfPTR1c-myc Fusionskonstrukt war in Hefe funktionell, somit beeinträchtigt das *c-myc* Peptid nicht die Funktion des Transporters. In transient transformierten Protoplasten konnte jedoch keine Aussage zur Lokalisierung von VfPTR1 getroffen werden, da durch den Fixierungs- und Einbettungsprozess die Strukturhaltung der Protoplasten nicht mehr gegeben war. Goldmarkierungen an Membransystemen konnten keinem genauen Membrantyp zugeordnet werden.

Durch die Verwendung von Peptidantikörpern, die gegen den N- und C-Terminus von VfPTR1 gerichtet waren, gelang eine spezifische Markierung der Plasmamembran. Die

Entscheidung für Peptidantikörper wurde getroffen, da das vollständige VfPTR1-Protein als Antigen nicht zur Verfügung stand. Membranproteine lassen sich in *E. coli* und auch im Hefesystem nur sehr schwer in großen Mengen exprimieren. Die ausgewählten Sequenzen vom N- und C-Terminus weisen nahezu keine Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen auf und eignen sich somit sehr gut als Antigene. In fixierten Zellen aus *V. faba* Suspensionsgewebekulturen konnten elektronenmikroskopisch spezifische Goldmarkierungen entlang der Plasmamembran gezeigt werden. Intrazelluläre Membranen und vor allem die Vakuolenmembran waren nicht markiert. Durch diese Versuche wird die ursprüngliche Vermutung einer Plasmamembranlokalisierung bestätigt. Der Peptidtransporter AtPTR1 konnte mittels GFP-Fusionen an der Plasmamembran lokalisiert werden. Allerdings war bei der N-terminalen Fusion das *targeting* nicht vollständig und intrazelluläre Membranen zeigten ebenfalls eine Markierung (Dietrich et al., 2004). Für HvPTR1 wurde ebenfalls eine Lokalisierung in der Plasmamembran beschrieben (Waterworth et al., 2000). Der anti-VfPTR1 Antikörper detektiert im Western Blot in Proteinextrakten aus *V. faba* Keimlingswurzeln und Suspensionszellen eine spezifische Bande mit einer Größe von ca. 55 kDa. Diese Bande lässt sich durch eine Vorinkubation des Antiserums mit den Peptiden erfolgreich kompetitieren. Die Bande bei 55 kDa liegt etwa 10 kDa unter dem theoretisch berechneten Molekulargewicht für VfPTR1. Dies ist allerdings für Membranproteine nicht ungewöhnlich und kann mit deren hoher Lipophilität begründet werden. Zusätzlich zu der wahrscheinlich VfPTR1 entsprechenden Bande wird im Western Blot eine weitere Bande von weitaus stärkerer Intensität mit einer Größe von etwa 28 kDa detektiert. Diese lässt sich nicht sichtbar mit den eingesetzten Peptidkonzentrationen kompetitieren. Ob es sich bei dieser Bande um eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit einem anderen Protein handelt, kann nur spekuliert werden. Denkbar wäre auch ein durch Endoproteasen entstandenes Spaltprodukt von VfPTR1. Aus dem entsprechenden Coomassie-gefärbten Proteingel wurden Banden in der Höhe von 55 kDa sowie 28 kDa ausgeschnitten und einer ersten Peptidepitopanalyse unterzogen. Dabei wurden keine mit VfPTR1 oder anderen Transportern verwandten Sequenzbereiche identifiziert. Möglicherweise aber ist VfPTR1 nur in geringen Mengen in den Extrakten vorhanden, da die spezifische Bande von anderen Proteinen überlagert wird. Ein erneuter Versuch mit einer größeren Auftrennung der einzelnen Banden speziell im Bereich von 28 kDa könnte mehr Aufschluss geben. Aufgrund der Western Blot Ergebnisse kann nicht mit Gewissheit gesagt werden, dass die in der Immunogoldmarkierung beobachtete Plasmamembranmarkierung tatsächlich von VfPTR1 stammt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Lokalisierung von VfPTR1 in der Vakuolenmembran fraglich ist, da das VfPTR1/GFP-Fusionsprotein nicht mehr funktionell ist. Der VfPTR1 Antikörper eignet sich gut für die Immunlokalisierung mittels

Elektronenmikroskop, erkennt jedoch im Western Blot eine zusätzliche Bande, von der nicht klar ist, ob sie VfPTR1 zugeordnet werden kann.

4.1.3 Phloemspezifische Expression von VfAAP1 und VfPTR1 in *P. sativum*

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Aminosäurepermease VfAAP1 und der Peptidtransporter VfPTR1 unter Kontrolle des phloemspezifischen *AtSUC2*-Promotors in Erbse exprimiert werden. Der *SUC2*-Promotor ist im Phloem aller grünen Gewebe von *Arabidopsis* aktiv, wie z. B. Rosettenblätter, Stängel und Kelchblätter (Truernit and Sauer, 1995). Während *AtSUC2* in jungen *sink*-Blättern nur an der Blattspitze exprimiert wird, ist der Promotor in voll ausgebildeten *source*-Blättern in allen Blattadern aktiv. Zusätzlich zur Expression in Blättern zeigt *AtSUC2* auch in anderen *sink*-Gewebe wie Wurzeln oder sich entwickelnden Schoten eine Aktivität. Eine Funktionalität des Promotors konnte auch in Tabak demonstriert werden (Wright et al., 2003). Somit ist anzunehmen, dass *AtSUC2* auch für die Expression in Erbse erfolgreich verwendet werden kann. Die Expression von VfAAP1 und VfPTR1 in Leitgeweben oder mit Leitgeweben assoziierten Geweben lässt auf eine Rolle bei der Phloembeladung schließen. Das Ziel dieses Ansatzes war es, die Translokation von Aminosäuren und Peptiden aus den Blättern in das Phloem zu erhöhen und somit einen gesteigerten Nährstofffluss zu erreichen. Dies könnte die Remobilisierung verbessern und es wäre möglich, dass mehr Aminosäuren und Peptide in die wachsenden Samen aufgenommen und für die Speicherproteinsynthese verwendet werden können. Dies könnte letztlich zu einer Erhöhung des Proteingehaltes in den reifen Samen führen.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, für beide Konstrukte (*sucAAP* und *sucPTR*) transgene Erbsenpflanzen zu regenerieren und stabile homozygote Linien zu etablieren. Die Expression von VfPTR1 bzw. VfAAP1 in Blättern transgener Pflanzen konnte mittels RT-PCR bzw. qRT-PCR gezeigt werden. Demzufolge ist der *AtSUC2*-Promotor auch in Erbsenpflanzen aktiv und induziert die Expression der nachgeschalteten Gene. Allgemein konnte gezeigt werden, dass die phloemspezifische Expression von VfAAP1 und VfPTR1 zu einer Erhöhung des Globulingehaltes in den reifen Samen führt. Dies konnte für jeweils zwei unabhängige Linien der T₂-Generation von *sucAAP* bzw. *sucPTR* gezeigt werden (vgl. Abb. 3.25). Es wurde entschieden, für weitere Anzuchten nur mit der Linie 5 (*sucAAP*) bzw. 31 (*sucPTR*) weiter zu arbeiten, da diese in der T₂ die stärksten Effekte zeigten. Die in der T₂-Generation gemessene Proteinerhöhung konnte in den Folgegenerationen bestätigt werden und betraf auch dort nur die Globulinfraction, welche den mengenmäßig größten Anteil der Speicherproteine ausmacht. Prozentual ausgedrückt lag die Steigerung des Globulingehaltes für das *sucAAP*-Konstrukt bei zwei verschiedenen Nachkommen der Linie 5 (5/3 und 5/8)

zwischen 11 % und 16 %. Das Samengewicht von sucAAP Samen war im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Bei verschiedenen Nachkommen der Linie 31 (sucPTR 31/2 und 31/9) konnte eine Globulinerhöhung zwischen 10 % und 19 % ermittelt werden. SucPTR-Samen waren zum Teil schwerer als Wildtypsamen (vgl. Abb. 3.30). Bei den verschiedenen Anzuchten gab es jedoch auch Schwankungen. Die gemessenen Erhöhungen der Speicherproteine konnten nicht immer in beiden untersuchten Nachkommen gezeigt werden, was sowohl für sucAAP als auch für sucPTR galt. So hatten in der T₄ nur die Samen der sucAAP 5/8 erhöhte Globulinwerte, in der T₅ hingegen die Samen beider Nachkommen (5/3 und 5/8). Ähnlich ist es auch bei sucPTR: in der T₄ zeigten die Samen der Pflanzen 31/2 und 31/9 einen gesteigerten Globulingehalt im Vergleich zum Wildtyp, in der T₅ dagegen nur die Samen der Pflanze 31/2. Möglicherweise spielen die verschiedenen Umweltbedingungen, unter denen die Pflanzen angezogen wurden, eine Rolle. Dabei gibt es zum einen Unterschiede zwischen Phytokammer und Gewächshäusern in Bezug auf die Licht- und Temperaturregulation, zum anderen sind die Bedingungen in den Gewächshäusern in zwei aufeinanderfolgenden Jahren nicht identisch. SucPTR-Pflanzen wurden in Phytokammern (T₄-Generation) bzw. in Gewächshäusern (T₅-Generation) angezogen, die sucAAP-Pflanzen der T₄- und T₅-Generation in Gewächshäusern.

Dass Veränderungen des N-Metabolismus durch transgene Ansätze in Leguminosen meist eher eine Erhöhung des Globulingehaltes in den reifen Samen bewirken, ist bereits auch aus der Arbeit von Rolletschek et al. (2005) bekannt. Hier führt die samenspezifische Expression von *VfAAP1* in *V. narbonensis* und *P. sativum* zu einer Steigerung von 30 % (*V. narbonensis*) bzw. 43 % (*P. sativum*) im Globulingehalt. In diesen Pflanzen ist im Gegensatz zu den hier untersuchten auch der Gesamtstickstoffgehalt um 10 – 25 % erhöht. Die Albuminfraktion der in der vorliegenden Arbeit untersuchten sucAAP und sucPTR Samen war von der Erhöhung der Speicherproteine nicht betroffen und auch im Gesamtstickstoffgehalt konnte keine signifikante Steigerung gemessen werden. Eine Ausnahme bildet die Linie sucPTR 31/9, bei der in Samen aus Phytokammerpflanzen eine signifikante N-Erhöpfung gemessen wurde. Diese konnte jedoch in der Folgegeneration, die in Gewächshäusern wuchs, nicht erneut gezeigt werden. Aus dem Gesamtstickstoffgehalt kann über die Multiplikation mit einem Faktor auf den Gesamtproteingehalt der Samen geschlossen werden (Mossé, 1990). Da die Konzentration an freien Aminosäuren in reifen Samen sehr niedrig ist (< 3 % des Gesamtstickstoffgehaltes), spiegelt der Gesamt-N-Wert direkt den Proteingehalt wieder (Rolletschek et al., 2002). Die beobachtete Erhöhung der Globuline müsste sich demzufolge zumindest tendenziell auch im N-Gehalt widerspiegeln. Die N-Werte korrelieren zwar immer mit den Globulinwerten, sind aber in den transgenen Pflanzen nicht signifikant erhöht, obwohl die Mittelwerte leicht über denen des Wildtyps liegen. Es kann spekuliert werden, dass die Pflanzen nicht mehr N aufgenommen haben.

Denkbar wäre aber auch, dass für die Bestimmung des N-Gehaltes nicht genügend Samen verwendet wurden, um signifikante Änderungen zu messen. Da der Albumingehalt in den transgenen Pflanzen nicht verringert war, kann ausgeschlossen werden, dass nur eine Verschiebung hin zu den Globulinen stattgefunden hat, ohne den Gesamtproteingehalt zu erhöhen. Ebenso konnte in den sucAAP Samen kein veränderter Stärkegehalt im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden. Dies schließt aus, dass eine verringerte Stärkesynthese zugunsten der Speicherproteinsynthese abläuft. In Freilandversuchen mit Erbsen, die *VfAAP1* samenspezifisch unter Kontrolle des *LeB4*-Promotors exprimieren, wurden in den reifen Samen verringerte Stärke- sowie Saccharosegehalte nachgewiesen (K. Weigelt, pers. Mitteilung). Es stellt sich die Frage, woher die zusätzlich benötigten Bausteine für die vermehrte Synthese von Globulinen stammen, wenn der Samen-N-Gehalt in den sucAAP-Erbsen unverändert ist. Die Bestimmung der Konzentrationen an freien Aminosäuren in den Kotyledonen während der Samenentwicklung und auch im Phloem könnte darüber Aufschluss geben. Durch die Überexpression der N-Transporter im Phloem wird eine höhere Kapazität für die Aufnahme von Aminosäuren und Peptiden geschaffen. Inwieweit diese auch realisiert werden kann, um tatsächlich mehr Aminosäuren und Peptide in die Samen aufzunehmen und mehr Speicherproteine zu synthetisieren, kann nicht abschließend geklärt werden. Die höhere Aufnahmekapazität erfordert auch eine vermehrte N-Aufnahme aus dem Boden, N-Fixierung und N-Verteilung sowie Remobilisierung aus vegetativen Geweben. An dieser Stelle könnte beispielsweise die N-Aufnahme über die Wurzeln zum limitierenden Faktor werden. Andererseits könnte auch spekuliert werden, ob Kompensationseffekte innerhalb der Pflanze auftreten. Möglicherweise nimmt die Konzentration anderer Proteine oder Metabolite ab, die in den durchgeführten Messungen nicht bestimmt wurden. Somit könnte die Verlagerung in Richtung der Globuline erklärt werden, ohne dass sich am Gesamtstickstoffgehalt etwas ändert. Eventuell liegt auch ein statistisches Problem vor. Der Probenumfang müsste weiter erhöht werden, um genauere Aussagen über die Proteinkonzentrationen treffen zu können.

Die hervorgerufenen Erhöhungen im Globulingehalt bei sucAAP und sucPTR Samen sind im Vergleich mit den Pflanzen, die *VfAAP1* samenspezifisch exprimieren (Rolletschek et al., 2005), geringer, aber dennoch signifikant. Möglicherweise ist der verwendete *AtSUC2*-Promotor nicht stark genug und eine Kopie des *VfAAP1* bzw. *VfPTR1* Gens reicht dann nicht aus, um drastischere Änderungen im Speicherproteingehalt zu erzielen.

4.1.4 Kreuzung einer sucAAP- mit einer LeB4AAP-Erbse

Bereits in den ersten Generationen der sucAAP-Erbse wurde ein erhöhter Speicherproteingehalt in den reifen Samen gemessen. Aber man konnte bereits zu diesem Zeitpunkt vermuten, dass dieser Effekt nicht besonders stark ist und nur eine Insertion des *VfAAP1* Gens im Erbsengenom unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors nicht hinreichend ist, um zu deutlich höheren Samenproteingehalten zu führen. Daher entstand die Idee, homozygote sucAAP-Pflanzen mit ebenfalls homozygoten LeB4AAP-Pflanzen zu kreuzen, die *VfAAP1* samenspezifisch unter Kontrolle des *Legumin B4*-Promotors exprimieren und für die eine stabile Proteinerhöhung in den Samen bereits nachgewiesen wurde. *LeB4* ist der Promotor des *Legumin B4*-Gens aus *V. faba*, ein Mitglied der 11S Globulin-Genfamilie. *Legumin* wird vorwiegend in Samen exprimiert, Transkripte wurden aber auch in Pollen gefunden (Zakharov et al., 2004). Der *Legumin B4*-Promotor wurde bereits mehrfach für die Transformation von *V. narbonensis* und *P. sativum* verwendet (Weber et al., 1998b; Weber et al., 2000). Die Kreuzung sollte zwei Effekte miteinander kombinieren: Zum einen könnten durch die samenspezifische *VfAAP1*-Expression mehr Aminosäuren direkt in die wachsenden Samen gelangen (LeB4AAP) und zum anderen sollen aus der Remobilisierung mehr Aminosäuren über das Phloem zu den Samen transportiert werden (sucAAP). Beide Strategien stellen zusätzliche Aminosäuren für eine vermehrte Speicherproteinsynthese während der Samenentwicklung zur Verfügung.

Die genannten Erbselinien wurden gekreuzt und die Nachkommenschaftsanalyse führte zu vier individuellen Pflanzen, die sowohl homozygot für sucAAP als auch für LeB4AAP waren. Die vier doppelt homozygoten Pflanzen wurden unabhängig voneinander analysiert. Für die Kreuzungsprodukte konnte analog zu den sucAAP Pflanzen mittels qRT-PCR ebenfalls eine Expression von *VfAAP1* unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors in den Blättern nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.33). Die Pflanzen 58 und 27 zeigten dabei die stärkste Expression, sie lag höher als in der Elternlinie sucAAP 5/8. Bei der zweiten Elternlinie LeB4AAP 14/10 konnte wie erwartet kein PCR-Produkt in den Blättern nachgewiesen werden, da *LeB4* in Blättern nicht aktiv ist. Bei der Bestimmung der Ertragsparameter fiel zunächst auf, dass die Pflanze 27 signifikant weniger Hülsen und Samen pro Pflanze aufwies als die anderen Kreuzungsprodukte, die Elternpflanzen und der Wildtyp. Die Analysen der Inhaltsstoffe der reifen Samen ergaben, dass die Pflanze 27 die deutlichste Erhöhung des N- und Proteingehaltes zeigte. Auch die Pflanze 58 hatte einen erhöhten N- und Proteingehalt in den Samen. In Samen der Pflanzen 27 und 58, die aus der Phytokammeranzucht stammten, konnte nicht nur eine statistisch signifikante Erhöhung des N- und Globulingehaltes im Vergleich zum Wildtyp, sondern auch zu den Elternpflanzen sucAAP und LeB4AAP nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.35). Da die Ausgangslinie

sucAAP 5/8 keine signifikante Erhöhung im Gesamt-N zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass die höheren Werte in den Kreuzungsprodukten ausschließlich auf den Einfluss des LeB4AAP Konstruktes zurückzuführen sind. Das durchschnittliche Samengewicht der Pflanzen 27 und 58 war im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Bei Samen, die aus Gewächshäusern stammten, konnte die Proteinerhöhung im Vergleich zu den Elternpflanzen nicht bestätigt werden. Die Globulinwerte der Elternlinie LeB4AAP 14/10 waren bereits sehr hoch und konnten in den Kreuzungsprodukten nicht weiter gesteigert werden. Weiterhin fiel auf, dass der Albumingehalt in Samen der Pflanze 27 sowohl bei Phytokammer- als auch bei Gewächshauspflanzen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt war. Somit geht der erhöhte Globulingehalt zum Teil zu Lasten der Albumine. Da Globuline den mengenmäßig größeren Anteil der Speicherproteine ausmachen und dabei etwa 3 x höher liegen als die Albumine (Saharan and Khetarpaul, 1994), ist das Gesamtprotein dennoch erhöht. Der Stärkegehalt war in reifen Samen aus Phytokammer-Pflanzen der Linie 14/10 und des Kreuzungsproduktes 58 im Vergleich zum Wildtyp leicht erniedrigt, der Saccharosegehalt war dagegen in diesen Pflanzen erhöht. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Umweltbedingungen in der Phytokammer zurückzuführen und stammt nicht vom Einfluss des Transgens. Die Samen werden in der Phytokammer teilweise nicht vollständig reif, d.h. die Stärkeeinlagerung wird nicht abgeschlossen. Dadurch erklärt sich der erhöhte Saccharosegehalt in den reifen Samen. Samen aus Gewächshauspflanzen zeigten keine signifikante Änderung des Stärke- und Saccharosegehaltes, obwohl die Mittelwerte in den transgenen Samen leicht unter denen des Wildtyps lagen. Eine Ausnahme bilden die Samen des Kreuzungsproduktes 58, die einen signifikant niedrigeren Saccharosegehalt aufwiesen. Die Erhöhung des N-Gehaltes machte sich bei sich entwickelnden Samen in der Linie 27 und 14/10 bereits ab dem 22. DAF bemerkbar, wohingegen ein erhöhter Globulingehalt erst ab dem 30. DAF messbar wird. Der *LeB4*-Promotor ist während der mittleren und späten Samenentwicklung in den Speicherparenchymzellen aktiv, wenn die Speicherproteine synthetisiert werden. Der *AtSUC2*-Promotor sollte während der Samenfüllung in den *source*-Blättern so lange aktiv sein, wie Nährstoffe aus ihnen remobilisiert werden können.

Jedoch ist zu vermuten, dass der erhöhte Speicherproteingehalt in den Samen der Pflanze 27 zu einem verringerten Samenertrag führt. Die Pflanzen entwickelten deutlich weniger Hülsen und Samen, die Samengröße hingegen war mit dem Wildtyp vergleichbar. Die Anzahl der Blüten unterschied sich bei Pflanze 27 nicht von der der anderen Linien und des Wildtyps, jedoch konnten deutlich weniger Blüten auch Samenansätze entwickeln. Die Ursachen dafür sind unklar. Möglicherweise sind Umweltbedingungen, die nur diese Pflanze betreffen, dafür verantwortlich und rufen den gesunkenen Ertrag hervor. In Samen der Pflanze 58, die ebenfalls mehr Proteine haben, wurde diese Ertragsminderung nicht in

diesem Maße beobachtet. Die mittlere Samenanzahl war im Vergleich zum Wildtyp etwas reduziert, diese Änderungen waren jedoch nicht signifikant.

Generell haben die Samen aller Pflanzen aus den Gewächshäusern einen höheren Stickstoff- und Proteingehalt als Pflanzen aus Phytokammern. Da die Gewächshauspflanzen im Boden und nicht in Töpfen angezogen werden, kann die Nodulation der Wurzeln stärker ausgeprägt werden und die Nährstoffversorgung ist insgesamt deutlich besser, was sich in den Inhaltsstoffen niederschlägt. Die Erde in den Gewächshäusern wurde nur vor der Aussaat gedüngt, wohingegen die Töpfe in den Phytokammern regelmäßig gedüngt werden. Die Düngung mit mineralischem Stickstoff in Form von Nitrat wirkt sich hemmend auf die Knöllchenbildung aus (Streeter, 1985).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Samen der Kreuzungsprodukte einen im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Speicherproteingehalt besitzen, dieser jedoch nicht stabil bei mehreren Anzuchten auch höher als der der Elternpflanzen war, vor allem der Linie LeB4AAP 14/10. Weitere Wiederholungen wären nötig, um eine endgültige Aussage darüber zu treffen, ob mittels Kreuzung ein höherer Proteingehalt in den reifen Samen erzielt werden kann.

4.2 Aminosäuretransporter aus Gerste

Die meisten bisher funktionell charakterisierten N-Transporter stammen aus Arabidopsis. Über N-Transporter aus Kulturpflanzen ist noch relativ wenig bekannt. Die Gerste stellt innerhalb der Kulturpflanzen und vor allem der Getreide eine Modellpflanze dar. Gerstensamen sind spezialisiert auf die Speicherung hauptsächlich von Stärke, aber auch von Proteinen. Es wird vermutet, dass Aminosäuretransporter eine Rolle bei der Remobilisierung von Reserven und dem Transport in die sich entwickelnden Samen spielen. Es ist daher wichtig, Transportvorgänge und die dafür verantwortlichen Transporter an der Kulturpflanze Gerste direkt zu untersuchen. Das Ziel des zweiten Teils der Arbeit war folglich die Identifizierung von Aminosäuretransportern, vor allem solcher mit einer möglichen Funktion bei der Samenbeladung.

4.2.1 HvAAP1 und HvAAP2 sind funktionelle Aminosäuretransporter

In Arabidopsis gibt es acht AAP-Mitglieder, von denen sieben in der Lage sind, *in vitro* Aminosäuren aufzunehmen (Fischer et al., 1995; Kwart et al., 1993; Okumoto et al., 2002). Die Suche in der EST-Kollektion ergab, dass es auch in Gerste acht AAP-Mitglieder zu geben scheint (vgl. Abb. 3.37). Insgesamt gibt es etwa 53 Gene für Aminosäuretransporter

im Genom von Arabidopsis (Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Wipf et al., 2002) und etwa 59 Gene im Reisgenom. Darunter sind die AAPs die am besten untersuchten Transporter von organischem Stickstoff (Fischer et al., 1998; Wipf et al., 2002). Aufgrund unterschiedlicher biochemischer Eigenschaften und Expressionsmuster scheinen die Transporter aber nicht redundant zu sein, sondern jeder übernimmt spezifische Funktionen hinsichtlich der Stickstoffverteilung in der Pflanze (Fischer et al., 1998; Fischer et al., 1995; Rentsch et al., 1998). Die Anzahl an Genen, die am Aminosäuretransport beteiligt sind, ist in Arabidopsis und Reis deutlich höher als in einzelligen Organismen, was auf eine wichtige Rolle im Langstreckentransport von Assimilaten in höheren Pflanzen schließen lässt (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Ausgehend von cDNAs putativer Aminosäuretransporter aus Arabidopsis konnten über den Vergleich mit orthologen Sequenzen aus Reis und Weizen letztlich 22 ESTs mit einer möglichen Funktion im Aminosäuretransport aus der Gersten-EST-Kollektion identifiziert werden. Darunter befanden sich die vollständigen Klone *HvAAP1* und *HvAAP2*, die der Familie der Aminosäurepermeasen (AAP) angehören. Die AAPs ordnen sich der Familie der Aminosäuretransporter (*amino acid transporter family*, ATF, vgl. Abschnitt 1.5) unter. Die isolierten Gersten-AAPs sind stark hydrophob, was für Membranproteine typisch ist. Für die beiden Vollängen-Klone *HvAAP1* und *HvAAP2* wurde eine Struktur von neun bzw. zehn membranspannenden Domänen vorhergesagt. Dies korreliert mit der typischen Struktur von 9 – 11 Transmembrandomänen von Transportern der ATF-Familie. Chang and Bush (1997) schlagen aufgrund experimenteller Daten ein Modell mit elf Transmembrandomänen für die AAP-Familie aus Arabidopsis vor, wobei der N-Terminus zytosolisch und der C-Terminus extrazellulär ausgerichtet ist. Die gleiche Lage der N- und C-Termini ist auch für *HvAAP1* wahrscheinlich. Bei *HvAAP2* wurde für den N-Terminus mit etwas größerer Wahrscheinlichkeit eine extrazelluläre Lokalisierung vorhergesagt. Eine zytosolische Lage, die eher mit dem Modell der AAPs übereinstimmen würde, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

HvAAP1 und *HvAAP2* zeigen auf Aminosäureebene größere Ähnlichkeiten zu den Arabidopsis Transportern AAP2-4 als zu AAP1 und AAP5-8 (vgl. Tab. 3.3). Inwieweit dies relevant für die Funktion dieser AAPs ist, bleibt zu untersuchen.

Für beide AAPs konnte durch funktionelle Komplementation von *S. cerevisiae*-Aminosäuretransportmutanten eine Transportaktivität nachgewiesen werden. Die Expression von heterologen Proteinen in Hefe hat zum einen den Vorteil der schnellen und kostengünstigen Kultivierung der Zellen. Zum anderen sind die Hefezellen aufgrund eines entsprechenden sekretorischen Stoffwechselweges in der Lage, post-translationale Modifikationen durchzuführen und die Fremdproteine korrekt zu sekretieren. Die Verwendung von Hefestämmen mit Mutationen in den endogenen Transportern für die

funktionelle Komplementation ist in der Literatur mehrfach beschrieben. So wurden beispielsweise verschiedene Aminosäurepermeasen aus Arabidopsis durch Transformation von Hefemutanten mit einer Arabidopsis-cDNA-Bank identifiziert (Frommer et al., 1993). HvAAP1 und HvAAP2 konnten mehrere Hefemutanten mit Defekten in unterschiedlichen Aminosäuretransportsystemen funktionell komplementieren, d.h. die Hefezellen konnten die entsprechenden Aminosäuren aus dem Medium aufnehmen. Dabei scheinen beide Gersten-AAPs ein eher breites Substratspektrum zu besitzen, da auch strukturell sehr unterschiedliche Aminosäuren transportiert werden (vgl. Tabelle 3.4). Teilweise haben HvAAP1 und HvAAP2 ein überlappendes Substratspektrum. So zeigten *HvAAP1*- und *HvAAP2*-exprimierende Hefezellen Wachstum auf Glutamat, Arginin, Lysin, Phenylalanin, Methionin, Isoleucin und Valin. HvAAP1 scheint zusätzlich GABA und HvAAP2 Prolin, Citrullin und Histidin zu transportieren. Welche dieser Aminosäuren bevorzugt transportiert werden, könnte in Aufnahmestudien mit radioaktiv markierten Aminosäuren genauer untersucht werden. Ebenso kann auf diese Weise herausgefunden werden, ob es sich bei HvAAP1 und HvAAP2 um hoch- oder niedrigaffine Aminosäuretransporter handelt. Vergleicht man die Substratspezifität der Gersten-AAPs mit den ihnen auf Proteinebene ähnlichsten Transportern AAP2-4 aus Arabidopsis, findet man Übereinstimmungen vor allem mit AtAAP3, der genau wie HvAAP1 und HvAAP2 die basischen As Lysin und Arginin sowie Phenylalanin und Isoleucin transportiert (Fischer et al., 2002).

4.2.2 Intrazelluläre Lokalisierung und Expression von HvAAP1 und HvAAP2 – eine mögliche Rolle bei der Seneszenz

Bei den Versuchen, die beiden Gersten-AAPs über translationale Fusionen mit GFP intrazellulär zu lokalisieren, kann nur für HvAAP1 eine Aussage getroffen werden. Eine Expression des HvAAP2GFP-Fusionskonstruktes konnte weder in transient transformierten Gerste- bzw. Arabidopsis-Protoplasten noch in stabil transformierten Arabidopsis-Pflanzen nachgewiesen werden. Das Konstrukt wurde während aller Klonierungsschritte per Sequenzierung auf eine korrekte Orientierung überprüft, hauptsächlich am Übergang des *HvAAP2*-Gens zum GFP. Jedoch wurde keine vollständige Sequenzierung vorgenommen. Durch die Klonierung bedingte Veränderungen wie z.B. *frameshift*-Mutationen in der Sequenz sind möglich, die eine korrekte Transkription und Translation des entsprechenden Proteins verhindern. Die DNA selbst konnte in den transgenen Pflanzen mittels PCR nachgewiesen werden.

Die Aminosäurepermease HvAAP1 konnte über GFP-Fluoreszenz intrazellulär nachgewiesen werden. Dabei gab es beim Vergleich zwischen transient transformierten

Protoplasten und transgenen Pflanzen Unterschiede hinsichtlich der GFP-Signale. Während die GFP-Fluoreszenz in den Suspensionsprotoplasten vorwiegend an inneren Membransystemen und nur zum Teil an der Plasmamembran detektiert wurde, konzentrierte sich die Fluoreszenz bei den Protoplasten, die aus transgenen Pflanzen isoliert wurden, hauptsächlich entlang der Plasmamembran. Bei den zusätzlich gefundenen Signalen im Zytoplasma könnte es sich um HvAAP1GFP-Fusionsproteine handeln, die zwar bereits synthetisiert, aber noch nicht bis an die Plasmamembran transportiert wurden. Warum sich die Verteilung der GFP-Signale in transient transformierten Protoplasten von der in stabil transformierten Pflanzen unterscheidet, kann nicht genau erklärt werden. Möglicherweise wurde die Integration in die Plasmamembran in den Protoplasten nicht korrekt ausgeführt und das Fusionsprotein blieb im endogenen Membransystem zurück. Es könnte sich auch um artifizielle Signale handeln, die aufgrund der Überexpression entstehen. In *P. pastoris* führt die Überexpression von GFP zur Bildung von fluoreszierenden Partikeln innerhalb der Zelle (Zupan et al., 2004). Denkbar wäre aber auch eine komplexe Regulation dieses Transporters, welche eine Lokalisierung in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten notwendig macht. Da HvAAP1 in der Lage war, Hefemutanten zu komplementieren, kann man davon ausgehen, dass dieser Transporter in den *HvAAP1* exprimierenden Hefezellen in der Plasmamembran lokalisiert ist. Dies muss aber nicht zwangsläufig bedeuten, dass dies auch die Lokalisierung des nativen Proteins *in planta* ist. Aufgrund der Daten der GFP-Lokalisierung in transgenen Arabidopsis-Pflanzen liegt eine Plasmamembranlokalisierung jedoch nah. Bisher wurden von den Arabidopsis-AAPs nur AtAAP1 und AtAAP3 intrazellulär lokalisiert. AtAAP1 wurde in der Plasmamembran von Wurzelepidermiszellen sowie in der äußeren Zellschicht der Wurzelhaube lokalisiert (Lee et al., 2007). Dies lässt auf eine Funktion bei der Aufnahme von Aminosäuren in die Wurzelzellen schließen. Okumoto et al. (2004) konnten zeigen, dass AtAAP3 in der Kernmembran, Organell-ähnlichen Strukturen und in der Plasmamembran lokalisiert ist, was möglicherweise für eine dynamische Relokalisierung innerhalb der Zelle spricht.

HvAAP1 wird am stärksten in frühen maternalen Samentteilen wie Gynoecium und Perikarp (0. und 4. DAF) exprimiert. Das Perikarp und die Narbe stellen in frühen Entwicklungsstadien Speicherorgane dar, in denen vor allem Stärke gespeichert wird. Bereits mit Beginn der Befruchtung finden zunächst in der Narbe und etwas später auch im Perikarp aktive Remobilisierungsprozesse statt. Bei diesen Prozessen gelangen die aus der Stärkehydrolyse entstandenen Zucker zunächst von der Narbe in das Perikarp (0. DAF), und später dann in das Stärkeendosperm. Das Perikarp unterliegt dabei Seneszenz-ähnlichen Prozessen. Bisher wurde nur die Remobilisierung der Stärke beschrieben (Weschke et al., 2000), über Proteine ist hingegen nichts bekannt. Somit kann nur vermutet werden, dass HvAAP1 als Aminosäuretransporter eine Funktion während der Nährstoffremobilisierung im Perikarp

übernimmt. Beim Präparieren der Gewebe bleibt die Narbe Bestandteil der Perikarp-Fraktion, somit kann durch die Northern Analyse nicht festgestellt werden, ob *HvAAP1* in der Narbe oder im Perikarp exprimiert wird. *In situ* Hybridisierungen könnten hierüber genaueren Aufschluss geben.

Weiterhin konnten hohe *HvAAP1*-Transkriptmengen in den ährennahen Organen wie Deck- und Hüllspelze sowie im Knoten nachgewiesen werden. Dabei war die Expression jeweils am 12. DAF deutlich höher als am 4. DAF. 12 DAF befinden sich Gerste-Karyopsen bereits in der Speicherphase, d. h. Speicherprodukte wie Stärke und Proteine werden synthetisiert und im Endosperm abgelagert. Für die Synthese von Samenspeicherstoffen werden verschiedene Assimilate aus den transienten Speichermolekülen in vegetativen Geweben aktiv remobilisiert und in die sich entwickelnden Körner transportiert. Verschiedene Gewebe, wie z. B. Fahnenblatt, Spelzen und Stängel mit Knoten unterliegen Remobilisierungsprozessen. In den genannten Organen findet Seneszenz statt. Die Spelzen und der erste Knoten unterhalb der Ähre sind die der Ähre am nächsten gelegenen Organe, aus denen Reservestoffe remobilisiert werden können. Im Vergleich zum Fahnenblatt tragen diese Gewebe dabei sicherlich einen geringeren aber durchaus wichtigen Teil bei. Seneszenzvorgänge im Fahnenblatt, Stängel und in den Spelzen setzen erst ein, wenn die Samenentwicklung in den Ähren begonnen hat, während die älteren Blätter bereits viel früher der Seneszenz unterliegen (Wiedemuth et al., 2005). Das Expressionsmuster gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass *HvAAP1* an mit Seneszenz-gekoppelten Transportvorgängen beteiligt sein könnte. Die Arbeit von Van der Graaff et al. (2006) zeigt, dass verschiedene Gene von Aminosäure- und Peptidtransportern während der Blattseneszenz in *Arabidopsis* verstärkt exprimiert werden, vor allem solche, für die eine Lokalisierung in der Plasmamembran vorhergesagt wird. Die vermehrte Expression dieser N-Transporter korreliert mit der während der Seneszenz massiv stattfindenden Proteindegradation. Die daraus resultierenden Abbauprodukte müssen exportiert und zu den *sink*-Geweben, zu denen vor allem sich entwickelnde Samen gehören, transportiert werden (Himmelblau and Amasino, 2001; Soudry et al., 2005). Dafür werden Aminosäure- und auch Peptidtransporter benötigt (Hörtensteiner and Feller, 2002). Die Hypothese, *HvAAP1* könnte an Seneszenzvorgängen beteiligt sein, wird durch das Expressionsmuster einer Seneszenz-spezifischen Cysteinproteinase aus Gerste unterstützt (vgl. Abb. 3.43 C). Während der Seneszenz werden die zellulären Proteine verstärkt abgebaut und dieser Vorgang korreliert mit einer verstärkten Expression von Protease-Genen, speziell von Cysteinproteinasen (Martinez et al., 2007). Die Expression der Cysteinproteinase korreliert mit der von *HvAAP1* vorwiegend in den Spelzen und im Knoten. Ein ähnliches Expressionsverhalten zeigt sich aber auch in Antheren und Gynoecium sowie im frühen Perikarp.

HvAAP1-Transkripte wurden auch während der späten Samenentwicklung im Endosperm vom 16. DAF und in Karyopsen vom 20. DAF nachgewiesen. Über eine zusätzliche Funktion von *HvAAP1* bei der Samenbeladung kann nur spekuliert werden. Möglicherweise trägt *HvAAP1* dazu bei, Aminosäuren in das Endosperm aufzunehmen, wo diese dann für die Speicherproteinsynthese verwendet werden können. Um hierüber genaue Aussagen zu treffen, müssten beispielsweise *in situ* Hybridisierungen zur Lokalisierung des Genproduktes gemacht werden.

HvAAP2-mRNA wurde vor allem im Knoten am 12. DAF nachgewiesen und zusätzlich in Wurzeln (vgl. Abb. 3.43 B). In allen anderen untersuchten Geweben waren *HvAAP2*-Transkripte kaum nachweisbar. Bei diesem Transporter ist ein Zusammenhang mit Seneszenzvorgängen weniger wahrscheinlich, allein die Expression im Knoten spricht dafür. In anderen Geweben, die am 12. DAF Seneszenz unterliegen, konnte keine Übereinstimmung zwischen der Expression von *HvAAP2* und der Cysteinproteinase nachgewiesen werden. *HvAAP2* wird in diesen Geweben kaum exprimiert. Das Expressionsmuster in Wurzeln müsste durch *in situ* Hybridisierungen weiter analysiert werden, um auf die genaue Funktion von *HvAAP2* zu schließen. Möglicherweise besitzt *HvAAP2* eine Funktion bei der Aufnahme von Aminosäuren aus dem Boden und deren anschließender Verteilung.

Vergleicht man die Expressionsmuster von *HvAAP1* und *HvAAP2* mit denen der Arabidopsis-Transporter *AtAAP2-4*, zu denen die Gersten-AAPs auf Aminosäureebene die größten Ähnlichkeiten aufweisen, findet man nur teilweise Korrelationen. *AtAAP3* wird ausschließlich im Phloem von Wurzeln exprimiert, was auf eine Rolle bei der Aufnahme und Verteilung von Aminosäuren hindeutet (Okumoto et al., 2004). *AtAAP2*-, *AtAAP4*- und *AtAAP5*-Transkripte wurden im Stängel nachgewiesen, wo sie an der Speicherung, an der Rückgewinnung entlang des Transportweges oder am Austausch von Aminosäuren zwischen Xylem und Phloem beteiligt sein könnten (Fischer et al., 1995). *AtAAP4* und *AtAAP5* werden auch in voll entwickelten Blättern exprimiert, wo sie eine Rolle bei der Beladung des Phloems mit Aminosäuren spielen könnten. Für *AtAAP1* und *AtAAP2* wird außerdem eine Expression in sich entwickelnden Schoten und keimenden Samen beschrieben. Ersteres lässt auf eine Funktion bei der Bereitstellung von organischem Stickstoff für die sich entwickelnden Samen, letzteres auf eine Rolle bei der Remobilisierung von gespeichertem Stickstoff aus keimenden Samen schließen (Kwart et al., 1993).

4.2.3 Identifizierung einer putativen GABA-Permease

Neben den beiden Aminosäurepermeasen HvAAP1 und HvAAP2 konnte aus der Gersten-EST-Kollektion eine putative GABA-Permease identifiziert werden, die als HvGAP1 bezeichnet wurde. GABA-Permeasen (GAP) gehören der übergeordneten APC-Familie an (vgl. Abb. 3.48), und für HvGAP1 wurde eine für diese Transporter typische Struktur mit 12 Transmembrandomänen vorhergesagt. Bisher wurde nur ein GABA-Transporter aus Pflanzen funktionell beschrieben, AtGAT1 aus Arabidopsis (Meyer et al., 2006), der zur übergeordneten ATF-Familie gehört. AtGAT1 ist ein protonenabhängiger hochaffiner GABA-Transporter, der in der Plasmamembran lokalisiert ist. Er unterscheidet sich von den bekannten GABA-Transportern aus Säugern, Bakterien und Hefe. AtGAT1 wird am stärksten in Blüten exprimiert und die Expression kann durch erhöhte GABA-Level, die bei Verwundung oder Seneszenz entstehen, induziert werden (Meyer et al., 2006). Aus der GAP-Familie hingegen ist noch kein Mitglied in Pflanzen charakterisiert worden. Zu HvGAP1 gibt es acht orthologe Sequenzen im Reisgenom und eine in Arabidopsis. Diese putativen Aminosäuretransporter grenzen sich phylogenetisch deutlich von Mitgliedern der ATF-Familie ab (vgl. Abb. 3.48).

HvGAP1 wird stark in Keimlingen exprimiert, dabei weisen Keimlingswurzeln, die auf feuchtem Filterpapier gewachsen sind, die höchsten Transkriptmengen im Vergleich zur Anzucht auf Erde oder Agar auf. Möglicherweise trägt Nährstoffmangel, der als Stressfaktor wirkt, zu dieser starken Expression bei und induziert *HvGAP1*. Weiterhin wird *HvGAP1* in Antheren, Granne sowie Deck- und Hüllspelzen am 12. DAF exprimiert. Dieses Muster ähnelt dem der Aminosäurepermease HvAAP1, die ebenfalls in den Spelzen exprimiert wird. Es kann vermutet werden, dass *HvGAP1* eventuell auch eine Funktion während der Remobilisierungsphase und Seneszenz übernimmt. Die Expression von *HvGAP1* ist außerdem stark lichtreguliert, wie in dem Versuch mit zu verschiedenen Tageszeiten geernteten Keimlingen gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3.51). Durch *in situ* Hybridisierungen an Gersten-Karyopsen wurde *HvGAP1*-mRNA in den inneren Zellreihen des Nucellus am Tag der Blüte sowie in der nucellaren Projektion am 10. DAF nachgewiesen. Über die Funktion des putativen Transporters in diesen Geweben kann derzeit nur spekuliert werden: Die nucellare Projektion stellt eine Verbindung zwischen maternalem und filialem Gewebe dar und entlässt Assimilate aus den maternalen Samentteilen in die Endosperm-Kaverne. Dabei werden Teile des Gewebes nach und nach abgebaut und die Inhaltsstoffe der absterbenden Zellen für die Ernährung des Embryos bzw. des Endosperms verwendet (Greenwood et al., 2005; Radchuk et al., 2006; Smart, 1994; Wu and Cheung, 2000).

Aus den bisherigen Versuchsergebnissen zur Überprüfung der Funktionalität des Transporters und dessen intrazellulärer Lokalisierung kann geschlossen werden, dass HvGAP1 mit großer Wahrscheinlichkeit nicht an der Plasmamembran lokalisiert ist. Ein Hinweis darauf ist die fehlende Transportaktivität von HvGAP1 im für die funktionelle Komplementation verwendeten Hefestamm 22574d. In *S. cerevisiae* gibt es drei Systeme für GABA-Transport, die generelle Aminosäurepermease GAP1, die Prolinpermease PUT4 und die GABA-spezifische Permease UGA4 (Grenson et al., 1987). Im Stamm 22574d (Jauniaux et al., 1987) sind alle drei o. g. Transporter mutiert, demzufolge können die Hefezellen nicht auf Medium wachsen, welches Prolin, Citrullin oder GABA als einzige Stickstoffquelle enthält. HvGAP1 konnte diese Mutationen nicht komplementieren. Zum anderen konnte bei den Versuchen, HvGAP1 über eine translationale Fusion mit GFP intrazellulär zu lokalisieren, keine eindeutige Aussage erhalten werden. Die Verteilung der GFP-Signale in transient transformierten Gerste-Protoplasten aus demselben Transformationsansatz war sehr unterschiedlich. Am häufigsten wurden Markierungen entlang der Vakuolenmembran, der Kernmembran und fleckenartig im Zellinneren detektiert. In einigen Protoplasten war auch die Plasmamembran markiert, aber immer nur zusätzlich zu anderen intrazellulären Membranen. GABA wird im Zytosol der pflanzlichen Zelle synthetisiert, kommt aber auch in Chloroplasten, der Vakuole und im Apoplast vor (Tilsner et al., 2005). Außerdem wird davon ausgegangen, dass GABA in die Mitochondrien transportiert wird, wo es anschließend über den *GABA-shunt* abgebaut wird. Folglich werden GABA-Transporter an vielen unterschiedlichen Membranen benötigt. Nachdem eine reine Plasmamembranlokalisierung unwahrscheinlich war, die GFP-Signale des HvGAP1GFP-Fusionsproteins in einigen Protoplasten aber Hinweise auf eine Lokalisierung des Transporters in Mitochondrien gaben, wurde überprüft, ob HvGAP1 eine Rolle beim Eintransport von GABA in die Mitochondrien, in denen der *GABA-shunt* abläuft, spielen könnte.

Da der *GABA-shunt* in ähnlicher Weise auch in Hefen abläuft, wurde dieser Test an isolierten Mitochondrien aus *HvGAP1* exprimierenden *S. cerevisiae*-Zellen durchgeführt. Für diesen Versuch wurde ebenfalls der *S. cerevisiae* Stamm 22574d verwendet. Jedoch ergab die Bestimmung der Atmungsraten in der isolierten Mitochondriensuspension keine Hinweise auf eine funktionelle Aktivität von HvGAP1 beim Eintransport von GABA in die Mitochondrien. In Mitochondrien aus mit *HvGAP1* transformierten Hefezellen wurde nach Zugabe von GABA kein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, der ein Maß für die Atmung darstellt, gemessen. Nur bei Zugabe von Succinat als direktes Substrat für die Zellatmung (Positivkontrolle) wurde von den Mitochondrien Sauerstoff verbraucht. Daraus kann geschlossen werden, dass GABA anscheinend nicht als Substrat verwertet wurde. Eine Lokalisierung von HvGAP1 in der Mitochondrienmembran ist unwahrscheinlich.

Unter den drei GABA-Transportern in *S. cerevisiae* codiert *uga4* für eine GABA-spezifische Permease, deren Expression stark durch GABA induziert wird (André et al., 1993). UGA4 hat auf Proteinebene mit 30 % identischen Aminosäuren die höchsten Identitäten aller Hefe-GABA-Transporter zu HvGAP1. Uemura et al. (2004) konnten zeigen, dass UGA4 in der Vakuolenmembran lokalisiert ist und GABA-Transport katalysiert. Transporter in der Vakuolenmembran übernehmen eine wichtige Funktion bei der Konzentrationserhaltung verschiedener Substanzen wie Polyamine im Zellplasma von Hefezellen, indem diese in die oder aus der Vakuole transportiert werden. Da UGA4 in der Vakuolenmembran lokalisiert ist, muss GABA mittels anderer Transporter über die Plasmamembran in die Hefezelle aufgenommen werden. Dies geschieht möglicherweise über die generelle Aminosäurepermease GAP1 oder die Prolinpermease PUT4. Analog zu UGA4 könnte versucht werden, HvGAP1 auf dieselbe Weise in der Vakuolenmembran zu lokalisieren, indem man den Transporter heterolog in den von Uemura et al. (2004) verwendeten Hefestämmen exprimiert. Die Frage über eine mögliche vakuoläre Lokalisierung des HvGAP1 Proteins bleibt zunächst offen.

4.3 Weiterführende Arbeiten

4.3.1 Leguminosen-Transporter

Einige Ansätze für weiterführende Experimente sind in den vorangegangenen Abschnitten bereits erwähnt worden. Die Arbeiten sollten sich dabei zum einen auf die Expression und Lokalisierung von VfPTR1 konzentrieren, und zum anderen auf die transgenen Pflanzen, die weiteren Analysen unterzogen werden sollen.

So könnten beispielsweise die Zelltypen, in denen *VfPTR1* exprimiert wird, mit Hilfe der Elektronenmikroskopie genauer bestimmt werden. Dies wäre vor allem für Leitgewebe wichtig, um zu klären, ob *VfPTR1* im Phloem exprimiert wird. Die Analysen könnten sowohl an Keimlingen als auch an sich entwickelnden Samen durchgeführt werden. Keimlinge eignen sich gut, da mit Ausnahme wachsender Samen in einfacher Weise alle Zelltypen und Organe analysiert werden können, einschließlich seneszierender und remobilisierender Gewebe (Kotyledonen). Weitere *in situ* Hybridisierungen wären eine sinnvolle Ergänzung, um die ersten Ergebnisse zu verifizieren. Die Lokalisierung von VfPTR1 an der Plasmamembran müsste bestätigt werden. Ein neuer Versuch, transgene Erbsenpflanzen zu erzeugen, die *VfPTR1 antisense* unter Kontrolle des eigenen Promotors exprimieren, würde Aufschluss über die mögliche ratenlimitierende Rolle von VfPTR1 *in vivo* geben.

Für die transgenen Erbsenpflanzen, die *VfAAP1* bzw. *VfPTR1* unter Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors exprimieren, bieten sich weiterführende Analysemöglichkeiten an. Beispielsweise

könnte bestimmt werden, ob die N-Metabolitkonzentrationen (Aminosäuren, Gesamtstickstoff) in den transgenen Pflanzen verändert ist. Dazu kann aus Stängeln der Phloemsaft gewonnen und entsprechend analysiert werden. Weiterhin angedacht sind [¹⁵N]-Markierungsexperimente. [¹⁵N] markierte Aminosäuren und Dipeptide könnten dazu direkt in Stängel, Wurzel, Blätter oder Kotyledonen appliziert werden und deren Dynamik und Verlagerung innerhalb der Pflanze dann mittels Emissionsspektroskopie untersucht werden. Generell sollen die transgenen Pflanzen bezüglich der Samenentwicklung einer genaueren Metabolitanalyse (z. B. Zucker, Aminosäuren) unterzogen werden. Außerdem könnten Freilandversuche dazu beitragen, die erhaltenen Ergebnisse unter verschiedenen Umweltbedingungen zu verifizieren.

Die Transformation und Regeneration von Erbse und die anschließende Etablierung homozygoter Linien dauert im Vergleich zu Arabidopsis deutlich länger, weshalb Analysen der transgenen Pflanzen erst zum Ende dieser Arbeit möglich waren. Um die Ergebnisse der Analysen der transgenen und gekreuzten Pflanzen in naher Zukunft publizieren zu können, sind die bereits beschriebenen genaueren Untersuchungen der Stoffwechselfvorgänge notwendig, die mehr Aufschluss über Veränderungen des Metabolismus dieser Pflanzen geben. Die detaillierte Analyse der transgenen Pflanzen soll dazu beitragen, die Veränderungen in bestimmten Stoffwechselwegen zu verstehen, die durch die Überexpression des Aminosäure- bzw. Peptidtransporters hervorgerufen wurden. Es können dadurch transgene Modelle geschaffen werden, die mit anderen, in der Arbeitsgruppe bereits vorhandenen, transgenen Leguminosen-Modellen verglichen werden können.

4.3.2 Gerste-Transporter

Für eine umfassende Charakterisierung der AAP-Familie aus Gerste sollte das Expressionsmuster der sechs übrigen Mitglieder bestimmt werden, um Kandidaten mit einer samenspezifischen Expression zu identifizieren. Nach der Isolation von vollständigen Klonen müsste analog zu HvAAP1 und HvAAP2 die funktionelle Charakterisierung in Hefen durchgeführt werden. Aufnahmestudien mit radioaktiv markierten Aminosäuren könnten in Hefemutanten Aufschluss über das bevorzugte Substratspektrum der funktionellen Transporter HvAAP1 und HvAAP2 liefern. Weitere Northern und *in situ* Hybridisierungen würden helfen, ein genaueres Bild über die Expression dieser Transporter zu erhalten. Außerdem könnten somit zusätzliche Assoziationen zur Seneszenz und Samenfüllung hergestellt werden. Eine für die nähere Zukunft geplante Publikation könnte sich mit der Charakterisierung der AAP-Familie aus Gerste befassen, mit Schwerpunkt auf den beiden bisher funktionell charakterisierten Transportern HvAAP1 und HvAAP2. Die funktionelle Testung im heterologen Hefesystem, die intrazelluläre Lokalisierung von HvAAP1 und erste

Expressionsanalysen mittels Northern Blot wurden bereits durchgeführt. Ergänzende Experimente sind jedoch noch notwendig. Mit der Bestimmung des Aminosäuresubstratspektrums und vor allem mit weiteren Expressionsanalysen könnte ein genaueres Bild über die mögliche Funktion dieser Transporter *in planta* entstehen. *In situ* Hybridisierungen sollten Auskunft über die Zell-Spezifität der Expression geben. Im Vergleich zur Expression der Cysteinproteinase könnte der Bezug zur Seneszenz weiter vertieft werden. Die resultierenden Daten würden die geplante Publikation vervollständigen. Um Aussagen über die spezifischen Funktionen innerhalb der Pflanze zu bekommen, wären ebenfalls transgene Ansätze notwendig, in denen die Transporter überexprimiert oder reprimiert werden. Dafür wird eine längere Zeit benötigt und Erkenntnisse aus diesen Versuchen könnten die Basis für eine zweite Publikation darstellen. In Bezug auf die putative GABA-Permease HvGAP1 ist es wichtig, den Transporter funktionell zu charakterisieren. Außerdem wird eine Lokalisierung mittels eines spezifischen Antikörpers (bereits vorhanden) angestrebt. Weiterführende Expressionsanalysen könnten die vermutete Rolle von HvGAP1 bei der Seneszenz und Stressantwort unterstützen und würden Teil einer weiteren Publikation sein.

Bisher dienen die Ergebnisse der Vorbereitung eines Projektantrages innerhalb einer DFG-Forschergruppe zum Thema Seneszenz, Remobilisierung und Samenenfüllung bei Kulturpflanzen.

5 Zusammenfassung

Der Samenproteingehalt ist ein wichtiges Ertrags- und Qualitätsmerkmal von Kulturpflanzen, und er ist abhängig vom verfügbaren Stickstoff in den Pflanzen. Aminosäuren stellen dabei die wahrscheinliche Langstreckentransportform für organischen Stickstoff dar. Ihre Verteilung innerhalb der Pflanze erfolgt über das Phloem. Kleine Peptide entstehen vor allem in Geweben und zu Zeitpunkten rascher Proteolyse, z. B. während Seneszenz oder Keimung, und werden von Peptidtransportern transportiert. Die Samenentwicklung von Leguminosen und Gerste ist das Hauptuntersuchungsgebiet der Arbeitsgruppe Genwirkung am IPK. Die Charakterisierung von N-Transportern in den beiden Kulturpflanzen soll helfen, diese Transportprozesse besser zu verstehen. Des Weiteren soll der Transfer von organischem Stickstoff in sich entwickelnde Samen und dessen Regulation analysiert werden. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand zum einen die funktionelle Charakterisierung des Peptidtransporters VfPTR1 und der Aminosäurepermease VfAAP1 in Leguminosen in Relation zur Proteinakkumulation im Samen. Weiterhin sollten Aminosäuretransporter aus Gerste identifiziert sowie molekular und funktionell charakterisiert werden.

5.1 Leguminosen-Transporter

- Ausgehend von der Sequenz der VfPTR1 cDNA konnte mittels *genome walking* der PTR1-Promotor isoliert werden. Eine Promotoraktivität konnte für das 1,8 kb große DNA-Fragment in mit pPTR1GUS transient transformierten *V. faba* Protoplasten gezeigt werden.
- In transgenen Pflanzen, die mit pPTR1GUS bzw. pPTR1GFP transformiert wurden, konnte eine Expression der entsprechenden Reportergene in den Leitgeweben, Epidermis- und Parenchymzellen von Wurzeln sowie in Wurzelhaaren nachgewiesen werden. Bei GUS-Färbungen zeigte sich Aktivität des PTR1-Promotors zusätzlich in den Parenchymzellen des Stängels. Während der Samenentwicklung in mit pPTR1GFP transformierten Erbsen konnte eine GFP-Fluoreszenz in der Epidermis sowie den Parenchymzellen der Kotyledonen detektiert werden. Zusätzlich konnte mittels Northern Blot Analysen an *V. faba* Keimlingen gezeigt werden, dass VfPTR1 stark in Wurzelspitzen, im Hypokotyl und den Kotyledonen exprimiert wird.
- Die Experimente zur intrazellulären Lokalisierung des VfPTR1-Proteins gaben zunächst Hinweise auf eine Lokalisierung in der Vakuolenmembran. Dies wurde anhand eines GFP-Fusionskonstruktes in Protoplasten demonstriert. Da das VfPTR1/GFP Fusionsprotein in entsprechend transformierten *S. cerevisiae* Zellen

nicht mehr funktionell war, bestehen Zweifel an dieser Lokalisierung. Mit einem spezifisch gegen den N- und C-Terminus von VfPTR1 gerichteten Peptidantikörper konnte mittels Immunogoldmarkierung elektronenmikroskopisch eine spezifische Markierung der Plasmamembran gezeigt werden.

- Eine Expression von *VfAAP1* und *VfPTR1* unter Kontrolle des phloemspezifischen *AtSUC2*-Promotors in Erbse führt zu einer moderaten Erhöhung des Speicherproteingehaltes in reifen Samen, der nur die Globulinfraktion betrifft. Eine Erhöhung des Gesamt-N war nicht signifikant.
- Durch die Kreuzung von *sucAAP* Erbsen mit einer *LeB4AAP* Erbsenlinie konnten doppelt homozygote Pflanzen für *VfAAP1* erzeugt werden, die die Aminosäurepermease sowohl phloem- als auch samenspezifisch exprimieren. Die Kreuzungspflanzen zeigten eine Erhöhung des N- und Proteingehaltes in reifen Samen im Vergleich zum Wildtyp und der Elternlinie 5/8. Eine N- und Proteinerhöhung im Vergleich zu beiden Elternpflanzen (5/8 und 14/10) konnte nur in Samen von in Phytokammern gewachsenen Pflanzen gezeigt werden.

5.2 Gerste-Transporter

- Ausgehend von bekannten Sequenzen für Aminosäuretransporter aus Arabidopsis konnten über Sequenzvergleiche acht putative Aminosäuretransporter aus der Gersten-EST-Kollektion identifiziert werden, die der AAP-Familie angehören. Darunter befanden sich die vollständigen cDNAs von *HvAAP1* und *HvAAP2*, die typische Merkmale dieser Transporter aufwiesen.
- Northern Blot Analysen haben gezeigt, dass *HvAAP1* am stärksten in den frühen maternalen Samenteil sowie in ährennahen Organen (Spelzen, Knoten) zum Zeitpunkt der Samenfüllung exprimiert wird. Das Expressionsmuster korreliert weitgehend mit dem einer Cysteinproteinase aus Gerste, die einen Seneszenzmarker darstellt. Im Gegensatz zu *HvAAP1* konnte *HvAAP2*-mRNA nur im Knoten (12. DAF) und in Wurzeln nachgewiesen werden.
- Die Funktionalität von *HvAAP1* und *HvAAP2* wurde durch die Komplementation verschiedener *S. cerevisiae* Aminosäuretransport-Mutanten gezeigt. Eine intrazelluläre Lokalisierung mittels Fusion der Proteine an GFP gelang nur für *HvAAP1*, das Fusionsprotein wurde in Protoplasten aus stabil transformierten Arabidopsis-Pflanzen hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert.

- Neben den Aminosäuretransportern der AAP-Familie wurde zusätzlich eine putative GABA-Permease (APC-Familie) aus der Gersten-EST-Kollektion identifiziert. *HvGAP1* wird am stärksten in Keimlingswurzeln exprimiert, Transkripte wurden aber auch in Antheren und Gynoecium sowie der Granne und den Spelzen (12. DAF) gefunden. Auch hier korreliert die Expression mit der der Cysteinproteinase. Die *HvGAP1*-Expression scheint außerdem stark lichtreguliert zu sein. Bisherige Versuche zur funktionellen Testung verliefen nicht erfolgreich und auch die intrazelluläre Lokalisierung konnte nicht abschließend geklärt werden.
- Die Arbeiten an den Gerste-Transportern waren vorbereitend für einen Projektantrag zur Analyse der Wechselwirkung zwischen Seneszenz und Samenfüllung.

6 Literaturverzeichnis

- Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10.
- André, B., Hein, C., Grenson, M. and Jauniaux, J. C.** (1993). Cloning and expression of the *UGA4* gene coding for the inducible GABA-specific transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **237**, 17-25.
- Balconi, C., Rizzi, E., Manzocchi, L., Soave, C. and Motto, M.** (1991). Analysis of *in vivo* and *in vitro* grown endosperms of high and low protein strains of maize. *Plant Science* **73**, 1.
- Barran, L. R. and Singh, J.** (1982). Leucine transport in cells isolated from cold-hardened and nonhardened winter rye. *Plant Physiol.* **69**, 793-797.
- Barratt, D. H. P.** (1982). Changes during development in the nitrogen, uncombined amino-acid and carbohydrate contents of cotyledons from different cultivars and lines of field bean (*Vicia-Faba* L). *Ann Bot* **49**, 761-768.
- Berlin, J. and Mutert, U.** (1978). Evidence for distinct amino acid transport systems in cultured tobacco cells. *Z. Naturforsch Teil C: 33*, 641-645.
- Bernard, O., Cory, S., Gerondakis, S., Webb, E. and Adams, J. M.** (1983). Sequence of the murine and human cellular myc oncogenes and two modes of myc transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours. *Embo J* **2**, 2375-83.
- Bick, J. A., Neelam, A., Hall, J. L. and Williams, L. E.** (1998). Amino acid carriers of *Ricinus communis* expressed during seedling development: molecular cloning and expression analysis of two putative amino acid transporters, RcAAP1 and RcAAP2. *Plant Mol Biol* **36**, 377-85.
- Borden, L. A.** (1996). GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem Int* **29**, 335-56.
- Borisjuk, L., Weber, H., Panitz, R., Manteuffel, R. and Wobus, U.** (1995). Embryogenesis of *Vicia-faba* L - histodifferentiation and protein storage in relation to seed coat associated invertase. *Plant Physiol* **108**, 95-95.
- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Radchuk, R., Weschke, W., Wobus, U. and Weber, H.** (2004). Seed development and differentiation: a role for metabolic regulation. *Plant Biol (Stuttg)* **6**, 375-86.
- Bouché, N., Lacombe, B. and Fromm, H.** (2003a). GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends in Cell Biology* **13**, 607.
- Bouché, N., Fait, A., Bouchez, D., Moller, S. G. and Fromm, H.** (2003b). Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the gamma-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6843-8.

- Bouché, N. and Fromm, H.** (2004). GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci* **9**, 110.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Breitkreuz, K. E., Shelp, B. J., Fischer, W. N., Schwacke, R. and Rentsch, D.** (1999). Identification and characterization of GABA, proline and quaternary ammonium compound transporters from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **450**, 280-4.
- Buchanan-Wollaston, V.** (1997). The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **48**, 181-199.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T. and Pink, D.** (2003). The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnol J* **1**, 3-22.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E. L., Girke, T. and Raikhel, N. V.** (2004). The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* **16**, 3285-3303.
- Chang, H.-C. and Bush, D. R.** (1997). Topology of NAT2, a prototypical example of a new family of amino acid transporters. *J. Biol. Chem.* **272**, 30552-30557.
- Chen, N. H., Reith, M. E. and Quick, M. W.** (2004). Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch* **447**, 519-31.
- Cheruel, J., Jullien, M. and Surdin-Kerjan, Y.** (1979). Amino acid uptake into cultivated mesophyll cells from *Asparagus officinalis* L. *Plant Physiol.* **63**, 621-626.
- Church, G. M. and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1991-5.
- Clough, S. J. and Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-43.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. and Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-4.
- Coleman, S. T., Fang, T. K., Rovinsky, S. A., Turano, F. J. and Moye-Rowley, W. S.** (2001). Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**, 244-50.
- Daum, G., Gasser, S. M. and Schatz, G.** (1982). Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b2 by isolated yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 13075-13080.
- De Block, M. a. D., D.** (1996). RNA-RNA *in situ* hybridization using DIG-labeled probes: the effect of high molecular weight polyvinyl alcohol on the alkaline phosphatase indoxyl-nitroblue tetrazolium reaction. *Non-radioactive in situ hybridization Application manual 2nd edn*, 141-145.
- De Jong, A., Koerselman-Kooij, J. W., Schuurmans, J. and Borstlap, A. C.** (1997). The mechanism of amino acid efflux from seed coats of developing pea seeds as revealed by uptake experiments. *Plant Physiol.* **114**, 731-736.

- Dietrich, D., Hammes, U., Thor, K., Suter-Grotemeyer, M., Fluckiger, R., Slusarenko, A. J., Ward, J. M. and Rentsch, D.** (2004). AtPTR1, a plasma membrane peptide transporter expressed during seed germination and in vascular tissue of *Arabidopsis*. *Plant J* **40**, 488-99.
- Dohmen, R. J., Strasser, A. W., Honer, C. B. and Hollenberg, C. P.** (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**, 691-2.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. and Bishop, J. M.** (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **5**, 3610-6.
- Fei, Y. J., Ganapathy, V. and Leibach, F. H.** (1998). Molecular and structural features of the proton-coupled oligopeptide transporter superfamily. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **58**, 239-61.
- Feller, U. and Keist, M.** (1986). Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. In *Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants*, eds. H. Lambers, J. J. Neeterson and I. Stulen), pp. 219-234: Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers.
- Feller, U. and Fischer, A.** (1994). Nitrogen-metabolism in senescing leaves. *CRC Crit Rev Plant Sci* **13**, 241-273.
- Fischer, W. N., Kwart, M., Hummel, S. and Frommer, W. B.** (1995). Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **270**, 16315-20.
- Fischer, W. N., André, B., Rentsch, D., Krolkiewicz, S., Tegeder, M., Breitzkreuz, K. E. and Frommer, W. B.** (1998). Amino acid transport in plants. *Trends Plant Sci* **3**, 188-194.
- Fischer, W. N., Loo, D. D., Koch, W., Ludewig, U., Boorer, K. J., Tegeder, M., Rentsch, D., Wright, E. M. and Frommer, W. B.** (2002). Low and high affinity amino acid H⁺-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. *Plant J* **29**, 717-31.
- Frommer, W. B., Hummel, S. and Riesmeier, J. W.** (1993). Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5944-8.
- Frommer, W. B., Kwart, M., Hirner, B., Fischer, W. N., Hummel, S. and Ninnemann, O.** (1994). Transporters for nitrogenous compounds in plants. *Plant Mol Biol* **26**, 1651-70.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**, 151-&.
- Gibson, S. I.** (2004). Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J. Exp. Bot.* **55**, 253-264.
- Gottesdiener, K. M., Karpinski, B. A., Lindsten, T., Strominger, J. L., Jones, N. H., Thompson, C. B. and Leiden, J. M.** (1988). Isolation and structural characterization of the human 4F2 heavy-chain gene, an inducible gene involved in T-lymphocyte activation. *Mol Cell Biol* **8**, 3809-19.
- Grallath, S., Weimar, T., Meyer, A., Gummy, C., Suter-Grotemeyer, M., Neuhaus, J. M. and Rentsch, D.** (2005). The AtProT family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns. *Plant Physiol* **137**, 117-26.

- Greenwood, J. S., Helm, M. and Gietl, C.** (2005). Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2238-2243.
- Grenson, M., Muyldermans, F., Broman, K. and Vissers, S.** (1987). 4-Aminobutyric acid (GABA) uptake in Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the general amino acid permease, the proline permease and a GABA-specific permease integrated into the GABA-catabolic pathway. *Life Sci Adv [Ser C]* **6**, 35-39.
- Guo, Y., Cai, Z. and Gan, S.** (2004). Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant, Cell & Environment* **27**, 521-549.
- Harrington, H. M. and Henke, R. R.** (1981). Amino acid transport into cultured tobacco cells: I. LYSINE TRANSPORT. *Plant Physiol.* **67**, 373-378.
- Heim, U., Weber, H., Bäumllein, H. and Wobus, U.** (1993). A sucrose-synthase gene of *Vicia faba* L.: expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. *Planta* **191**, 394-401.
- Hein, C. and André, B.** (1997). A C-terminal di-leucine motif and nearby sequences are required for NH₄⁽⁺⁾-induced inactivation and degradation of the general amino acid permease, Gap1p, of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **24**, 607-16.
- Higgins, C. F. and Payne, J. W.** (1978). Peptide transport by germinating barley embryos: Evidence for a single common carrier for di- and oligopeptides. *Planta* **138**, 217.
- Higgins, C. F. and Payne, J. W.** (1980). Transport and utilization of amino acids and peptides by higher plants. In *Microorganisms and Nitrogen Sources*, (ed. J. W. Payne), pp. 609-637: John Wiley & Sons.
- Higgins, C. F. and Payne, J. W.** (1982). Plant peptides. *Encyclop. Plant Physiol.* **14A**, 438-458.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. and Korenaga, T.** (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucl. Acids Res.* **27**, 297-300.
- Hill, J.** (1980). The remobilization of nutrients from leaves. *Journal of Plant Nutrition* **2**, 407-444.
- Hilpert, K., Hansen, G., Wessner, H., Kuttner, G., Welfle, K., Seifert, M. and Hohne, W.** (2001). Anti-*c-myc* antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein Eng* **14**, 803-6.
- Himmelblau, E. and Amasino, R. M.** (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* **158**, 1317-1323.
- Hirner, B., Fischer, W. N., Rentsch, D., Kwart, M. and Frommer, W. B.** (1998). Developmental control of H⁺/amino acid permease gene expression during seed development of Arabidopsis. *Plant J* **14**, 535-44.
- Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M. and Schell, J.** (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* **163**, 181-7.
- Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S. and Hoekema, A.** (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene-transfer to plants. *Transgenic Research* **2**, 208-218.

- Hörtensteiner, S. and Feller, U.** (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J Exp Bot* **53**, 927-37.
- Hosie, A. H., Allaway, D., Galloway, C. S., Dunsby, H. A. and Poole, P. S.** (2002). *Rhizobium leguminosarum* has a second general amino acid permease with unusually broad substrate specificity and high similarity to branched-chain amino acid transporters (Bra/LIV) of the ABC family. *J Bacteriol* **184**, 4071-80.
- Hsu, L., Chiou, T., Chen, L. and Bush, D. R.** (1993). Cloning a plant amino acid transporter by functional complementation of a yeast amino acid transport mutant. *PNAS* **90**, 7441-7445.
- Huang, N. C., Chiang, C. S., Crawford, N. M. and Tsay, Y. F.** (1996). *CHL1* encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis and shows cell type-specific expression in roots. *Plant Cell* **8**, 2183-91.
- Jack, D. L., Paulsen, I. T. and Saier, M. H.** (2000). The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology* **146** (Pt 8), 1797-814.
- Jauniaux, J. C., Vandebol, M., Vissers, S., Broman, K. and Grenson, M.** (1987). Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of the *PUT4* gene and study of *PUT4* RNA levels in wild-type and mutant strains. *Eur J Biochem* **164**, 601-6.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* **6**, 3901-7.
- Kamachi, K., Yamaya, T., Hayakawa, T., Mae, T. and Ojima, K.** (1992). Changes in cytosolic glutamine synthetase polypeptide and its mRNA in a leaf blade of rice plants during natural senescence. *Plant Physiol.* **98**, 1323-1329.
- Karim, S., Lundh, D., Holmstrom, K. O., Mandal, A. and Pirhonen, M.** (2005). Structural and functional characterization of AtPTR3, a stress-induced peptide transporter of Arabidopsis. *J Mol Model (Online)* **11**, 226-36.
- Kinnersley, A. M. and Turano, F. J.** (2000). Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**, 479-509.
- Knudson, S.** (1999). Promoter 2.0: for the recognition of PolII promoter sequences. *Bioinformatics* **15**, 356-361.
- Koh, S., Wiles, A. M., Sharp, J. S., Naider, F. R., Becker, J. M. and Stacey, G.** (2002). An oligopeptide transporter gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol* **128**, 21-9.
- Kumar, S. and Punekar, N. S.** (1997). The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. *Mycol. Res.* **101**, 403-409.
- Kumudini, S., Hume, D. J. and Chu, G.** (2002). Genetic improvement in short-season soybeans: II. Nitrogen accumulation, remobilization, and partitioning. *Crop Sci* **42**, 141-145.
- Künne, C., Lange, M., Funke, T., Miede, H., Thiel, T., Grosse, I. and Scholz, U.** (2005). CR-EST: a resource for crop ESTs. *Nucleic Acids Res* **33**, D619-21.
- Kwart, M., Hirner, B., Hummel, S. and Frommer, W. B.** (1993). Differential expression of two related amino acid transporters with differing substrate specificity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **4**, 993-1002.

- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lalonde, S., Wipf, D. and Frommer, W. B.** (2004). Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 341-72.
- Lam, E. and Chua, N. H.** (1989). ASF-2: A factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in cab promoters. *Plant Cell* **1**, 1147-1156.
- Lee, Y.-H., Foster, J., Chen, J., Voll, L. M., Weber, A. P. M. and Tegeder, M.** (2007). AAP1 transports uncharged amino acids into roots of Arabidopsis. *The Plant Journal* **50**, 305-319.
- Lhullier-Soundélé, A., Munier-Jolain, N. and Ney, B.** (1999). Influence of nitrogen availability on seed nitrogen accumulation in pea. *Crop Sci* **39**, 1741-1748.
- Lohaus, G., Büker, M., Hußmann, M., Soave, C. and Heldt, H.-W.** (1998). Transport of amino acids with special emphasis on the synthesis and transport of asparagine in the Illinois Low Protein and Illinois High Protein strains of maize. *Planta* **205**, 181.
- Lohaus, G. and Moellers, C.** (2000). Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* **211**, 833.
- Martinez, D. E., Bartoli, C. G., Grbic, V. and Guamet, J. J.** (2007). Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *J. Exp. Bot.* **58**, 1099-1107.
- Martinoia, E., Maeshima, M. and Neuhaus, H. E.** (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J. Exp. Bot.* **58**, 83-102.
- Masclaux, C., Valadier, M. H., Brugiere, N., Morot-Gaudry, J. F. and Hirel, B.** (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**, 510-8.
- McDaniel, C. N., Holterman, R. K., Bone, R. F. and Wozniak, P. M.** (1982). Amino acid transport in suspension-cultured plant cells: III. COMMON CARRIER SYSTEM FOR THE UPTAKE OF L-ARGININE, L-ASPARTIC ACID, L-HISTIDINE, L-LEUCINE, AND L-PHENYLALANINE. *Plant Physiol.* **69**, 246-249.
- Meyer, A., Eskandari, S., Grallath, S. and Rentsch, D.** (2006). AtGAT1, a high affinity transporter for gamma-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **281**, 7197-204.
- Meyer, S., Melzer, M., Truernit, E., Hummer, C., Besenbeck, R., Stadler, R. and Sauer, N.** (2000). AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant J* **24**, 869-82.
- Miranda, M., Borisjuk, L., Tewes, A., Heim, U., Sauer, N., Wobus, U. and Weber, H.** (2001). Amino acid permeases in developing seeds of *Vicia faba* L.: expression precedes storage protein synthesis and is regulated by amino acid supply. *Plant J* **28**, 61-71.
- Miranda, M., Borisjuk, L., Tewes, A., Dietrich, D., Rentsch, D., Weber, H. and Wobus, U.** (2003). Peptide and amino acid transporters are differentially regulated during seed development and germination in faba bean. *Plant Physiol* **132**, 1950-60.
- Montamat, F., Maurousset, L., Tegeder, M., Frommer, W. and Delrot, S.** (1999). Cloning and expression of amino acid transporters from broad bean. *Plant Mol Biol* **41**, 259-68.

- Mossé, J.** (1990). Nitrogen To protein conversion factor for 10 cereals and 6 legumes or oilseeds - a reappraisal of its definition and determination - variation according to species and to seed protein-content. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 18-24.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-&.
- Nagy, J. I. and Maliga, P.** (1976). Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* **78**, 453-455.
- Nishiguchi, R., Takanami, M. and Oka, A.** (1987). Characterization and sequence determination of the replicator region in the hairy-root-inducing plasmid pRI44b. *Mol Gen Genet* **206**, 1-8.
- Noodén, L. D., Guiamet, J. J. and John, I.** (1997). Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* **101**, 746-753.
- Offler, C. E., Nerlich, S. M. and Patrick, J. W.** (1989). Pathway of photosynthate transfer in the developing seed of *Vicia faba* L. Transfer in relation to seed anatomy. *J Exp Bot* **40**, 769-780.
- Offler, C. E., Liet, E. and Sutton, E. G.** (1997). Transfer cell induction in cotyledons of *Vicia faba* L. *Protoplasma* **200**, 51-64.
- Offler, C. E., McCurdy, D. W., Patrick, J. W. and Talbot, M. J.** (2003). Transfer cells: cells specialized for a special purpose. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 431-54.
- Okumoto, S., Schmidt, R., Tegeder, M., Fischer, W. N., Rentsch, D., Frommer, W. B. and Koch, W.** (2002). High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of Arabidopsis. *J Biol Chem* **277**, 45338-46.
- Okumoto, S., Koch, W., Tegeder, M., Fischer, W. N., Biehl, A., Leister, D., Stierhof, Y. D. and Frommer, W. B.** (2004). Root phloem-specific expression of the plasma membrane amino acid proton co-transporter AAP3. *J Exp Bot* **55**, 2155-68.
- Owens, D. F. and Kriegstein, A. R.** (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* **3**, 715-27.
- Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A. F. and Preuss, D.** (2003). Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. *Cell* **114**, 47-59.
- Parker, J. M., Guo, D. and Hodges, R. S.** (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* **25**, 5425-32.
- Radchuk, V., Borisjuk, L., Radchuk, R., Steinbiss, H.-H., Rolletschek, H., Broeders, S. and Wobus, U.** (2006). *Jekyll* encodes a novel protein involved in the sexual reproduction of barley. *Plant Cell* **18**, 1652-1666.
- Ranki, H., Mendezlozano, J. and Sopanen, T.** (1994). 3 carboxypeptidases occurring in the starchy endosperm of germinating barley-grain have different sites of synthesis. *Physiol. Plant.* **91**, 90-96.
- Rentsch, D., Laloi, M., Rouhara, I., Schmelzer, E., Delrot, S. and Frommer, W. B.** (1995). *NTR1* encodes a high affinity oligopeptide transporter in Arabidopsis. *FEBS Lett* **370**, 264-8.

- Rentsch, D., Boorer, K. J. and Frommer, W. B.** (1998). Structure and function of plasma membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. *J Membr Biol* **162**, 177-90.
- Robinson, S. P. and Beevers, H.** (1981). Amino acid transport in germinating castor bean seedlings. *Plant Physiol.* **68**, 560-566.
- Rolletschek, H., Hajirezaei, M. R., Wobus, U. and Weber, H.** (2002). Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in *Vicia narbonensis* seeds increases soluble sugars and leads to higher water and nitrogen uptake. *Planta* **214**, 954-64.
- Rolletschek, H., Hosein, F., Miranda, M., Heim, U., Götz, K. P., Schlereth, A., Borisjuk, L., Saalbach, I., Wobus, U. and Weber, H.** (2005). Ectopic expression of an amino acid transporter (*VfAAP1*) in seeds of *Vicia narbonensis* and pea increases storage proteins. *Plant Physiol* **137**, 1236-49.
- Rombauts, S., Dehais, P., Van Montagu, M. and Rouze, P.** (1999). PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Res* **27**, 295-6.
- Sagan, M., Ney, B. and Duc, G.** (1993). Plant symbiotic mutants as a tool to analyse nitrogen nutrition and yield relationship in field-growth peas (*Pisum sativum L.*). *Plant and Soil* **153**, 33-45.
- Saharan, K. and Khetarpaul, N.** (1994). Protein quality traits of vegetable and field peas: varietal differences. *Plant Foods Hum Nutr* **45**, 11-22.
- Salon, C., Munier-Jolain, N. G., Duc, G., Voisin, A. S., Grandgirard, D., Larmure, A., Emery, R. J. N. and Ney, B.** (2001). Grain legume seed filling in relation to nitrogen acquisition: A review and prospects with particular reference to pea. *Agronomie* **21**, 539-552.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Schroeder, H. E., Schotz, A. H., Wardley-Richardson, T., Spencer, D. and Higgins, T.** (1993). Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum L.*). *Plant Physiol* **101**, 751-757.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügge, U. I. and Kunze, R.** (2003). ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiol* **131**, 16-26.
- Shahmuradov, I. A., Gammerman, A. J., Hancock, J. M., Bramley, P. M. and Solovye, V. V.** (2003). PlantProm: a database of plant promoter sequences. *Nucl. Acids Res.* **31**, 114-117.
- Shaibe, E., Metzger, E. and Halpern, Y. S.** (1985). Metabolic pathway for the utilization of L-arginine, L-ornithine, agmatine, and putrescine as nitrogen sources in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **163**, 933-7.
- Shelp, B. J., Bown, A. W. and McLean, M. D.** (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci* **4**, 446-452.
- Shewry, P. R., Napier, J. A. and Tatham, A. S.** (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 945-56.
- Shimaoka, T., Ohnishi, M., Sazuka, T., Mitsuhashi, N., Hara-Nishimura, I., Shimazaki, K.-I., Maeshima, M., Yokota, A., Tomizawa, K.-I. and Mimura, T.** (2004). Isolation of intact

vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **45**, 672-683.

Simpson, S. D., Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *The Plant Journal* **33**, 259-270.

Smart, C. M. (1994). Gene expression during leaf senescence. *New Phytol* **126**, 419-448.

Snedden, W. A. and Fromm, H. (1999). Regulation of the gamma-aminobutyrate-synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase, by calcium-calmodulin: a mechanism for rapid activation in response to stress. In *Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization*, (ed. H. R. Lerner), pp. 549-574.

Soldal, T. and Nissen, P. (1978). Multiphasic uptake of amino-acids by barley roots. *Physiol. Plant.* **43**, 181-188.

Solomon, P. S. and Oliver, R. P. (2002). Evidence that gamma-aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporium fulvum* infection of tomato. *Planta* **214**, 414-20.

Song, W., Steiner, H. Y., Zhang, L., Naider, F., Stacey, G. and Becker, J. M. (1996). Cloning of a second Arabidopsis peptide transport gene. *Plant Physiol* **110**, 171-8.

Song, W., Koh, S., Czako, M., Marton, L., Drenkard, E., Becker, J. M. and Stacey, G. (1997). Antisense expression of the peptide transport gene *AtPTR2-B* delays flowering and arrests seed development in transgenic Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* **114**, 927-935.

Soudry, E., Ulitzur, S. and Gepstein, S. (2005). Accumulation and remobilization of amino acids during senescence of detached and attached leaves: *in planta* analysis of tryptophan levels by recombinant luminescent bacteria. *J. Exp. Bot.* **56**, 695-702.

Stacey, G., Koh, S., Granger, C. and Becker, J. M. (2002). Peptide transport in plants. *Trends Plant Sci* **7**, 257-63.

Stalberg, K., Ellerstom, M., Ezcurra, I., Ablov, S. and Rask, L. (1996). Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the *napA* storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds. *Planta* **199**, 515-9.

Steiner, H.-Y., Naider, F. and Becker, J. M. (1995). The PTR family: a new group of peptide transporters. *Mol Microbiol* **16**, 825-834.

Steward, F. C., Thompson, J. F. and Dent, C. E. (1949). Gamma-aminobutyric acid: a constituent of the potato tuber? *Science* **110**, 439-440.

Streeter, J. G. (1985). Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity: I. Long term studies with a continuous supply of nitrate. *Plant Physiol* **77**, 321-324.

Tanaka, J. and Fink, G. R. (1985). The histidine permease gene (*HIP1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **38**, 205-14.

Tegeder, M., Wang, X. D., Frommer, W. B., Offler, C. E. and Patrick, J. W. (1999). Sucrose transport into developing seeds of *Pisum sativum* L. *Plant J* **18**, 151-61.

Tegeder, M., Offler, C. E., Frommer, W. B. and Patrick, J. W. (2000). Amino acid transporters are localized to transfer cells of developing pea seeds. *Plant Physiol.* **122**, 319-326.

- Tilsner, J., Kassner, N., Struck, C. and Lohaus, G.** (2005). Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta* **221**, 328-38.
- Timmermans, M. C., Maliga, P., Vieira, J. and Messing, J.** (1990). The pFF plasmids: cassettes utilising CaMV sequences for expression of foreign genes in plants. *J Biotechnol* **14**, 333-44.
- Truernit, E. and Sauer, N.** (1995). The promoter of the *Arabidopsis thaliana* *Suc2* Sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem - evidence for phloem loading and unloading by *Suc2*. *Planta* **196**, 564-570.
- Tsay, Y. F., Chiu, C. C., Tsai, C. B., Ho, C. H. and Hsu, P. K.** (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* **581**, 2290-300.
- Ueda, A., Shi, W., Sanmiya, K., Shono, M. and Takabe, T.** (2001). Functional analysis of salt-inducible proline transporter of barley roots. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1282-1289.
- Uemura, T., Tomonari, Y., Kashiwagi, K. and Igarashi, K.** (2004). Uptake of GABA and putrescine by UGA4 on the vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 1082-7.
- Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J.** (1999). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *The Plant Journal* **19**, 309-319.
- Van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flügge, U. I. and Kunze, R.** (2006). Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol* **141**, 776-92.
- Warren, K. C., Coyne, K. J., Waite, J. H., Cary, S. C.** (1998). Use of methacrylate de-embedding protocols for *in situ* hybridization on semithin plastic sections with multiple detection strategies. *J. Histochem. Cytochem.* **46**, 149-155.
- Waterworth, W. M., West, C. E. and Bray, C. M.** (2000). The barley scutellar peptide transporter: biochemical characterization and localization to the plasma membrane. *J. Exp. Bot.* **51**, 1201-1209.
- Waterworth, W. M., West, C. E. and Bray, C. M.** (2001). The physiology and molecular biology of peptide transport in seeds. *Seed Sci Res* **11**, 275-284.
- Waterworth, W. M., Ashley, M. K., West, C. E., Sunderland, P. A. and Bray, C. M.** (2005). A role for phosphorylation in the regulation of the barley scutellar peptide transporter HvPTR1 by amino acids. *J Exp Bot* **56**, 1545-52.
- Weber, H., Borisjuk, L. and Wobus, U.** (1997a). Sugar import and metabolism during seed development. *Trends Plant Sci* **2**, 169-174.
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N. and Wobus, U.** (1997b). 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, H., Heim, U., Golombek, S., Borisjuk, L. and Wobus, U.** (1998a). Assimilate uptake and the regulation of seed development. *Seed Sci Res* **8**, 331-345.
- Weber, H., Heim, U., Golombek, S., Borisjuk, L., Manteuffel, R. and Wobus, U.** (1998b). Expression of a yeast-derived invertase in developing cotyledons of *Vicia narbonensis* alters the carbohydrate state and affects storage functions. *The Plant Journal* **16**, 163-172.

- Weber, H., Rolletschek, H., Heim, U., Golombek, S., Gubatz, S. and Wobus, U.** (2000). Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing seeds of *Vicia narbonensis* moderately decreases starch but increases protein content and affects seed maturation. *The Plant Journal* **24**, 33-43.
- Weber, A. and Flügge, U.-I.** (2002). Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *J. Exp. Bot.* **53**, 865-874.
- Weber, H., Borisjuk, L. and Wobus, U.** (2005). Molecular physiology of legume seed development. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 253-79.
- Weschke, W., Panitz, R., Sauer, N., Wang, Q., Neubohn, B., Weber, H. and Wobus, U.** (2000). Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant J* **21**, 455-67.
- Weschke, W., Panitz, R., Gubatz, S., Wang, Q., Radchuk, R., Weber, H. and Wobus, U.** (2003). The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J* **33**, 395-411.
- West, C. E., Waterworth, W. M., Stephens, S. M., Smith, C. P. and Bray, C. M.** (1998). Cloning and functional characterisation of a peptide transporter expressed in the scutellum of barley grain during the early stages of germination. *Plant J* **15**, 221-9.
- Weston, K., Hall, J. L. and Williams, L. E.** (1994). Characterization of a glutamine/proton cotransporter from *Ricinus communis* roots using isolated plasma-membrane vesicles. *Physiologia Plantarum* **91**, 623-630.
- Wiedemuth, K., Muller, J., Kahlau, A., Amme, S., Mock, H. P., Grzam, A., Hell, R., Egle, K., Beschow, H. and Humbeck, K.** (2005). Successive maturation and senescence of individual leaves during barley whole plant ontogeny reveals temporal and spatial regulation of photosynthetic function in conjunction with C and N metabolism. *Journal of Plant Physiology* **162**, 1226-36.
- Wipf, D., Ludewig, U., Tegeder, M., Rentsch, D., Koch, W. and Frommer, W. B.** (2002). Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem Sci* **27**, 139-47.
- Wobus, U. and Weber, H.** (1999). Seed maturation: genetic programmes and control signals. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 33.
- Wright, K. M., Roberts, A. G., Martens, H. J., Sauer, N. and Oparka, K. J.** (2003). Structural and functional vein maturation in developing tobacco leaves in relation to *AtSUC2* promoter activity. *Plant Physiol* **131**, 1555-65.
- Wu, H. and Cheung, A. Y.** (2000). Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol Biol* **44**, 267.
- Yamada, K., Matsushima, R., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I.** (2001). A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* **127**, 1626-34.
- Yamagata, M., Matsumoto, S. and Ae, N.** (2001). Possibility of direct acquisition of organic nitrogen by crops *In* N Ae, J Arihara, K Okada, A Srinivasan, eds. *Plant Nutrient Acquisition: New Perspectives*. Springer-Verlag, Tokyo, 399-420.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

Yeung, A. K., Basu, S. K., Wu, S. K., Chu, C., Okamoto, C. T., Hamm-Alvarez, S. F., von Grafenstein, H., Shen, W. C., Kim, K. J., Bolger, M. B. et al. (1995). Molecular identification of a role for tyrosine 167 in the function of the human intestinal proton-coupled dipeptide transporter (hPepT1). *Biochem Biophys Res Commun.* **250**, 103.

Yohannes, E., Barnhart, D. M. and Slonczewski, J. L. (2004). pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **186**, 192-9.

Yoshida, S. (2003). Molecular regulation of leaf senescence. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 79-84.

Youle, R. J. and Huang, A. H. C. (1981). Occurrence of low-molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. *Am. J. Bot.* **68**, 44-48.

Zakharov, A., Giersberg, M., Hosein, F., Melzer, M., Müntz, K. and Saalbach, I. (2004). Seed-specific promoters direct gene expression in non-seed tissue. *J. Exp. Bot.* **55**, 1463-1471.

Zupan, A. L., Trobec, S., Gaberc-Porekar, V. and Menart, V. (2004). High expression of green fluorescent protein in *Pichia pastoris* leads to formation of fluorescent particles. *Recombinant Proteins and Host Cell Physiology* **109**, 115.

A Anhang

Abb. A 1: Nukleotidsequenz der *VfPTR1*-cDNA (AY289622) aus *V. faba*. Der ORF ist in blauer Schrift dargestellt.

```

1   GGCACGAGCTATGGGTTCCGTAGAGGACGATTCTTCGCGTTTGAAGAAGCGCTTATTCAGGATGAAGAA
71  AGTAAGCTATACACAGGAGATGGCTCGGTCGACTTTAAAGGGAGGCCTGTGCTTAAGAAGAATACTGGCA
141 ATTGAAAAGCTTGCCCATTTATCCTAGGCAATGAGTGTCTGTAACGTTTGGCATACTATGGCATTGCAAC
211 AAATCTTGTTAAACCTATCTTACTCGCCAAGCTACATGAAGGAAATGTCTCTGCGGCAAGAAAACGTCACC
281 ACTTGCAAGGCACCTGTTACCTTGCACCTCTCATTGGAGCAGTTCTAGCAGATTCTTACTGGGGACGAT
351 ACTGGACAATTGCCATTTTCTCCATGATTTATTTTCATTGGAATGGGTACGTTGACACTTTTCTGCTTCTAT
421 TCCAGCATTGAAGCCTGTGTAATGTCTGGGTGCTGTAcGCCCTCCAGCTACTCCTGCACAATATGCTGTG
491 TTCTTCATTGGTCTCTATCTGATTGCGCTTGGGACTGGTGGTATTAAACCATGTGTGTCTTCTTTTGGGG
561 CAGACCAGTTTGATGATACTGATTCGCGGGAAAGGGTTAAGAAGGGATCGTTTTTCAACTGGTTTTACTTT
631 TTCTATCAACATAGGAGCCCTCATATCAAGCAGTTTTTATGTGTGGATTCAAGAAAATGCAGGCTGGGGT
701 CTTGGATTTGGAATTCCTGCTTTATTTATGGGATTAGCTATCGGAAGCTTCTTTTTAGGCACACCCCTAT
771 ATAGGTTTCAAAAACCAGGAGGAAGCCCTTTACAAGAATGTGCCAGGTTGTGGCTGCATCTTTTCGGAA
841 ACGGAATCTTACTGTTCCCTGAAGATAGTAGTCTCCTCTATGAGACACCAGACAAGAGCTCTGCAATTGAA
911 GGAAGTCGAAACTACAGCATAGCGATGAATTAAGGTGTCTTGACAGAGCAGCTGTAATCTCTGATGATG
981 AAAGGAAAAGAGGTGACTATTCTAATTTGTGGAGACTTTGCACTGTGACACAGGTGGAGGAATAAAAAT
1051 CTTGATCCGCATGTTTCCAGTTTGGGCTACTGGGATAGTTTTTTCTGCTGTCTATGCTCAGATGTCAACA
1121 ATGTTTGTGGAACAAGGAACCTATGATGGACACTAGCGTTGGTTCTTTTCAAAATACCAGCAGCTTCCCTCT
1191 CAACTTTTGATGTAATCAGTGTATTTTCTGGGTCCCTGTCTATGACAGGTTTATAGTCCCATTGCAAG
1261 GAAATTTACTGGCAAAGAAAGGGGATTTTCAGAGTTGCAAAGAATGGGAATGGTCTTTTTTATTTCAGTC
1331 YTGTGCATGTCAGCTGCTGCTATTGTCGAGATTAAGCGTCTGCAGCTTGCCAAAGAGCTTGACCTTGTTG
1401 ATAAAGCTGTCCCCGTACCCTTACTATATTTTTGCAAATCCCCCAGTATTTCTTATTGGGAGCAGCAGA
1471 AGTATTCACATTTGTGGGGCAGCTTGAGTTCTTCTATGACCAATCTCCAGATGCTATGCGAAGTTTATGC
1541 AGTGCTCTGTCACCTTCTGACTACTTCGCTCGGAAATTACTTGAGTTCATTTCATTCTCACTGTGGTACTTT
1611 ACTTCACTACACGAGGGGGAAATCCTGGATGGATTCCGGATAACTTGAACAAAAGGTCATCTCGATTACTT
1681 TTCTGGCTTAGCTGGACTCAGCTTCTTAAATATGTTTCTGTACATAGTTGCTGCCAAAAGATACAAGTCA
1751 AAGAAGGCTTCGTAAAGGTTTTTCAGGCACCTGTTTGTAGTGGAACCACGTTTTTACAATTCCTTCTGTCA
1821 TTGTCGTGATTGATCTTTATGTAATATAATATGATATTATCAATTGCGTTGTAAAGGAAAATATTTGTT
1891 ATGCCCTGTTCAAAATAGTCCCTGCCCTCTTGTGATGGCAGTTTATGTTCACTCCCAAAATTGCAACT
1961 ATGACACTTGTAACCTTCTGATATCTAAAAGTTTGATACCCTTTGATGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. A 2: Abgeleitete Aminosäuresequenz von VfPTR1. Konservierte, für Mitglieder der PTR-Familie typische Sequenzmotive sind gelb hinterlegt. Abweichungen von der konservierten Sequenz sind in roter Schrift dargestellt.

```

1   MGSVEDDSSRLEEALIQDEESKLYTGDGSVDFKGRPVLLKNTGNWKACPFILGNECCERLAYYG IATNLV
71  TYLTRKLEHEGNVSAARNVTWQGTCTYLAPLI GAVLADS YWGRYWTIAIFSMIYFIGMGTLTLSASIPALK
141 PAECLGAVRPPATPAQYAVFFIGLYLIA LGTGGIKPCVSSFGADQFDDTDSRERVKKSFNWYFSINI
211 GALISSSFIVWIQENAGWGLGFGIPALFMGLAIGSFFLGTPLYRFQKPGGSPLTRMCQVVAASFRKRNL
281 VPEDSSLLYETPKSSAIEGSRKLQHSDELRLCLDRAAVISDDERKRGDYSNLWRLCTVTQVEELKILIRM
351 FPVWATGIVFSAVYAQMSTMFVEQGTMMDTSVGSFKIPAAASLSTFDVISVIFWVPVYDRFIVPIARKFTG
421 KERGFSELQRMGIGLFI SVLCMSAAAIVEIKRLQLAKELDLVDKAVPVPLTIFLQIPQYFLLGAAEVFTF
491 VGQLEFFYDQSPDAMRSLCSALSLLTSTLGNLSSFILTAVLYFTTRGGNPGWIPDNLNKGHLDYFFWLL
561 AGLSFLNMFLYIVA AKRYKSKKAS

```

Abb. A 3: Nukleotidsequenz des *VfPTR1* Promotors aus *V. faba*. Der putative Transkriptionsstart ist in blauer Schrift dargestellt, möglich Promotorelemente sind unterstrichen.

```

-1829 ATCAAAGGGAAAAACACTTACTTGGGAGAAGAGTGAGGAGCGACGGTGGTGGAGATGAACACACGGCAA
-1759 CGGCACGACGATCTCAACGACGCTAGGAAAACGCACGATGATTGAAAGCAGAGAAAATATGAGAGCGTGA
-1689 AGATGTGAAAACAAACCTATGGGTCCTGAAGCCCTATTTATAAAGATGACGTGGAATATGAAACGTGCGGT
-1619 TAGGGAACCACAAACCGCTCCGTCCTCGACGCCTACTCGCGTAAACAATGATGGCCCTACTCCCTAGGG
-1549 CGACGTTGTGGTATCCAAGAGTCGCGCCACGTCGTAACCTGGCGCATCACCACCTCCCGCGAGTGCTCC
-1479 TCGAACACTTCTCGATCGCTGCACGGGCAAATCACGAACCAGGCGATGTCTCACATCCCGATTGAAAA
-1409 CCCTTGTCGCGCAAGCGAGTCTCGCGAAGGGGCGAACTTGAATCAAGTCATAACTCCCGTACCAGGAG
-1339 CAACGACTTGGGGGGCTCTATTTGGACTGGGCTGCCTGTGGCCCAATCACTAGTGAGGCCCAATCCA
-1269 AGCTTGTC AACATATCGTGCTAAGCAGTATATTCTCTGAGCACACCCCAATCACGGGTATTTGGTCGGCT
-1199 ACGATTACTTCCCGCCAGTGCCTGCGAGGAACGTCCCCAACGAGCGCATGCTCCACCCGAGCACCCACCT
-1129 CGTAGGACTGACTTCCAACCTCTCCGAATTTTCGCGGAGTTCTCATGGTCCCGGGAAGATCGCGTCTTTAT
-1059 CCTCCCTGTCTTGCGGAGGACATCATCCAGGTAGGGGGCCACGTGCAGGTCTCCACTACTCACGTAGAAC
-989 CTGTCTGCTCTTTGTTGGGCTGTTTGTATCAGTCCCATAAAGAGACATTGGCTCAACGCTGATGGTTAT
-919 AAATACCCCTATTTTCGAGAGGGTCGGATATTCATCACCTACATACACTTGCTTGCTCATTCGGTCTC
-849 TCACTTTGCCATCAGAGTGTCTTGCAGGTACCCCCCATCTCCTTCAAATCTAGTCCGAAGCCAGCTGTGA
-779 CGGTCCAACCTCTGATCAAATGCGATCAATATCTAAAAGTAATGTTATTTGAATTAGACTAACCATTTTAA
-709 TCATGAGAATCCAAACGGTTGCACGAATTAATAAAAATGTTTAAAACCTCCTCTCTTCCATCAAAATTTA
-639 AATAATAAAAAATATCCTCCATTTAATTTTTTAAAAATTTAAAATTTAGCAACAAAAATTAGAAATAGATA
-569 AGGGACAACAAGTACACCATCATCCAGATTGATCGAACGGCCTCTTGCTTAAAAATTAGAAATTTGGTT
-499 TCCCACGGAAGCAGATCCACTGCAACGGAACAAACAAGTACACCATCATCCAGATTGATCGAACGGCTGT
-429 TGCTTAACTAATTTAGATCATCACAATCAAGTGTCAAAAAACGCATCTATTTACGGTTAAGATCGTTTG
-359 CATTTTATAGTTACAATACTAACAACCTAGACAGGATCACGGTGTATAGATAGATATTTCCACGAGAGAG
-289 AAATGGGACGGGTTGGCATGTTACTAGACGTCATTCCAGTATTTATTCATTAAATTTCAACTTGCGTCTCA
-219 ATCTCACTTCTCCGAAGCAACGTTCTTGTGTTGGTTGCTTAATTTCTAATGCAAGCAATCAACACCTAA
-149 CAAAAGACGATAAGTAATTCGGCGTAGTTGTATTGAGCATCCCAAGGATTAATTTATTTTATTCATTTCG
-79 ATCTAATTTATTATATTATCCATAAATAACCCCTCAATTTAGAAGCAGAACTGAAAGAGGATTTTGAAGC
-9 CTCATAGCT

```

Abb. A 4: Nukleotidsequenz der *VfAAP1*-cDNA (AJ318809) aus *V. faba*. Der ORF ist in blauer Schrift dargestellt.

```

1   AACCTCGTTTGAATTAACACCCTGTAGAAGAATTTGATGACAATGGAGGAGAAGGAAGAACACTCTAC
71  AGAAGCTGCAGTTACTTCACACAATGACTCCAAATTGTTTCGACGATGACGACCGTGTAAACGAACAGGA
141 ACGGTTTGGACAACAAGTTCGCATATAATAACAGCAGTAGTAGGATCAGGAGTGTGTTCGTTGGCATGGG
211 CGATAGCTCAATTGGGTTGGATAAATGGTTTATCAGTCATGATTTTCTTCAGTCTCATCACTTGGTATAC
281 TTCATCACTCCTATCCGAATGTTATCGAACAGGAGATCCTCATTTTCGGGAAAAGAACTATACTTTTCATG
351 GAAGCTGTTACACCATTCTCGGGGGTTTCTATGACACCCTTTGTGGGATAGTTCAGTACAGCAATCTTT
421 ATGGAAGTGCAGTAGGATACACAATGGTGCTTCCATTAGTATGATGGCAATAAAAAGGTCTAACTGTTT
491 CCATTCTCGGGAGGAAAAGATGGATGTCGCATTTCAAGCAATCCATACATGATCAGTTTTGGAGTAATC
561 CAAATTTTCTTTTCTCAAATTCAGATTTTCATGAAATGTGGTGGCTCTCAATTGTTGCAGCAATCATGT
631 CTTTCACCTATTCATTAATTGGCCTTGGTCTCGCAATTGCCAAAGTTGCAGAAAATGGTTCCTTCAAAGG
701 TAGTATCACAGGAGTAAGCATTGGAAGTGTGACAGAAGCCCAAAAAGTATGGGGAGTTTTCCAATCTCTT
771 GGCAACATAGCTTTCGCGTATTCATATTCACAAATTCCTATTGAAATTCAGGATACCATAAAAAGTCCAC
841 CTTCCGAGATGAAAACAATGAAGCAAGCCACAAAGATAAGTATAGGCGTGACAACGATATTTTACATGCT
911 TTGCGGCGGTATGGGCTATGCTGCATTTGGAGACTTGTCCACCAGGAAACTTACTCACTGGATTTGGTTTC
981 TATAATCCATATTGGCTCATTGATATTGCTAACGCCGCTCTCATAATTCATCTTGTGGGAGCATACCAAG
1051 TTTACGCGCAACCCTTATTTGCTTTCGTCGAGAAAATAATGATAAAAAGATGGCCTAAAATAAAAAGGA
1121 ATACAAACTTACAATTCCTGGTTTTTCGTCTTACCATCTAAATCTATTTAGATTAATTTGGAGGACTATA
1191 TTTGTGATCACAACAACATTTATATCAATGTTGATTCTTTCTTCAATGATGTTTTGGGATTAATTGGAG
1261 CAGCTGGATTTTGGCCTTTAACAGTTTATTTTCCAGTGGAGATGTATATCAAACAGAAGAAGATTACAAA
1331 ATGGAGTTATAAATGGATTAGTATGCAAACCTTAAGTGTATATGTTTTGTAGTATCAGTTGTGGCTTTT
1401 GTTGGATCAGTGTCAAGTATTGTGGTTGATCTTAAGAAATACAAACCATTACAACTGATTATTGAAATC
1471 CACTCAACTTTTATTGTATTCTTAAGGGTGTAGAAAGCAACTTTGGGTAGTGATTTATGTGGTTTTTGTGTA
1541 TCATTATCTATTAATAACAACAGTGCTAGTTAAAAA

```

Abb. A 5: Nukleotidsequenz der *HvAAP1*-cDNA aus *H. vulgare*. Der ORF ist in blauer Schrift dargestellt.

```

1   CGGCACGAGGCTCCAAGCTCCCCGCTAGCTAATAATCAATCCCACCGGCGAAACACACGCCAGTTGCCAT
71  CGTTTTCCCGATGGAGAAGAAGCAGGCGAGCTACGGGAAGGGCGCGCCAGGATGGCGCCCATGGAGGTG
141 TCCGTGGAGGCCGGGAACGGCCGGGAGTCCGACTGGCTTGACGACGACGGGCGGCCGCGTTCGGTTCGGGCA
211 CGGTGTGGACGGCGAGCGCCACATCATCACCGCCGTATCGGCTCCGGGGTCTCTCGCTGGCCTGGGC
281 CATCGCGCAGCTCGGCTGGGCGGGGGCCCCGCCATCATGCTCCTGTTTCGCGCTCGTTCATCTACTACACC
351 TCCACGCTCCTCGCCGAGTGCTACCGCTCCGGCGACCCGGAGACCGGCAAGCGCCACTACACCTACATGG
421 ACGCCGTCCGCTCCTACCTCCCAGGACCAAGGTGAAGCTCTGCGGCGTTCATCCAGTACGCCAACCTCGT
491 CGGCGTCGCCATCGGCTACACCATCGCCGCTCCATCAGCATGCGGGCGGTTCAGGAGGGCGGACTGCTTC
561 CATTACCACGACGTCAGGGGCCGAGCGGAAGGACTCGTGCAAGAGCTCCAGCAACCCCTACATGATCG
631 TGTTCCGGGTAGTGCAGATCCTCTTCTCGCAGATACCCGACTTCGACCAGATATGGTGGCTCTCCATCGT
701 CGCCCGCGTCATGTCTTACCTACTCCACCATCGGCCTCGGCCTCGGCATCGCCAGACGGTCGCCAAC
771 GGTGGCATCCAGGGCAGCCTMACCGGCCTCAGCGTCGGGCCAGGCGTCACCTCCATGCAGAAGGTGTGGC
841 GCAGCCTCCAGGCCTTCGGCAACATCGCCTTCGCCTACTCCTACTCCATCATCCTCATCGAAATCCAGGA
911 CACGGTGAAgGCGCCCGCCGTCGGAGGCGAAGGTGATGAAGAAGGCGACGGGGATAAGCGTGGCGACG
981 ACGACGGTGTCTACATGCTGTGCGGGTGCATGGGGTACGCGGCGTTCGGCGACGCGGCGCCGACAACC
1051 TCCTCACGGGGTTCGGCTTCTACGAGCCCTTCTGGCTGCTGGACGTGGCCAACGCCGCCATCGTGGTGCA
1121 CCTCGTCGGCGCCTACCAGGTCTTCTGCCAGCCCTCTTCGCCTTCGTCGAGAAGTGGGCGGCGCGAGG
1191 TGGCCCGACAGCGCCTTCATCGCCCGGAGCTCCGCGTGGGGCCCTTGGCCATCAGCGTCTTCCGGCTCA
1261 CATGGCGCACGGCCTTCGTCTGCCTCACCACCGTCGTCTCCATGCTGCTCCCTTCTTCGGCGACGTCGT
1331 GGGGCTCCTCGGCGCCGTCGCCTTCTGGCCGCTCACCGTCTACTTCCCCGTGGAGATGTACATCGTGCAG
1401 CGCGGCGTGCCAAGGGGGAGCACGCGTGGGTTTGCCTCCAGATGCTCAGCGCCGCTGCCTCGTCGTGT
1471 CCGTCGCGCCCGCGGCGGCTCCATAGCCGACGTCATCGGCGAGCTCAAGGAGTACCGGCCGTTTCAGCGG
1541 CTGAGGGATATTTTGTGTAGGGTGGTGGGTAGCACAGCGGCACATGGGGGCACATGTGCACGTACGGCTT
1611 GTGTGCTGCATGGAGACGGAGACAAAGTACCAAGCTTCTTGCCTCAACTTTTATCAAGTAGCACCCCTGTA
1681 GATACTTGATTTTCTCATGAAAGGACTCCTTACCTGCATTTTCGTTGCATCCTTTCTTCTTGGTAATA
1751 CTACTGTATKTCAGAATCAAATTAARAGGGCTTTTGTCCATTCAT

```

Abb. A 6: Nukleotidsequenz der *HvAAP2*-cDNA aus *H. vulgare*. Der ORF ist in blauer Schrift dargestellt.

```
1   CTATACCACCTTGGGTCGATTTAGTGGAGCGGTAAACCGGCCCTTTGAATTCCACCCCGCTCCCGCT
71  CCCTACCTCGTCTCGTTGACGTTGTAATCGCGGTGCTACTTACCTAGGAGTGAGATGGGGCAGAACGGC
141 GTGGGCAAGAACTACTATCAGGGGACGGCGGGCGGCCATGGAGGTGTCTCCGTGGAGCACGGCCAGG
211 CGGCGGCTTCCAAGTGCTACGACGACGACGGCCGCTCAAGCGCACCGGGACGATGTGGACGGCGAGCGC
281 CCACATCATCACGGCGGTGATCGGGTCCGGGTGCTGTGCTGGCCTGGGCCATCGGGCAGCTCGGCTGG
351 GTGGCCGGCCCCGCCGTCATGCTGCTCTTCTCCCTCGTCACCTACTACACCTCCTCGCTGCTCTCCGACT
421 GCTACCGCTCCGGCGACGAAACCACGGCAAGCGTAACTACACCTACATGGACGCCGTC AACGCCAACCT
491 CAGTGGCATCAAGGTCCAGCTCTGCGGGTTCCTGCAGTACGCCAACATCGTCGGCGTCGCCATCGGATAC
561 ACCATCGCCGCTCCATTAGCATGCTTGCATCAAGAAGGCCAACTGCTTCCACGTC AAGGGGCACGTGA
631 ACCCGTGCCACATCTCGAGCAGCCCTACATGATCATCTTCGGCGTGGCGGAGATCTTCTTCTCCAGAT
701 CCCGGACTTCGACCAGATCTCCTGGCTCTCCATCCTGGCTGCCATCATGTCTTCACTTACTCCATCATC
771 GGCCTCAGCCTCGGCATCGTCCAGGTGGTCGCCAAC AAGGGCGTCAAGGGCAGCCTCACCGGCATCAGCA
841 TCGGCGTCGTCACGCCCATGGACAAGGTGTGGCGGAGCCTCCAGGCGTTCGGTGACATCGCCTTCGCTTA
911 CTCCTACTCCCTCATCTCATCGAGATCCAGGACACCATCAGGGCGCCACC GCGTCCGAGTCCAAGGTC
981 ATGCGCCGCGCCACCGTCTGTCAGCGTCGCCACCACCACGCTCTTCTACATGCTCTGCGGCTGCATGGGCT
1051 ACGCCGCTTCGGCGACAACGCCCCCGGGAACTCCTCACAGGCTTCGGCTTCTACGAGCCCTTCTGGCT
1121 CCTCGACATCGCCAACGCCGCCATCGTCGTCCACCTCGTCGGCGCCTACCAGGTTTACTGCCAGCCCTG
1191 TTCGCCTTCGTGGAGAAGTGGGCGCAGCAGAGGTGGCCCAAGTCCCGGTT CATCACGGAGAGATCCAGG
1261 TCCCCTCATCTCCTCCGGCTTCAAGATCAACCTCTTCCGCCTGACGTGGCGGTCCGCGTTCGTGGTGGC
1331 CACGACGGTGGTGTGATGCTGCTGCCATTCTTCAACGACGTCGTGGGGTTCCTCGGCGCCATCGGGTTC
1401 TGGCCACTCACCGTCTACTTCGCCCCGTGGAGATGTACATTGTGCAGAAGAAGATA CCAAGTGGAGCTCA
1471 CAGTGGGTGTGCCTCCAGCTGCTCAGCCTCGCCTGCCTAATCATCACCATTGCTGCCGCCGCCGATCCA
1541 TCGCCGGGATAATGTCCGATCTAAAGGTCTACAAGCCTTTCTCCACGACTGACTGATCGATGCCTGGCCG
1611 TCGCATGAATGCACAGATCCTCGATGGACAGAATATGCCTAAAAGTTCTAATTAATTAATCAACCAATTA
1681 TCACACGTTTCGCTGAAAATTGCAAGTTCAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Abb. A 7: Nukleotidsequenz der *HvGAP1*-cDNA (EST-Klon HY04D16) aus *H. vulgare*. Der ORF ist in blauer Schrift dargestellt.

```
1   GGGTACACTTACCTGGTACCCACCCGGGTGAAAAATCGATGGGCCCGCGGCCCTCTAGAAGTACTCCG
71  CTCTTGTCATCCTCCAGGTCGCACAAGGAGTCAAGGAGGGCGAACATGGCAGGGCAGGGCAGCTACAGC
141 CGGCTCGCCGCCGACGAGGCCGCCGGGACATCCGCCGGCAGCAGCTACGACTCGAAGAAGCTCAGGCTGC
211 TCGGCTACGAGCCTCAGCTGAAGCGCAACCTCTCGCTGCTGTCCAATTCTCGGTGACCTTCTCGATCGT
281 GTCGGTGTGACGGGCATCACGACGCTGTACGGGACGGGGCTGGGGTTCGGCGGGCCGGTGACCATGGTG
351 TACGGCTGGCCCATCGCCGGCGCCTTCACCGTCGTCGTCGGCCTGGCCATGGCCGAGATCTGCTCCGCCT
421 ACCCCACCTCCGGCGGCCTCTACTTCTGGAGCGCCAGGCTCTGCAGCCAGCGCCGATGGGGCCCTTCGC
491 CTCATGGCTCACCGGCTGGTTTAAACATCGTTGGACAGTGGGCAGTGACAACGAGCGTGGACTACTCGCTG
561 GCGCAGCTGATCAAGGTGATCATCCTGCTGAGCACCGCGGCAACAACGGAGGAGGGTACCTGGCGTCCA
631 AGTACGAGGTGATCGCCATCCACGCCGCCATCCTGCTCAGCCACGCCCTCATCAACAGCCTCCCATAGC
701 ATGGCTCTCCTTCTTTGGCCGGTTTGGCGGGCTTGGAAACATGCTAGGTGTCTTTGTCTGATGATTGCT
771 GTGCCGGCTGTTGCTACCAGAGAGCCAGTGCCAAGTTCGCTTTCACCAATTTCAACACCGACAACAACG
841 CTGGAATTCACAGCCATGTCTACATCTTCTCCTGGGGCTCCTGATGAGCCAGTACACGCTCTTAGGTTA
911 CGACGCTCGGCGCATATGACGGAGGAGCAAGAACGCAGACAAGAACGGGCCGATCGGGATCATCAGC
981 GCCATCGGCATATCGATAGTGGTCGGCTGGGGTTACATACTCGGGGTCACGTTTGTGTCAAGGACATAC
1051 CCTCCCTGTTGAGCCCCGACAATGATGCTGGAGGGTACGCCATTGCCAGGTCTTCTACCAAGCCTTCAA
1121 GAGCCGCTACGGCAGCGGCGTCGGCGGGATCGTCTGCCTCGGGATCGTCGCCGTCGCCATTTACTTCTGC
1191 GGCATGAGCTCCGTCACGAGTAACTCAAGGATGGCGTATGCATTCTCGAGAGACGGGGCGATGCCGCTGT
1261 CATCCGTGTGGCACAAGTGAACGAGCACGAGGTGCCATCAACGCCGTCTGGCTCTCGGCTTTCGTCTC
1331 CCTCTGCATGGCGCTGCCGTCGCTGGGTAGCCTGGTGGCGTTCAGGCCATGGTGTCCATCGCCACGATC
1401 GGGCTCTACATCGCCTACGCGCTGCCCATCTTCTTCCGGGTGACGCTGGCGCGGAAGCACTTCGTCCCGG
1471 GACCCTTCAACCTCGGACGCTACAGCGTGTGGTGGGGTGGGTGGCCGTGCTCTGGGTGGTGACCATCAC
1541 CGTGCTCTTCTCGCTGCCGGTCATGTACCCGGTGACCAGGGACACGCTCAACTACACGCCGTCGCCGTC
1611 GGGGGCTCTTCATCCTCGTCTTGACGTCGTGGGTGCTCAGTGCCAGGCACTGGTTCAAGGGACCCGTCA
1681 CCAATTTGAGCGGCTAGCTTCAAAGTGTGTTGACGGAACGCCGTGGAGGATTAATTGTACTGCTGCAGCT
1751 ATATGTAGGCTGGTTGCATGGTTGTGTATGAGATTCTTAATAGAGGCTCATGGAATACAAAGCCCTCCA
1821 CACGAGGGACGTTGTAATTGTAATTACTTCATTCAACACGACCCGGCCGGAAGGCGCCGTGTTTTTTTAT
1891 TGAATTTGGGGTAAATCATACAGTGT'TTGCTTCGCGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Abb. A 8: In der Arbeit verwendete Plasmide ohne und mit Insert, die nicht selbst hergestellt wurden.

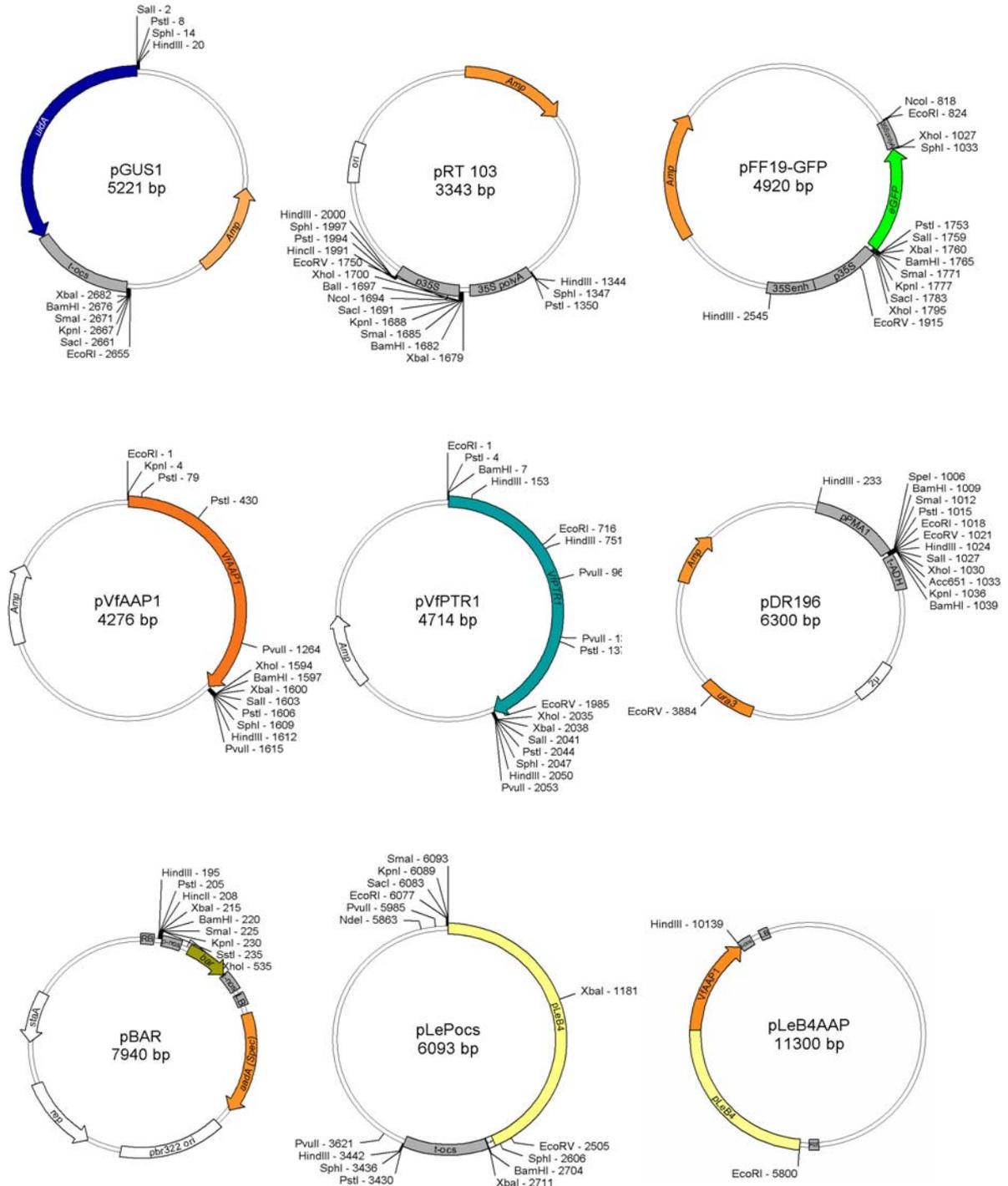
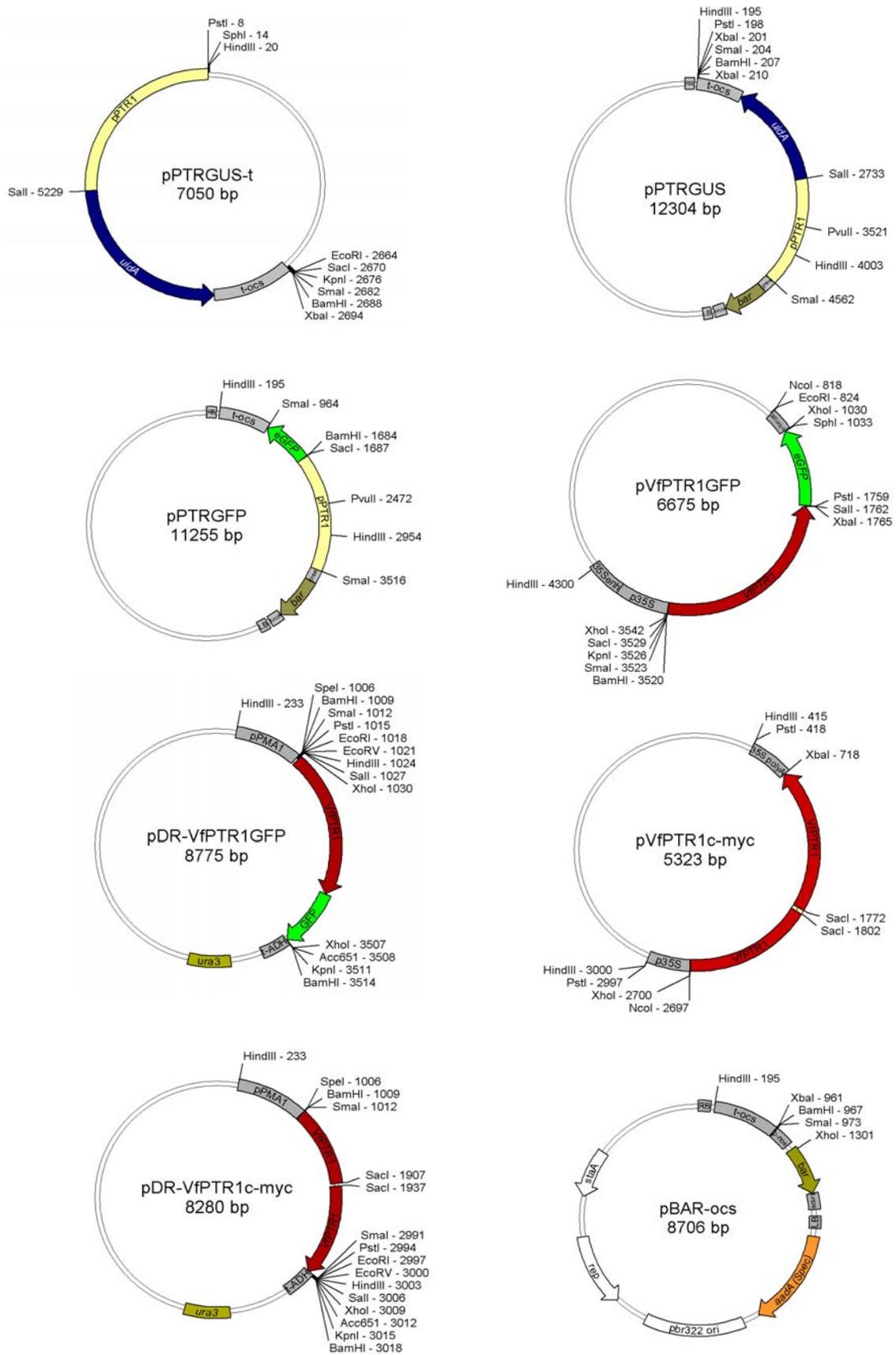
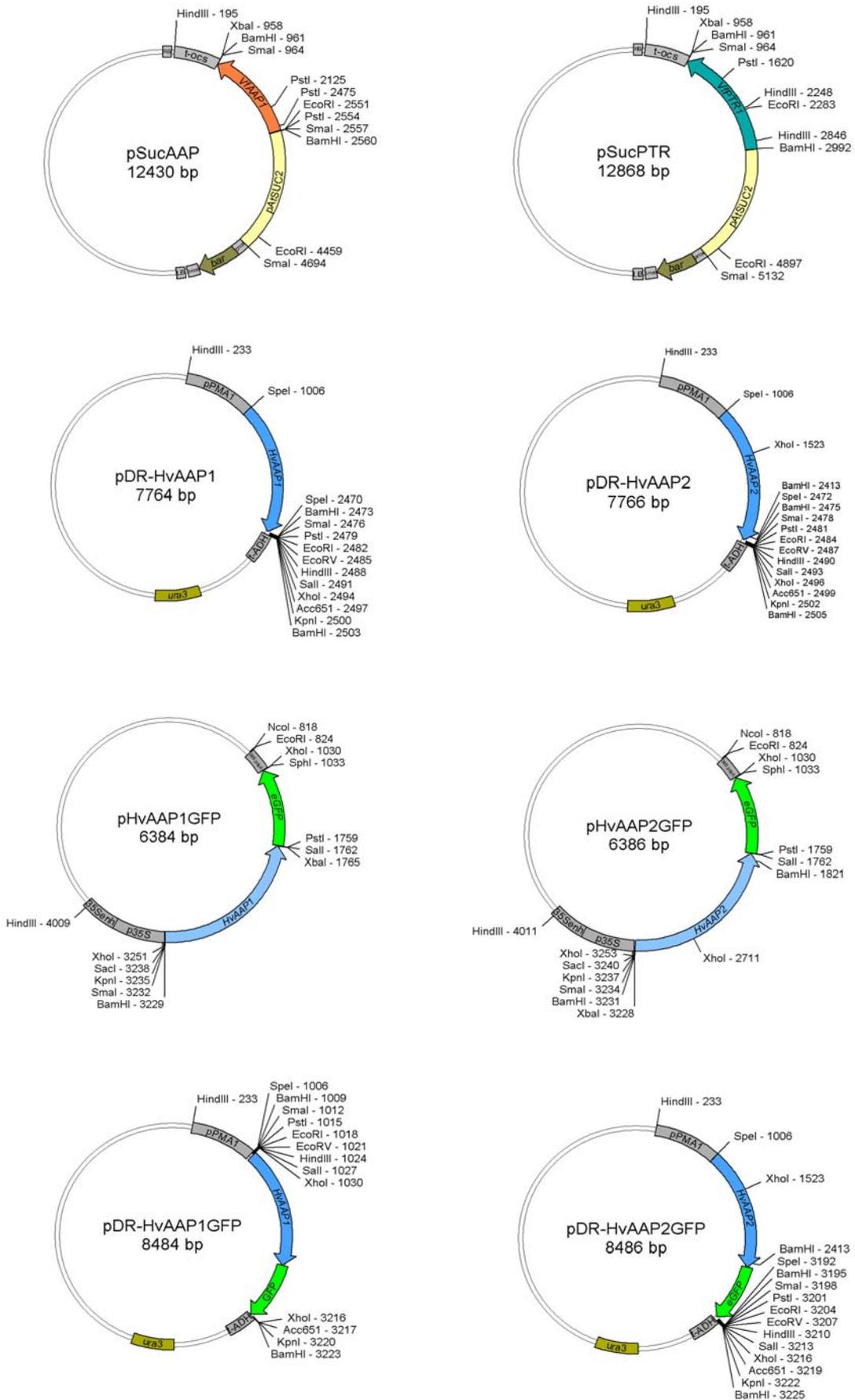


Abb. A 9: Während dieser Arbeit hergestellte Plasmide.





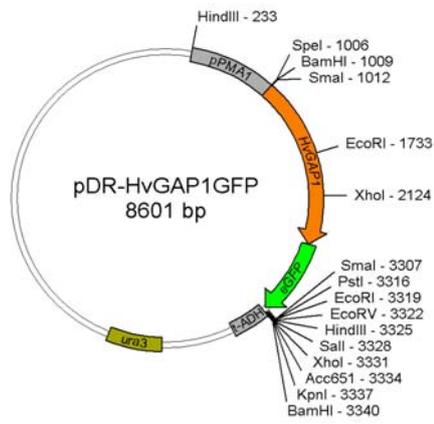
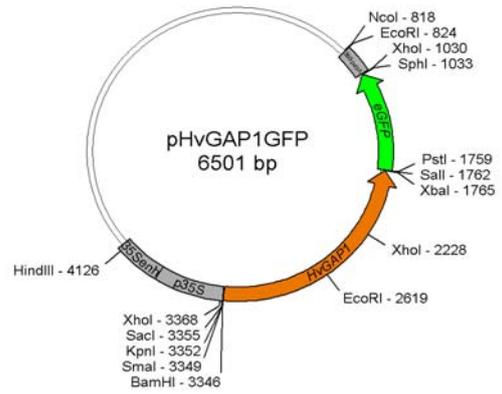
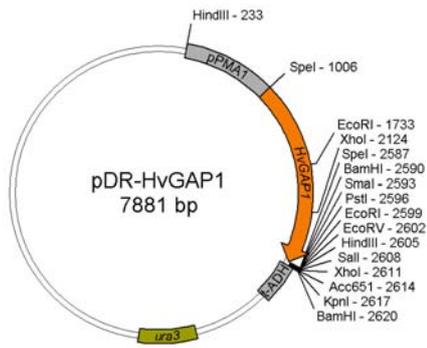
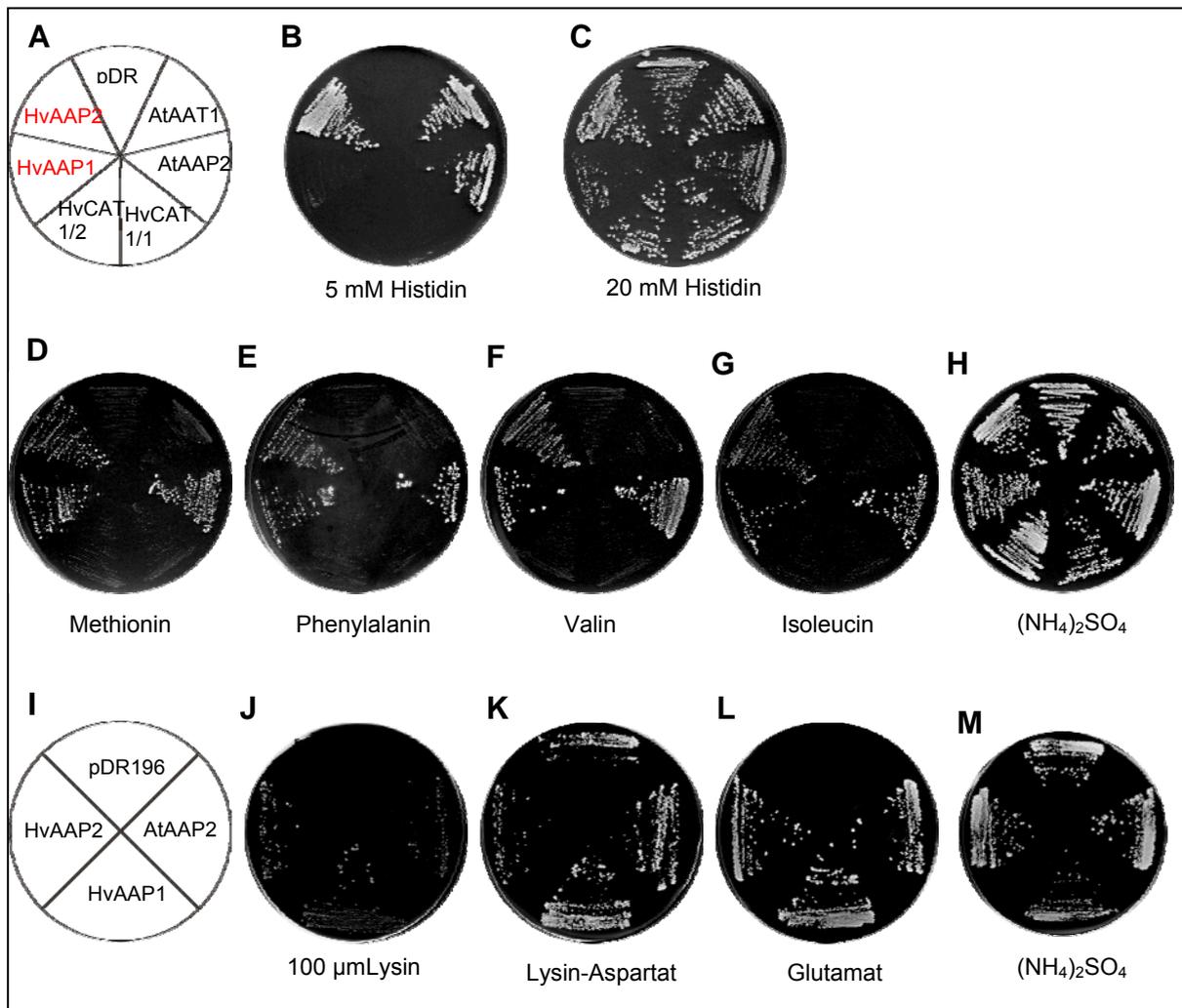


Abb. A 10: Funktionelle Komplementation verschiedener *S. cerevisiae* Mutanten durch HvAAP1 und HvAAP2. A-C: Stamm JT16, D-H: Stamm YDR544, I-K: Stamm 22Δ6AAL, L+M: Stamm 30.537a. A, I: Ausstreichschema; B, D-G, J, L: selektives Wachstum von Kolonien, die die cDNAs von *AtAAT1*, *AtAAP2*, (*Positivkontrollen*), *HvAAP1* und *HvAAP2*, *HvCAT1/1* und *HvCAT1/2* sowie den leeren Vektor pDR196 (*Negativkontrolle*) tragen, auf SC-Medium mit 5 mM Histidin (B), auf MM-Medium mit 1 mM Methionin, Phenylalanin, Valin, Isoleucin (D-G) und 100 µM Lysin (J) bzw. auf MM-Medium mit 1 g/l Glutamat (L). C, H, K, M: nicht-selektives Wachstum auf SC-Medium mit 20 mM Histidin (C) bzw. 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (H, M) und auf MM-Medium mit 1 g/l Urea und 1g/l Lys-Asp (K).



Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Winfriede Weschke und Herrn Dr. Hans Weber vom Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben für die Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung und Diskussionen sowie für die Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Wobus, ehemaliger Direktor des IPK und Arbeitsgruppenleiter der AG „Genwirkung“, bedanke ich mich, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit am IPK durchführen zu können.

Frau Dr. Isolde Saalbach und Frau Petra Hoffmeister aus der AG „Pflanzliche Reproduktionsbiologie“ danke ich für die Durchführung der Transformation und Kreuzung von Erbsenpflanzen. Bei Herrn Dr. Twan Rutten und Herrn Bernard Claus (AG „Strukturelle Zellbiologie“) bedanke ich mich für die Unterstützung am konfokalen Laserscanning Mikroskop und am Elektronenmikroskop.

Ein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Doris Rentsch (Universität Bern) für die Möglichkeit, die funktionelle Komplementation von Hefemutanten in ihrem Labor zu erlernen und für die Überlassung der Hefestämme.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Nicola Weichert, die mich beim Erlernen der real-time PCR und vieler anderer Methoden unterstützt hat.

Danke auch an Frau Dr. Annegret Tewes und Frau Sabine Skiebe für die Transformation von Protoplasten. Bei Frau Dr. Ljudmilla Borisjuk bedanke ich mich für die Hilfe bei den GUS-Färbungen. Frau Angela Schwarz danke ich für die Erbsentransformation und Frau Kathrin Blaschek für die Hilfe bei der Bestimmung von Sameninhaltsstoffen.

Ein besonderer Dank geht an Frau Angela Stegmann, Frau Gabriele Einert und Frau Elsa Fessel für die tägliche Hilfe im Labor sowie beim Ernten und Aufbereiten von Pflanzenmaterial.

Der gesamten Arbeitsgruppe „Genwirkung“ und allen, die nicht namentlich genannt wurden, danke ich für die freundliche und herzliche Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Vorträge und Poster

Vorträge:

Seiler, Christiane **Peptid- und Aminosäuretransporter in Leguminosen und Gerste**, Jahrestreffen im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms 1108, 1.-3. Dezember 2004, Hirschberg

Seiler, Christiane **PTR1 – a peptide transporter from *Vicia faba***, ISC – First IPK Student Conference 23.-25. Juni 2005, Gatersleben

Poster:

Nicola Weichert, Christiane Seiler, Paul Hein, Ljudmilla Borisjuk, Sabine Gubatz, Nicole Staroske, Hangning Zang, Ulrich Wobus, Hans Weber, Winfriede Weschke **The role of amino acid and peptide transporters during barley seed development**, Botanikertagung 5.-10. September 2004, Braunschweig

Christiane Seiler, Annegret Tewes, Ljudmilla Borisjuk, Manoela Miranda, Hans Weber, Winfriede Weschke, Ulrich Wobus **Peptide transport in legumes – Analyzing the role of VfPTR1**, ISC – Second IPK Student conference 29.5.-1.6.2006, Gatersleben

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Seiler
Vorname: Christiane
Anschrift: Bogenstr. 18
06507 Bad Suderode
Geburtsdatum: 09.02. 1980
Geburtsort: Lutherstadt Eisleben
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung

09.1986 – 07.1991 Robert Siewert Oberschule Bad Suderode
09.1991 – 07.1998 Süderstadt-Gymnasium Quedlinburg
Abschluss: Abitur (1,7)

Studium und beruflicher Werdegang

10.1998 – 07. 2003 Studium an der Technischen Universität Braunschweig
Fachrichtung: Biologie; Abschluss: Diplom („sehr gut“)
11. 2002 – 07. 2003 Diplomarbeit am Leibniz Institut für Pflanzengenetik und
Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, Abt.
Molekulare Genetik: „Isolation und Charakterisierung
von rekombinanten Antikörpern gegen die DNA-
Bindedomäne pflanzlicher Transkriptionsfaktoren“
10.2003 – 01. 2008 Promotion am Leibniz Institut für Pflanzengenetik und
Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, Abt.
Molekulare Genetik
seit 08. 2007 Wissenschaftliche Angestellte, Leibniz Institut für
Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)
Gatersleben, Abt. Molekulare Genetik

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe. Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Gatersleben, Januar 2008

Christiane Seiler