

# **Die Wirkung von xenobiotischem Phosphit auf die Phosphatmangelantwort und den Stoffwechsel von Pflanzen**

## **D i s s e r t a t i o n**

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I-Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Dipl.-Biotechnologin Ralitza Danova-Alt  
geboren am 24.02.1979 in Sofia, Bulgarien

Gutachter /in

1. Prof. Dr. Hell (Universität Heidelberg)
2. Prof. Dr. Humbeck
3. PD Dr. Köck

Halle (Saale), 16. Dezember 2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000014909**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014909>]



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	FUNKTION UND VORKOMMEN VON PHOSPHAT UND PHOSPHIT .....	1
1.2	DIE BEDEUTUNG DER PI-HOMÖOSTASE FÜR DEN STOFFWECHSEL IN PFLANZEN .....	2
1.2.1	Zelluläre Pi-Homöostase: cytoplasmatische und vakuoläre Pi-Pools .....	3
1.2.2	Pi-Homöostase in ganzen Pflanzen .....	3
1.3	WURZELMORPHOLOGISCHE ANPASSUNGEN UNTER PI-MANGEL .....	4
1.4	STRATEGIEN ZUR PI-MOBILISIERUNG .....	6
1.4.1	Sekretion organischer Säuren .....	6
1.4.2	Sekretion hydrolytischer Enzyme.....	8
1.4.3	Intrazelluläre Pi-Remobilisierung.....	10
1.5	PI-AUFNAHME AUS DER UMGEBUNG .....	11
1.5.1	Pi-Transportsysteme .....	11
1.5.2	Arten des Stofftransportes .....	12
1.5.3	Struktur und Funktion von Pi-Transportern .....	13
1.6	STOFFWECHSELVERÄNDERUNGEN UNTER PI-MANGEL.....	15
1.6.1	PPi-verbrauchende Reaktionen.....	15
1.6.2	Glykolytische Bypass-Reaktionen.....	17
1.6.3	Mitochondriale Respiration .....	18
1.6.4	Sekundärstoffwechsel unter Pi-Mangel.....	20
1.7	PHOSPHIT UND SEINE LANDWIRTSCHAFTLICHE RELEVANZ.....	21
1.8	ZIELSTELLUNG DER ARBEIT.....	24
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
2.1	CHEMIKALIEN.....	25
2.2	GERÄTE .....	28
2.3	ZELLSUSPENSIONSKULTUREN .....	29
2.4	PFLANZENANZUCHT .....	30
2.4.1	Anzucht von Tomatenpflanzen als Hydrokultur .....	30
2.4.2	Erdanzucht von Tomatenpflanzen .....	30
2.4.3	Pflanzen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	31
2.5	ANALYTISCH-BIOCHEMISCHE BESTIMMUNGEN .....	31
2.5.1	Phosphatbestimmung.....	31
2.5.1.1	Vorbehandlung von Proben für die Phosphatbestimmung.....	32
2.5.1.2	Malachitgrün-Methode .....	32
2.5.1.3	Ammoniummolybdat/Vanadat-Methode.....	33
2.5.2	Pigmentbestimmung.....	33
2.5.2.1	Chlorophyllbestimmung.....	33
2.5.2.2	Anthocyanbestimmung.....	34
2.5.2.3	Photosyntheseeffizienz .....	34
2.5.3	Proteinbestimmung.....	35
2.5.4	Enzymbestimmungen .....	35
2.5.4.1	$\alpha$ -Mannosidase .....	36
2.5.4.2	Malat-Dehydrogenase.....	36
2.5.4.3	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase .....	36
2.5.4.4	NADH-Cytochrom-c-Reduktase .....	36
2.5.4.5	$\beta$ -Glucuronidase .....	37
2.5.4.5.1	Fluorometrischer GUS-Assay für Zellextrakte.....	37
2.5.4.5.2	Histochemischer GUS-Assay für ganze Pflanzenorgane.....	37

---

2.6	MIKROSKOPISCHE ANALYSE .....	38
2.6.1	Mitose-Index .....	38
2.6.2	Vitalitätstest .....	39
2.7	DURCHFLUSSCYTOMETRISCHE ANALYSE .....	39
2.8	TRANSKRIPTIONSANALYSE .....	39
2.8.1	Isolierung von Gesamt-RNA .....	40
2.8.2	Northern-Blots .....	40
2.8.2.1	Lithiumchlorid-Fällung der Gesamt-RNA .....	40
2.8.2.2	Elektrophorese .....	40
2.8.2.3	RNA-Blot .....	41
2.8.2.4	cDNA-Sonden aus Plasmiden .....	41
2.8.2.5	PCR-amplifizierte cDNA-Sonden .....	41
2.8.2.6	Radioaktive Markierung der cDNA-Sonden .....	42
2.8.2.7	Hybridisierung und Autoradiographie .....	42
2.8.3	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) .....	42
2.8.3.1	DNase I Verdau .....	43
2.8.3.2	Reverse Transkription .....	43
2.8.3.3	Real-Time PCR .....	43
2.8.3.4	Quantitative Auswertung .....	44
2.8.4	Oligonukleotide .....	45
2.9	NMR-SPEKTROSKOPIE .....	46
2.9.1	<i>In vivo</i> <sup>31</sup> P-NMR .....	46
2.9.1.1	NMR-Messparameter .....	46
2.9.1.2	Perfusionssystem .....	46
2.9.2	<i>In vitro</i> <sup>31</sup> P-NMR .....	47
2.9.2.1	Perchlorsäureextrakte .....	48
2.9.2.2	NMR-Messungen .....	48
2.10	TRANSPORTVERSUCHE .....	48
2.10.1	Transportversuche mit Zellsuspensionskulturen .....	48
2.10.2	Transportversuche mit intakten Vakuolen .....	49
2.10.2.1	Isolierung und Reinigung von Protoplasten .....	49
2.10.2.2	Isolierung und Reinigung von Vakuolen .....	50
2.10.2.3	Aufnahmestudien und Siliconöl-Filtrationszentrifugation .....	51
2.10.3	Berechnung kinetischer Parameter .....	52
2.11	STATISTIK .....	52
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
3.1	PHYSIOLOGISCHE ANPASSUNGEN AN PI-MANGEL UNTER DEM EINFLUSS VON PHI ...	53
3.1.1	Wachstum und Morphologie .....	53
3.1.1.1	Wachstum von Zellkulturen .....	53
3.1.1.2	Wachstum von hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen .....	54
3.1.1.3	Hauptwurzellänge und Wurzel/Spross Verhältnis .....	55
3.1.2	Sekundäre Pflanzenstoffe und Photosyntheseleistung .....	57
3.1.2.1	Anthocyanakkumulation .....	58
3.1.2.2	Chlorophyllgehalt .....	58
3.1.2.3	Photosyntheseleistung .....	60
3.2	ZELLTEILUNGSRATE UND VITALITÄT .....	61
3.3	EXPRESSIONSANALYSE VON PSR-GENE .....	63
3.3.1	Genexpressionsstudien in Tomatenzellkulturen .....	64
3.3.2	Genexpressionsstudien in Tomatenkeimlingen .....	65

3.3.3	Einfluss von Phi auf die <i>RNaseLX</i> -Promotoraktivität .....	66
3.3.4	Wirkung von Phi auf die Genexpression der <i>RNaseLE</i> .....	67
3.3.4.1	Wundinduktion .....	68
3.3.4.2	Zellwandabbau .....	69
3.4	MEMBRANTRANSPORTSTUDIEN .....	70
3.4.1	Transportstudien mit Tomatenzellkulturen ( <i>S. lycopersicum</i> ) .....	70
3.4.1.1	Charakterisierung des Pi-Transportsystems .....	70
3.4.1.2	Kompetitionsversuche .....	73
3.4.2	Transportstudien mit BY-2 Tabakzellen .....	76
3.4.2.1	Charakterisierung des Transportsystems .....	76
3.4.2.2	Kompetitionsversuche .....	77
3.4.3	Transportstudien mit intakten Vakuolen .....	79
3.4.3.1	Ausbeute- und Reinheitscharakterisierung.....	79
3.4.3.1.1	Analyse mittels Markerenzymaktivitäten .....	79
3.4.3.1.2	Durchflusscytometrische Analyse von Vakuolenpräparationen.....	80
3.4.3.2	Siliconöl-Filtrationszentrifugation .....	81
3.4.3.3	Aufnahmebedingungen.....	83
3.4.3.4	Pi-Transportstudien .....	84
3.5	IN VIVO <sup>31</sup> P-NMR STUDIEN ZUR AUFNAHME UND SUBZELLULÄREN ANREICHERUNG VON PI UND PHI .....	86
3.5.1	Pi-Stoffwechsel nach Pi-Mangel .....	86
3.5.2	Zuordnung von Phi zu Cytoplasma und Vakuolen.....	89
3.5.3	Der Einfluss von Phi auf den Pi-Stoffwechsel nach Pi-Mangel.....	91
3.5.4	Der Einfluss von Pi in Phi-gesättigten Zellen .....	94
3.5.5	Phi-Anreicherung in Pi-gesättigten Zellen .....	96
3.6	TRANSPORTSTUDIEN IN GANZEN PFLANZEN MITTELS IN VITRO <sup>31</sup> P-NMR .....	97
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>100</b>
4.1	PI-AUFNAHMESYSTEME VON TOMATEN- UND TABAKZELLEN .....	100
4.2	PHI INHIBIERT DAS HOCH-AFFINE PI-TRANSPORTSYSTEM.....	102
4.3	IN VIVO NACHWEIS VON PHI DURCH <sup>31</sup> P-NMR IN PFLANZENZELLEN .....	104
4.4	EINFLUSS VON PHI AUF STOFFWECHSEL UND ENERGIELADUNG .....	107
4.5	PHI BEEINFLUSST DIE PI-MANGELANTWORT .....	110
4.5.1	Phi unterdrückt die Expression der <i>PSR</i> -Gene .....	110
4.5.2	Phi beeinflusst Morphologie und Zellteilung .....	114
4.6	PHI INTERFERIERT MIT DER CYTOPLASMATISCHEN PI-WAHRNEHMUNG .....	116
4.7	TRANSPORTMECHANISMEN VON PI UND PHI IN DIE VAKUOLE .....	119
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>124</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>I</b>
7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	I
7.2	TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
7.3	ZELLKULTURMEDIEN .....	VII
7.4	pH-ABHÄNGIGE CHEMISCHE VERSCHIEBUNG VON PI.....	X
7.5	BERECHNUNG KINETISCHER PARAMETER .....	XI
7.5.1	Transportgeschwindigkeit .....	XI

7.5.2	Michaelis-Menten-Kinetik .....	XI
7.5.3	Eadie-Hofstee Linearisierung .....	XII
7.5.4	$IC_{50}$ -Wert und Hill-Kinetik .....	XII
7.5.5	Dixon-Plot .....	XIII
7.6	SUBSTRATAFFINITÄT DES PI-TRANSPORTSYSTEMS .....	XIV
7.7	IN VIVO $^{31}\text{P}$ NMR VON TOMATENZELLEN .....	XV
7.8	DANKSAGUNG .....	XVI
7.9	LEBENS LAUF .....	XVII
7.10	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....	XIX

2':3'-cNMP	2':3' zyklisches Nukleotidmonophosphat
<sup>31</sup> P-NMR	<sup>31</sup> P-Kernresonanzspektroskopie
3'-dNMP	3'-Desoxyribonukleosid-5'-monophosphat
3-PG	3-Phosphoglycerat
5'-dNMP	5'-Desoxyribonukleosid-5'-monophosphat
A	Absorption
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AOX	Alternative Oxidase
APase	saure Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AtPT1	Pi-Transporter 1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtPT2	Pi-Transporter 2 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
BAP	Bakterielle Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaar (DNA)
BSA	Bovines Serum Albumin
CCCP	Carbonyl-cyanid-m-chlorphenylhydrazon
cDNA	copy DNA
CPW	„Cell Protoplast Washing“ Medium
cyt	cytoplasmatisch
$\Delta\mu\text{H}^+$	elektrochemisches Membranpotenzial
D <sub>2</sub> O	Deuteriertes Wasser
DAHP-Synthase	3-Deoxy-D-Arabinose-7-Phosphat-Synthase
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dN	Desoxyribonukleosid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	2,4-Dinitrophenol
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EPSP	Enolether-5'-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	„Expressed Sequence Tags“
EtOH	Ethanol
$F_0$	Grundfluoreszenz
FCCP	fluoromethoxyphenylhydrazon
FDA	Fluoresceindiacetat
FG	Frischgewicht
$F_m$	maximale Fluoreszenz
fmol	femtomol
$F_v$	variable Fluoreszenz
g	Gramm
G6P	Glukose-6-Phosphat
GAP	Glycerinaldehydphosphat
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GUS	$\beta$ -Glucuronidase

h	Stunde
H <sup>+</sup> -ATPase	H <sup>+</sup> -ATP-abhängige Phosphatase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
Hz	Herz
IC <sub>50</sub>	die Substratkonzentration, die zu einer halbmaximalen Hemmung der Aufnahme führt
K <sub>i</sub>	Inhibitor konstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LePS2	saure Phosphatase aus <i>Solanum lycopersicum</i>
LePT1	Pi-Transporter 1 aus <i>Solanum lycopersicum</i>
LePT2	Pi-Transporter 2 aus <i>Solanum lycopersicum</i>
µL	Mikroliter
µM	µmol/L
MDP	Methylendiphosphonat
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonat
MFS	“Major Facilitator Super” Familie
min	Minute
mM	mmol/L
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
MS	Murashige-Skoog (Nährmedium)
msec	Millisekunde
MU	4-Methyl-Umbelliferon
MUG	4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid
MUG	Methylumbelliferil-β-D-Glucuronid
NAD-GAPDH	NAD-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH-DH	NADH-Dehydrogenase
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADP-GAPDH	NADP-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat
NDP	Nukleosiddiphosphat
nm	Nanometer
NTP	Nukleosidtriphosphat
NtPT1	Pi-Transporter 1 aus <i>Nicotiana tabacum</i>
NtPT2	Pi-Transporter 2 aus <i>Nicotiana tabacum</i>
OA	organische Säuren
OA <sup>-</sup>	Anionen der organischen Säuren
OD	optische Dichte
PAP	Purple Acid Phosphatase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFK	ATP-abhängige Phosphofruktokinase
PFP	PPi-abhängige Phosphofruktokinase
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
Phi	Phosphit, H <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Pho5	saure Phosphatase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pho84	hoch-affiner Pi-Transporter aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PHO-Regulon	Phosphatase-Regulon in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> bei Pi-Mangel
PHS	Phosphat-H <sup>+</sup> -Symporter Proteinfamilie
Pht	Phosphat-Transporterprotein
Pi	Orthophosphat, H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>



PIN2	ProteinaseInhibitor2 aus <i>Solanum lycopersicum</i>
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonat)
pK	Dissoziationskonstante
pmol	Pikomol
PPi	Pyrophosphat
ppm	parts per million
PRPP	5'-Phospho-a-D-Ribulose-1-Pyrophosphat
PSII	Photosystem II
<i>psr1</i> -Mutante	“phosphate starvation response1” Mutante
<i>PSR</i> -Gene	Phosphate Starvation Responsive Gene
<i>pup</i> -Mutante	“phosphatase under-producer” Mutante
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
<i>rhd</i> -Mutante	“root hair defficient” Mutante
Ribulose-5'-P	Ribulose-5'-Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNaseLE	Ribonuklease Lycopersicon extrazelulär
RNaseLV 1-3	Ribonuklease Lycopersicon vakuolär 1 bis 3
RNaseLX	Ribonuklease Lycopersicon ER-lokalisiert
rpm	Umdrehung/min
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
sec	Sekunde
StPT1	Pi-Transporter 1 aus <i>Solanum tuberosum</i>
StPT2	Pi-Transporter 2 aus <i>Solanum tuberosum</i>
TCA-Zyklus	Trikarbonsäurezyklus
TG	Trockengewicht
TMD	Transmembrandomän
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Proteinaktivität)
Ubi	Ubiquitin
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDPG	UDP-Glukose
UQH2	Ubihydrochinon
UTP	Uridin-5'-triphosphat
v/v	Volumen/Volumen
vac	vakuolär
VA-Mykorrhiza	vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza
V-ATPase	vakuoläre ATP-abhängige Phosphatase
Vmax	maximale Transportgeschwindigkeit
V-PPiase	vakuoläre PPI-abhängige Phosphatase
W	Watt
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronid



# 1 Einleitung

## 1.1 Funktion und Vorkommen von Phosphat und Phosphit

Phosphor ist ein essenzielles Element in allen lebenden Systemen. Pflanzen nehmen Phosphor in seiner vollständig oxidierten Form als Orthophosphat ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , Pi) auf. Die biologische Funktion von Phosphat ist vielfältig. Phosphat ist Bestandteil von Nukleinsäuren, Coenzymen und Zuckerphosphaten. Es ist in Phospholipiden enthalten, die ein Strukturelement biologischer Membranen sind. Die energiereichen Phosphorsäureanhydrid-Bindungen in ATP und Pyrophosphat (PPi) spielen eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung verschiedener Proteine hat eine Schlüsselfunktion bei der Übermittlung von Signalen innerhalb und zwischen Zellen, wodurch Prozesse wie Zellteilung, Differenzierung, Stoffwechsel, Pathogenabwehr und Reaktionen auf abiotischen Stress gesteuert werden (Tena *et al.*, 2001). Phosphat übt außerdem einen regulierenden Effekt auf grundlegende biochemische Prozesse wie Photosynthese, Respiration und zentralen Kohlenstoffwechsel aus (Sivak & Walker, 1986, Paul & Stitt, 1993, Theodorou & Plaxton, 1995). Dies macht Phosphor zu einem der wichtigsten Makronährstoffe für den Pflanzenstoffwechsel und das Pflanzenwachstum.

Obwohl Pi lebensnotwendig ist, ist es einer der am meisten limitierten Nährstoffe in vielen terrestrischen und aquatischen Ökosystemen (Bielecki, 1973). Zum einen ist seine Aufnahme durch die Wurzel der Pflanzen aufgrund sehr niedriger Diffusionsrate von Pi im Boden ( $10^{-12}$  bis  $10^{-15} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ) beschränkt (Schachtman *et al.*, 1998). Zum anderen besitzt Pi hohe komplexbildende Eigenschaften. Ungefähr 80 % des gesamten Pi im Boden ist in Form von schwer löslichen anorganischen (Al-, Fe- und Ca-Phosphat) oder organischen (Phytat, Phospholipide, Nukleinsäuren) Komplexen gebunden (Holford, 1997). Obwohl der gesamte Pi-Gehalt im Boden hoch ist, ist die lösliche und damit für Pflanzen zugängliche Konzentration von Pi niedrig und übersteigt selten  $10 \mu\text{M}$  (Marschner, 1995).

Reduzierte Phosphorverbindungen wie z. B. Phosphit ( $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ , Phi) kommen in der Natur ebenfalls vor. Phosphite, vor allem  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  und  $\text{AlPO}_3$ , finden eine breite Anwendung in der Landwirtschaft, hauptsächlich als Wirkstoff gegen Pilzbefall. Durch seine extensive landwirtschaftliche Anwendung gelangt Phi heutzutage in beträchtlichen Mengen in die Umwelt. Der Phi-Eintrag wird in den terrestrischen und aquatischen Ökosystemen zusätzlich durch industrielle Abwässer und Abfälle wesentlich erhöht (Ohtake *et al.*, 1996). Dies führt zur enormen Belastung der Bodenfauna und -flora sowie der Kulturpflanzen (McDonald *et*

*al.*, 2001a, Malusa & Tosi, 2005). Insbesondere bei suboptimaler Pi-Versorgung und Pi-Mangel könnte Phi direkte Konsequenzen für den industriellen Pflanzenbau haben. Die Rolle von Phi im Pflanzenstoffwechsel wie auch im gesamten Ökosystem muss deshalb im Zusammenhang mit der gleichzeitigen Pi-Versorgung betrachtet werden. Darum werden in den folgenden Kapiteln der Einleitung die Anpassungsstrategien von Pflanzen an Pi-Mangel ausführlich besprochen. Das letzte Kapitel der Einleitung ist der landwirtschaftlichen Relevanz von Phi gewidmet.

## **1.2 Die Bedeutung der Pi-Homöostase für den Stoffwechsel in Pflanzen**

Der Ablauf vieler physiologischer Prozesse hängt von einer stabilen Pi-Konzentration im Cytoplasma ab. Die Photosynthese und der Verlauf des zentralen Kohlenstoffwechsels während der Licht- und Nachtperiode stehen in enger Verbindung mit der Pi-Homöostase. Verschiedene Translokatoren in der inneren Hüllmembran der Plastiden transportieren Kohlenstoffgerüste (z. B. Triosephosphate, Hexosephosphate, Phosphoenolpyruvat) im Austausch gegen Pi (Weber *et al.*, 2005). Diese Transportprozesse sind wichtige Schnittpunkte primärer Stoffwechselwege mit den verschiedenen intraorganellen und cytoplasmatischen Pi-Pools der Zelle. Ist die Pi-Homöostase gestört, werden auch die Transportprozesse dieser Metaboliten beeinträchtigt. Beispielsweise werden die während der photosynthetischen CO<sub>2</sub>-Fixierung gebildeten Triosephosphate (Dihydroxyacetonphosphat, 3-Phosphoglycerat) für die Synthese von Saccharose in das Cytoplasma exportiert, um nicht-grüne, heterotrophe Pflanzengewebe wie Wurzeln, Knollen und Früchte mit Kohlenhydraten zu versorgen (Hammond & White, 2008). Der Export der Triosephosphate findet über einen Triosephosphat/Pi-Translokator statt, der gleichzeitig das im Cytoplasma freigesetzte Pi zurück in die Plastiden importiert. Den Import von Phosphoenolpyruvat (PEP) in die Chloroplasten vermittelt ein anderer PEP/Pi-Translokator. Dort wird PEP zur Synthese von aromatischen Aminosäuren über den Shikimat-Weg verwertet. In Amyloplasten werden Stärke und Fettsäuren aus Glukose-6-Phosphat (Glc-6-P) synthetisiert. Ein Glc-6-P/Pi-Translokator tauscht Glc-6-P gegen Triosephosphat oder Pi aus. Auch in Mitochondrien ist der Pi-Import essenziell für die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP. Ohne den stetigen Ausgleich der Pi-Bilanz könnte aus der Atmungskette kein ATP gewonnen werden. Aus diesen Beispielen wird ersichtlich, dass Pi-Mangel zum Erliegen zahlreicher physiologischer Prozesse führen kann. Darum sind die cytoplasmatische Pi-Konzentration

und die Aufrechterhaltung des Pi-Gleichgewichtes (Pi-Homöostase) durch entsprechende Translokatoren von großer Bedeutung für die Pflanzengesundheit und den physiologischen Status der Zellen.

### 1.2.1 Zelluläre Pi-Homöostase: cytoplasmatische und vakuoläre Pi-Pools

Die Phosphorsäure ist eine mehrprotonige Säure und ihre Protolyse ist eine Funktion des pH-Wertes. Im Cytoplasma existierten Phosphat-Anionen ungefähr in gleichen Mengen als  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  und  $\text{HPO}_4^{2-}$  ( $\text{pK}=7.2$ ). In der Vakuole findet sich Pi vorwiegend in seiner monovalenten Form ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{pK}=2.1$ ). Während der cytoplasmatische Pi-Pool bei ausreichender Pi-Versorgung relativ konstant gehalten wird, fungiert die Vakuole als Speicherkompartiment für Pi (Lee *et al.*, 1990, Lee & Ratcliffe, 1993). Dies konnte durch *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR Untersuchungen gezeigt werden. Durch die pH-abhängige chemische Verschiebung von Pi konnten der cytoplasmatische ( $\text{pH}\approx 7.0$ ) und der vakuoläre ( $\text{pH}\approx 5.0$ ) Pi-Pool als zwei getrennte Signale in der Pflanzenzelle detektiert werden (Loughman *et al.*, 1989). Der vakuoläre Pi-Pool beinhaltet 85-95 % des Gesamtphosphats in der Zelle (Bileski & Ferguson, 1983). Die *in vivo* NMR-Messungen zeigten, dass der vakuoläre Pi-Pool Fluktuationen in der cytoplasmatischen Pi-Konzentration kompensiert (Mimura, 1995, Mimura *et al.*, 1996). Erst wenn die vakuolären Pi-Reserven komplett erschöpft sind, nimmt Pi im Cytoplasma ab und die Zelle erfährt einen schweren Pi-Mangelstress (Lee *et al.*, 1990, Mimura *et al.*, 1990, Lee *et al.*, 1993). Gleichzeitig werden verschiedene Rettungsmechanismen induziert, um den Pi-Mangel zu bewältigen.

### 1.2.2 Pi-Homöostase in ganzen Pflanzen

Zur Sicherung der Pi-Homöostase in ganzen Pflanzen werden die Pflanzenorgane durch Ferntransport über Xylem und Phloem mit Pi versorgt. Bei ausreichender Pi-Versorgung wird Pi über das Xylem von den Wurzeln zu den jüngeren Blättern und reproduktiven Organen transportiert. Unter Pi-Mangel findet zusätzlich zum Xylemtransport auch eine Remobilisierung und Allokation von Pi von älteren zu jüngeren Blättern (Mimura *et al.*, 1996) und von Pi-versorgten zu Pi-bedürftigen Geweben statt ("split-root" Experimente, Liu *et al.*, 1998). Das Wurzelsystem wird unter Pi-Mangel über das Phloem mit Pi aus dem Spross versorgt. Interessanterweise wird ungefähr 50 % des remobilisierten Phosphats wieder in das Xylem beladen und zum Spross zurück transportiert (Jeschke *et al.*, 1997).

Die genauen Regulationsmechanismen der Pi-Umverteilung innerhalb der Pflanze sind bislang noch ungenügend aufgeklärt. Es wurden zwei Mutanten aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben (*pho1* und *pho2*), die bei der Regulation der Influx- und Effluxprozesse von Pi beeinträchtigt sind (Poirier *et al.*, 1991, Delhaize & Randall, 1995). Die *pho1*-Mutante ist fehlerhaft in der Beladung von Pi zum Xylem. Die Pi-Aufnahme in die Wurzeln bleibt dagegen vergleichbar der Pi-Aufnahme der Wildtyppflanze. Demzufolge leiden die oberirdischen Teile der Pflanze an konstitutivem Pi-Mangelstress. Trotz seiner Rolle in der Pi-Homöostase ist es nicht klar, ob *Pho1* eine regulatorische oder eine Transporter-Funktion in der Pflanze erfüllt (Wang *et al.*, 2004). Die *pho2*-Mutante zeigt eine 2- bis 4-fach höhere Akkumulation von Pi im Vergleich zu Wildtyppflanzen, was auf einen Defekt in der Beladung in das Phloem hindeutet. Das *Pho2*-Gen kodiert eine E2-Konjugase, welche eine Komponente der Pi-Mangelsignaltransduktionskette ist und die Pi-Allokation zwischen Spross und Wurzeln reguliert (Aung *et al.*, 2006, Bari *et al.*, 2006, Chiou, 2007).

Zur Erhaltung der Pi-Homöostase wirkt in Pflanzen ein komplexes System von Regulationsprozessen, das die Wahrnehmung der Pi-Levels in den zellulären und extrazellulären Kompartimenten sowie die Verteilung von Pi zwischen Zellorganellen und in der ganzen Pflanze einschließt. Zur Aufrechthaltung der Pi-Homöostase reagieren Pflanzen mit Anpassungsreaktionen auf morphologischer, transkriptioneller und biochemischer Ebene auf Pi-Mangel (Raghothama, 1999, Abel *et al.*, 2002, Vance *et al.*, 2003).

### **1.3 Wurzelmorphologische Anpassungen unter Pi-Mangel**

Das Wurzelsystem der Landpflanzen ist essenziell für die Wasser- und Nährstoffversorgung der oberirdischen Pflanzenteile. Mangel an freiem Pi im Boden kann charakteristische Änderungen in der Architektur des Wurzelsystems auslösen, durch welche die Pi-Verfügbarkeit für die Pflanze verbessert wird (Lynch, 1995, Williamson *et al.*, 2001, Lopez-Bucio *et al.*, 2003, Lambers *et al.*, 2006). Wurzeleigenschaften, welche die Erschließung von Pi und anderen Nährstoffen aus dem Boden erhöhen, sind unter anderem eine erhöhte Wurzelhaarbildung, eine verstärkte Lateralwurzelentwicklung und bei manchen Pflanzenarten die Bildung von Proteoidwurzeln. Diese morphologischen Änderungen ergeben ein erhöhtes Wurzel/Sproß-Verhältnis, was eine charakteristische, gut messbare Eigenschaft von Pi-verarmten Pflanzen ist.

Je nach Pflanzenart können bis zu 90 % des gesamten aufgenommenen Pi über die Wurzelhaare in die Pflanzen gelangen (Föhse *et al.*, 1991). Deren Bildung wird durch die lokale Pi-Verfügbarkeit reguliert (Gahoonia & Nielsen, 1998, Jungk, 2001). Pi-Mangel führt

zu einer erhöhten Dichte und zur Elongation der Wurzelhaare (Bates & Lynch, 1996, Ma *et al.*, 2001). Dies trägt zu einer vergrößerten Wurzeloberfläche bei, was die Effizienz der Pi-Aufnahme aus der Bodenmatrix wesentlich steigert. Die Bedeutung der Pi-Aufnahme durch Wurzelhaare wurde auch an zwei Mutanten aus *A. thaliana* (*rhd2* und *rhd6*) gezeigt, die in der Bildung von Wurzelhaaren beeinträchtigt sind. Unter Pi-Mangel zeigen beide Mutanten niedrigere Sprossbiomassen, einen geringeren Pi-Gehalt und eine schlechtere Pi-Aufnahme als die Wildtyppflanzen (Bates & Lynch, 2000).

Ein weiterer Mechanismus zu Erschließung von schwer zugänglichen Nährstoffen sind symbiotische Interaktionen zwischen Pflanzenwurzeln und Mykorrhizapilzen. Die Wurzelsymbiose mit vesikulär-arbuskulären (VA) Mykorrhizapilzen verbessert die Versorgung der Pflanzenwurzel mit Pi (Morgan *et al.*, 2005). Gleichzeitig beliefert die Pflanze deren Symbiosepartner mit Kohlenhydraten. Die Rolle der VA-Mykorrhiza in der Pi-Versorgung der Pflanze wurde an *Medicago truncatula* demonstriert. Hier wurde die Genexpression von zwei hoch-affinen Plasmalemma Pi-Transportern (*MtPT1* und *MtPT2*) mit steigender Mykorrhiza-Kolonisierung reprimiert (Harrison *et al.*, 2002). Dies bedeutet, dass der symbiotische Mykorrhiza-Pilz die Pi-Versorgung der Pflanzen soweit verbesserte, dass die untersuchten Pi-Mangelgene in diesen abgeschaltet wurden. Pi wird über hoch-affine Pi-Transporter des Pilzes aufgenommen, die ausschließlich in der äußeren (extra-radikalen) Hyphe lokalisiert sind (Harrison & van Buuren, 1995, Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001). Pi wird dann zur inneren (intraradikalen) Hyphe transportiert, wo ein Efflux zur periarbuskulären Membran folgt und Pi zur Pflanze übergeht (Harrison *et al.*, 2002).

Manche Pflanzenfamilien, wie zum Beispiel *Proteaceae*, die auf nährstoffarmem und steinigem Boden wachsen, entwickeln charakteristische Wurzelbüschel (Proteoidwurzeln), die zur Wurzelsymbiose mit Mykorrhiza eine alternative Anpassungsreaktion auf Pi-Mangel darstellen (Watt & Evans, 1999, Neumann & Martinoia, 2002). Die physiologische und biochemische Rolle der Proteoidwurzel ist am besten in Weißen Lupinen (*Lupinus albus*, *Fabaceae*) erforscht (Dinkelaker *et al.*, 1995). Eine wichtige Eigenschaft von Proteoidwurzeln ist ihre Fähigkeit, während der Entwicklungsphase große Mengen von organischen Säuren und Phosphohydrolasen auszuschcheiden, die die Pi-Aneignung aus anorganischen und organischen Phosphaten erleichtern (Gilbert *et al.*, 1999, Neumann *et al.*, 1999a, Roelofs *et al.*, 2001).

Es gibt Parallelen in der Wurzelmorphogenese nach Pi-Stress und nach Behandlung mit Auxin, Äthylen und Cytokinin, die vermuten lassen, dass die pflanzlichen Hormone ein wichtiger Bestandteil bei der Vermittlung der Pi-Mangelsignale und dem Auslösen von

wurzelmorphologischen Änderungen unter Pi-Mangel sind. Obwohl diese Phytohormone das Hauptwurzelswachstum und die Bildung von Proteoidwurzeln, Lateralwurzeln und Wurzelhaaren steuern (Lynch & Brown, 1997, Himanen *et al.*, 2002), existiert bislang kein klarer Beweis für deren Rolle in der Regulation der Entwicklung des Wurzelsystems unter Pi-Mangel. Die exogene Applikation von Auxin und Äthylen löst sehr oft Reaktionen aus, die charakteristischen Anpassungen Pi-verarmter Pflanzen entsprechen (Tanimoto *et al.*, 1995, Gilbert *et al.*, 2000). Die verstärkte Wurzelhaarbildung unter Pi-Mangelstress könnte beispielsweise über „Crosstalk“-Mechanismen mit der Äthylen-Synthese reguliert werden (Tanimoto *et al.*, 1995, Lynch & Brown, 2001). Während Auxin die laterale Wurzelentwicklung stimuliert, bewirken Cytokinine den umgekehrten Effekt. Das erhöhte Wurzel/Sproß-Verhältnis bei Pi-Mangel ist mit der Abnahme der Cytokininkonzentration verknüpft (Martin *et al.*, 2000). Außerdem reprimieren die Cytokinine die durch Pi-Mangel ausgelöste Transkription mancher sogenannter *PSR*-Gene (*Phosphate Starvation Responsive*-Gene) wie Phosphatasen, Pi-Transporter und Riboregulatoren (Martin *et al.*, 2000, Karthikeyan *et al.*, 2002). Nach einem Schlüsselfaktor, der die Pi-Homöostase mit dem Hormonstoffwechsel verknüpft, wird derzeit allerdings noch gesucht (Lopez-Bucio *et al.*, 2002, Al-Ghazi *et al.*, 2003, Lopez-Bucio *et al.*, 2003).

## **1.4 Strategien zur Pi-Mobilisierung**

Neben morphologischen Anpassungen finden in Pflanzenwurzeln auch biochemische Anpassungen an Pi-Mangel statt, die zu einer verbesserten Pi-Mobilisierung aus der Umgebung und auch aus dem intrazellulären Pi-Pool beitragen. Sekretierte organische Säuren und bestimmte hydrolytische Enzyme sind wichtige Bestandteile dieser Anpassungsreaktionen.

### **1.4.1 Sekretion organischer Säuren**

Phosphat bildet, wie bereits erwähnt, schwer lösliche Al-, Fe- und Ca-Komplexe, die den Pflanzen unzugänglich sind. Al- und Fe-Phosphate kommen vor allem in saurem, Mg- und Ca-Phosphate vorwiegend in neutralem und alkalischem Boden vor (Hinsinger, 2001). In Anpassung daran zeigen Kalk-liebende Pflanzen gegenüber kalzifugen Pflanzen eine höhere Wurzelsekretion von niedermolekularen organischen Säuren (OA) wie Citrat und Oxalat (Ström, 1997). Diese Säuren können das mineralgebundene Pi und andere Nährstoffe aus dem Boden „extrahieren“ (Abbildung 1-1, Seite 8) (Ryan *et al.*, 2001). Diese Eigenschaft ist vor



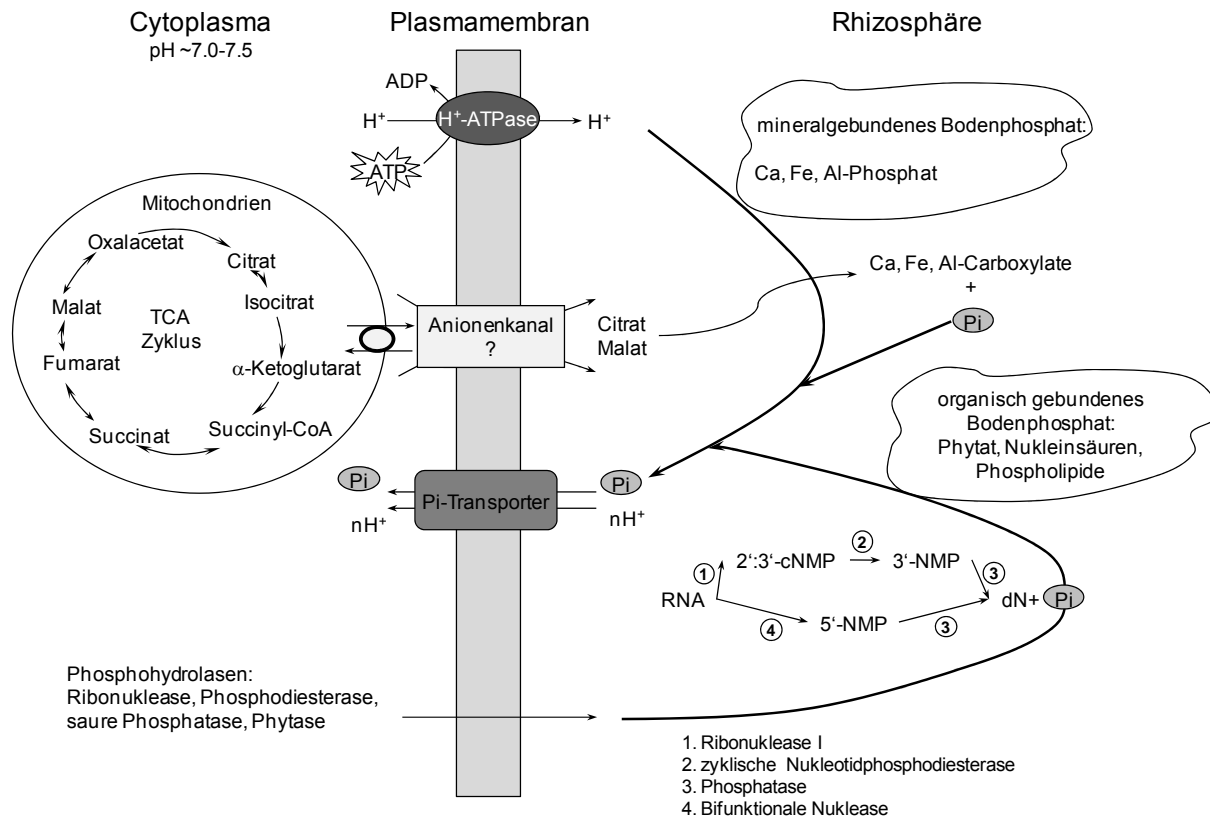
allem bei Pflanzen ausgeprägt, die Proteoidwurzeln entwickeln können (Watt *et al.*, 1999, Neumann *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu besitzen andere Pflanzen wie *Solanum lycopersicum*, *Triticum aestivum* und *Sisymbrium officinale* eine sehr geringe Fähigkeit OA zu sekretieren, obwohl die intrazelluläre OA-Konzentration in den Wurzelgeweben während einer Pi-Stressperiode ansteigt (Hoffland *et al.*, 1992, Neumann & Römheld, 1999b).

OA werden in der Pflanzenzelle über den Citratzyklus in den Mitochondrien oder über den Glyoxylatzyklus in den Glyoxysomen synthetisiert. Die erhöhte OA-Synthese korreliert mit einer erhöhten Genexpression und gesteigerten Aktivitäten von Enzymen wie PEP-Carboxylase, Malatdehydrogenase und Citratsynthase, welche eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel von OA besitzen (Massonneau *et al.*, 2001, Uhde-Stone *et al.*, 2003). PEP-Carboxylase wird auch als „Bypass“-Enzym der Pyruvatkinase der im Cytosol ablaufenden Glykolyse betrachtet (vgl. Kapitel 1.6.2). Pi-Mangel ruft eine erhöhte Aktivität der PEP-Carboxylase in diversen Pflanzenspezies hervor (Plaxton & Carswell, 1999). Die Rolle der PEP-Carboxylase unter Pi-Mangel ist nach Johnson *et al.* (1994, 1996) eher die nicht-photosynthetische CO<sub>2</sub>-Fixierung als ihre anaplerotische Funktion bei der Synthese von Aminosäuren. Die hohe Invertase-Aktivität und die Akkumulation von Hexosephosphaten in der Wurzel von Pi-verarmten Tabakpflanzen, die auf einen erhöhten Kohlenhydratfluss aus den Blättern in die Wurzel zurückzuführen ist, unterstützen diese Ansicht (Paul *et al.*, 1993, Ciereszko *et al.*, 1996).

Überschüssige Mengen an OA werden entweder in der Vakuole gespeichert oder in die Rhizosphäre ausgeschieden (Lopez-Bucio *et al.*, 2000, Martinoia *et al.*, 2000). Aufgrund ihrer niedrigen pK-Werte existieren die OA im Cytoplasma (~pH=7.0) in völlig dissoziierter Form und werden als organische Anionen (OA<sup>-</sup>) über Anionenkanäle extrudiert (Jones, 1998, Neumann *et al.*, 1999b, Hinsinger, 2001, Kollmeier *et al.*, 2001, Pineros & Kochian, 2001). Die Eigenschaften und die beteiligten Moleküle des OA<sup>-</sup>-Exportsystems sind aber noch ungenau bekannt und müssen weiter charakterisiert werden.

Die erhöhte Exsudation von OA<sup>-</sup> bewirkt eine Azidifizierung der Rhizosphäre. Die Akkumulation von OA<sup>-</sup> erhöht die Ausscheidung von Protonen, die durch eine H<sup>+</sup>-ATPase der Plasmamembran getrieben wird. Dadurch wird die Bodenmatrix angesäuert. Der saure pH bewirkt die Auflösung von mineralischen Pi-Komplexen. Aufgrund ihrer hohen Chelatbildenden Eigenschaften können OA<sup>-</sup> mehrwertige Kationen wie Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup> und Ca<sup>2+</sup> binden, und dabei Pi aus den anorganischen Pi-Komplexen verdrängen. Auf diese Weise erhöhen sie das Angebot an löslichem Pi im Boden.

Die quantitative und qualitative Zusammensetzung der sekretierten  $\text{OA}^-$  kann unter den Pflanzenarten stark variieren. In den Wurzelexsudaten finden sich vorwiegend Citrat<sup>3-</sup> und Malat<sup>2-</sup>, welche eine besonders hohe Affinität zu Metallionen aufweisen. Dies ist durch Zahl und Anordnung der vorhandenen Carboxylgruppen bedingt (Jones, 1998, Ryan *et al.*, 2001).



**Abbildung 1-1:** Schematische Darstellung der Mechanismen zur Pi-Mobilisierung aus der Rhizosphäre (modifiziert nach Neumann *et al.* (2002) und Abel *et al.* (2000)). Durch Ausscheidung von H<sup>+</sup>, OA<sup>-</sup> und wurzelsekretorische Phosphohydrolasen (vgl. Kapitel 1.4.2) wird Pi aus anorganischen und organischen Komplexen im Boden freigesetzt.

### 1.4.2 Sekretion hydrolytischer Enzyme

In der Bodenmatrix kommt nicht nur mineralgebundenes, sondern auch organisch fixiertes Pi vor, welches 20-80 % des gesamten Bodenphosphats ausmachen kann. Daher ist die organische Pi-Fraktion eine gute Quelle, um assimilierbares Pi zu erschließen (Schachtman *et al.*, 1998). Ein in vielen Organismen (Hefe, Bakterien, Pflanzen) verbreiteter Mechanismus zur Remobilisierung von organisch gebundenem Pi ist die Synthese intra- und extrazellulärer Enzyme mit hydrolytischen Aktivitäten wie z. B. Nucleasen und saure Phosphatasen (Duff *et al.*, 1994, Ticconi & Abel, 2004). Die Rolle der extrazellulären Phosphohydrolasen ist sehr wahrscheinlich die Pi-Mobilisierung aus der organischen Bodenmatrix (Miller *et al.*, 2001) (Abbildung 1-1, Seite 8).

In vielen Pflanzenspezies steigt die Aktivität extrazellulärer saurer Phosphatasen (APasen) infolge von Pi-Mangel an (Goldstein *et al.*, 1988a, Duff *et al.*, 1991b, Li *et al.*, 1997, Gilbert *et al.*, 1999, Hayes *et al.*, 1999, Miller *et al.*, 2001). In Pi-verarmten *S. lycopersicum* und *L. albus* nimmt beispielweise die Aktivität von extrazellulären APasen um das ~10- bzw. ~20-fache zu (Tadano & Sakai, 1991). Die APasen sind meistens apoplastische oder zellwandgebundene Enzyme, welche, wie es scheint, einen guten Zugang zu externen Pi-Quellen unmittelbar vor dem Wurzelbereich haben (Duff *et al.*, 1991a, Wasaki *et al.*, 1997, Haran *et al.*, 2000). Sie katalysieren die Hydrolyse von Orthophosphatmonoestern und haben meistens ein pH-Optimum zwischen 5 und 6 (Duff *et al.*, 1991a). Extrazelluläre APasen haben eine breite Substratspezifität und können ihre Aktivität über einen weiten pH- (4.0-9.0) und Temperaturbereich (22-48 °C) entfalten (Li & Tadano, 1996).

Die Funktion sekretorischer APasen in der Pi-Mobilisierung aus dem externen, organisch gebundenen Pi wurde in transgenen Pflanzen aus *A. thaliana* erstmals schlüssig bewiesen. Nach einer Fusion des Signalpeptides einer „Purple Acid Phosphatase“ (PAP) aus *Arabidopsis* (*AtPAP12*) mit GFP wurde bei Wachstum auf Pi-freiem Medium die GFP-Akkumulation nicht nur in lateralem Wurzelgewebe, sondern auch im Wurzelexsudat nachgewiesen (Haran *et al.*, 2000). Ferner wurde eine Korrelation zwischen dem exogenen Pi-Verbrauch und der Aktivitätssteigerung von zwei sekretorischen PAPs, SAP1 und SAP2, in Zellkulturen und Keimlingen aus *S. lycopersicum* nachgewiesen (Bozzo *et al.*, 2002, 2006). Die Bedeutung der Sekretion von APasen bei der Pi-Remobilisierung wurde weiterhin durch *pup*-Mutanten (*phosphatase under-producer*) bestätigt. Diese Mutanten akkumulierten bei Wachstum auf Medium mit organischem Pi als alleinige Pi-Quelle deutlich geringere Pi-Mengen als die Wildtyppflanzen (Tomscha *et al.*, 2004).

Neben den APase-Aktivitäten wurden im Medium von Tomatenzellkulturen die extrazelluläre Ribonuklease RNaseLE und eine 2':3'-zyklische Nukleotidphosphodiesterase nachgewiesen (Nürnberg *et al.*, 1990, Abel *et al.*, 2000). Die extrazelluläre RNaseLE depolymerisiert RNA zu 2':3'-cNMPs, welche durch die akzessorische Wirkung der Phosphodiesterase vorwiegend zu 3'-dNMPs hydrolysiert werden. Durch APasen wird Pi aus den 3'-dNMPs regeneriert. Der wichtige Beitrag sekretorischer Nukleasen und Phosphatasen an der Pi-Aneignung aus Nukleinsäuren wurde dadurch bestätigt, dass *A. thaliana* Keimlinge auf DNA-haltigem aber Pi-freiem Medium wachsen können (Chen *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu können *psr1*-Mutanten (*phosphate starvation response1*) unter diesen Bedingungen nicht wachsen, da sekretorische Phosphohydrolasen in diesen Mutanten nicht induziert werden können (Chen *et al.*, 2000).

Diese Beispiele zeigen, dass die Zusammenwirkung verschiedener sekretorischer Phosphohydrolasen ein weiterer integraler Bestandteil der pflanzlichen Mechanismen zur Bewältigung von Pi-Mangel ist. In welchem Umfang sekretorische Enzyme für die Pflanze zur Pi-Aneignung beitragen, insbesondere wenn sie in einer direkten Konkurrenz mit mikrobiellen Phosphohydrolasen stehen, muss allerdings weiter untersucht werden.

### 1.4.3 Intrazelluläre Pi-Remobilisierung

Die Remobilisierung von Pi aus zelleigenen Pi-Quellen ist eine weitere Strategie zur Aufrechthaltung der Pi-Homöostase. Die Überlebenschance der Pflanze unter starken Pi-Mangelbedingungen kann zum Beispiel durch den Abbau von RNA-Molekülen erhöht werden. In Zellkulturen von *S. lycopersicum* wurden neben der extrazellulären RNaseLE (Nürnberger *et al.*, 1990) auch vier weitere intrazelluläre Ribonukleasen isoliert, die eine vakuoläre (RNasen LV1-3, Köck *et al.*, 1995) und eine intrazelluläre aber extravakuoläre Lokalisation aufweisen (RNaseLX, Lehmann *et al.*, 2001). Die Transkripte der *RNasen LE* und *LX* werden spezifisch bei Pi-Mangel akkumuliert (Köck *et al.*, 2006). Eine erhebliche Induktion von *RNasen* aufgrund Pi-Mangel wurde auch in anderen Pflanzenarten nachgewiesen (Bariola *et al.*, 1994, Dodds *et al.*, 1996).

Eine weitere Hauptquelle des endogenen Recyclings von Pi ist die Phospholipidfraktion der Zelle. Während eines Pi-Mangels werden Phospholipide abgebaut und durch Sulfolipide und Pi-freie Galaktolipide wie Digalaktosyldiacylglycerol und Monogalaktosyldiacylglycerol ersetzt (Härtel *et al.*, 2000, Jouhet *et al.*, 2004). Dabei steigt vorübergehend der Gehalt an Phosphatidylcholin (Jouhet *et al.*, 2003), welches schnell durch Phospholipasen hydrolysiert wird (Nakamura *et al.*, 2005, Cruz-Ramirez *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2006).

Durch die Induktion intrazellulärer Phosphatasen wird der Endabbau von Phospholipiden und RNA unterstützt, indem sie, ähnlich wie bei der extrazellulären APasen, Pi aus organischen Verbindungen freisetzen (Baldwin *et al.*, 2001, Stenzel *et al.*, 2003). Weiterhin werden durch Phosphatasen Pi-verbrauchende Reaktionsschritte in der cytosolischen Glykolyse überbrückt (vgl. Kapitel 1.6.2).

Die koordinierte Aktivierung von Phosphatasen, Ribonukleasen und Phosphodiesterasen ermöglichen der Pflanze eine effektive extra- und intrazelluläre Pi-Mobilisierung. Dies ist Teil eines Rettungssystems aus *PSR*-Genen, zu dem auch hoch-affine Pi-Transporter gehören (Goldstein *et al.*, 1988a).

## 1.5 Pi-Aufnahme aus der Umgebung

### 1.5.1 Pi-Transportsysteme

Pflanzen erhöhen ihre Transportkapazität bei Pi-Mangelstress, um die Aufnahme von Pi zu verbessern (Bucher, 2007). Kinetische Studien lassen in Pflanzenzellen multiple Transportsysteme erkennen, die sich in ihrer Affinität ( $K_m$ , Michaelis-Menten-Konstante) und Absorptionsfähigkeit ( $V_{max}$ , maximale Transportgeschwindigkeit) gegenüber Pi unterscheiden. Die Pi-Transportsysteme werden in der Literatur meistens anhand ihrer Pi-Influxisothermen entweder als hoch-affine oder als niedrig-affine Systeme klassifiziert, obwohl für manche Pflanzen wie *Zea mays* bis zu sieben verschiedene Influxisothermen gemessen wurden (Nandi *et al.*, 1987). Unter Pi-Mangel wurden Transportsysteme mit sehr niedrigem  $K_m$ -Wert und erhöhter Aufnahmekapazität gemessen. Diese folgen einer Michaelis-Menten-Kinetik und werden als hoch-affine Aufnahmesysteme bezeichnet. Der  $K_m$ -Wert solcher Transportsysteme liegt zwischen 3 und 7  $\mu\text{M}$  (Mimura, 1999). Bei hohen Pi-Konzentrationen agieren niedrig-affine Transportsysteme, deren  $K_m$ -Werte je nach Pflanzenart oder Gewebe zwischen 50 und 330  $\mu\text{M}$  liegen können (Schachtman *et al.*, 1998). In Bezug auf die externe Pi-Versorgung können beide Transportsysteme gleichzeitig oder unabhängig voneinander funktionieren. In *Lemna gibba* wurden beispielsweise Transportsysteme mit zwei unterschiedlichen Affinitätskonstanten ( $K_{m1}=6-8 \mu\text{M}$  und  $K_{m2}=65-75 \mu\text{M}$ ) detektiert, die ihre  $V_{max}$ -Werte unter Pi-Mangel gleichzeitig erhöhen (Ullrich-Eberius *et al.*, 1984). In *Catharanthus roseus* wird bei Pi-Stress zusätzlich zu dem niedrig-affinen ( $K_m=48.8 \mu\text{M}$ ) auch ein hoch-affines Transportsystem ( $K_m=2.2 \mu\text{M}$ ) induziert (Furihata *et al.*, 1992). In Protoplasten aus *Nicotiana glutinosa* und *Hordeum vulgare* dagegen besteht die Influxisotherme aus einer sättigbaren ( $K_m=5.8 \mu\text{M}$ ) und einer linearen Komponente (Mettler & Leonard, 1979, Mimura *et al.*, 1990). In *Nicotiana tabacum* wurde sowohl bei ausreichender als auch bei limitierender Pi-Versorgung über die Existenz von nur einem hoch-affinen Aufnahmesystem ( $K_m=2.5 \mu\text{M}$ ) berichtet, welches bei variierender Pi-Versorgung nur seine Aufnahmekapazität, d. h.  $V_{max}$ , ändert (Shimogawara & Usuda, 1995). Die Änderungen in den kinetischen Parametern,  $K_m$  und  $V_{max}$ , können aufgrund einer *de novo* Synthese oder einer post-transkriptionellen Regulation der beteiligten molekularen Spezies erfolgen. Die Aufklärung der Regulation der verschiedenen Pi-Transportmechanismen verlangt deren molekulare und biochemische Charakterisierung (Rausch & Bucher, 2002).

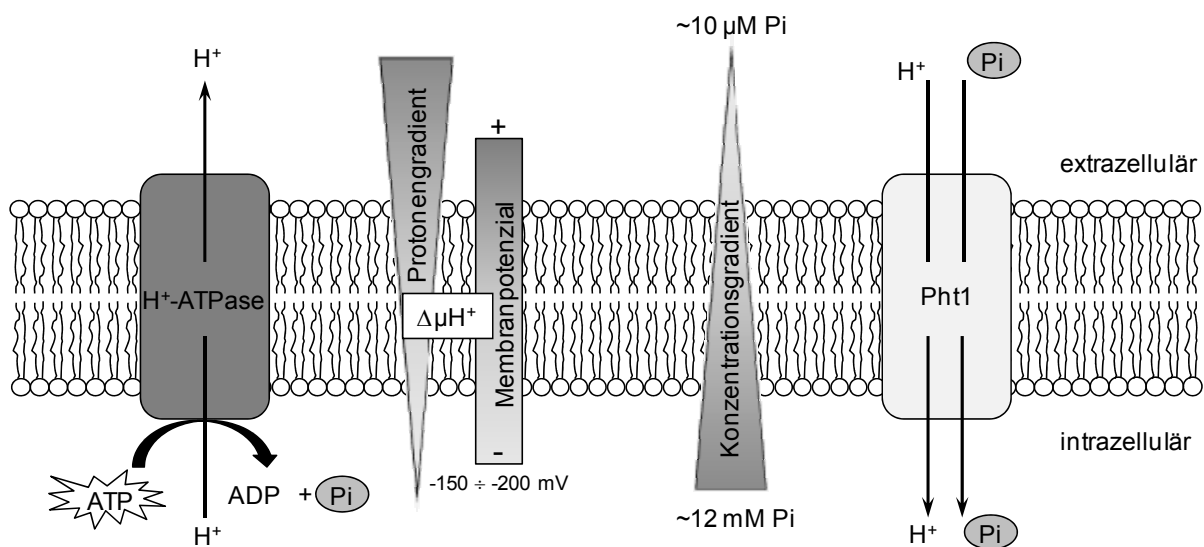
### 1.5.2 Arten des Stofftransportes

Der Stoffaustausch über eine Membran kann über einen passiven Transport (einfache Diffusion), erleichterte Diffusion oder über einen aktiven Transport stattfinden. Mit Ausnahme der einfachen Diffusion werden die beiden anderen Transportmechanismen über Transmembranproteine vermittelt. Bei der passiven Diffusion findet die Stoffbewegung vom Bereich hoher Konzentration zum Bereich niedriger Konzentration ohne eine zusätzliche Energiezufuhr statt. Der Stofftransport wird bei der erleichterten Diffusion durch Porenbildende Kanalproteine vermittelt, welche die Membran tunnelartig durchspannen. Nach Öffnung des Kanals findet der Transport ebenfalls entlang des bestehenden Konzentrations- bzw. Potenzialgradienten so lange statt, bis entweder ein Konzentrationsausgleich erreicht wird, oder sich das Kanalprotein wieder schließt. Der Stoffaustausch kann nur beim aktiven Transport unter Verbrauch von Energie, z. B. in Form von ATP, gegen ein Konzentrations- oder Potenzialgefälle stattfinden. Transportprozesse, bei denen mehrere Stoffe gleichzeitig die Membran passieren (Symport oder Antiport) gehören als sekundär-aktive Prozesse ebenfalls zur Kategorie der aktiven Transportprozesse.

Bei schlechter Pi-Versorgung ist die Pi-Aufnahme durch das Plasmalemma ein aktiver Transportprozess (Abbildung 1-2, Seite 13). Zum einen muss Pi aufgrund des enormen Unterschiedes zwischen der cytoplasmatischen (~5-12 mM, Bielecki, 1973) und externen Pi-Konzentration (~10 µM, Marschner, 1995) gegen ein steiles Konzentrationsgefälle aufgenommen werden. Zum anderen muss Pi gegen ein Potenzialgefälle transportiert werden (im Cytoplasma: -150 bis -200 mV, Mimura, 1999). Die Pi-Aufnahme verläuft zwischen pH 4.5 und 6.0 mit der höchsten Geschwindigkeit (Ullrich-Eberius *et al.*, 1981). In diesem pH-Bereich befindet sich die Phosphorsäure vorwiegend in ihrer monovalenten Form ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{pK}=2.1$ ). Demzufolge muss  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  das negative Membranpotenzial der Pflanzenzelle überwinden.

Es wird allgemein akzeptiert, dass die Aufnahme von Pi über einen  $\text{H}^+$ -Symport abläuft und dass dieser Symport auf die Funktion einer Plasmalemma- $\text{H}^+$ -ATPase angewiesen ist (Mimura, 1999, Rausch *et al.*, 2002). Tatsächlich wird der Pi-Transport von einer Abnahme des extrazellulären pH-Wertes begleitet (Sakano, 1990), während das Cytoplasma angesäuert wird (Ullrich & Novacky, 1990, Mimura *et al.*, 1992, Sakano *et al.*, 1992). Außerdem ist die Pi-Aufnahme mit einer Depolarisation der Zellmembran verbunden. Wenn nur Pi in die Zellen transportiert würde, wäre eine Hyperpolarisation zu erwarten (Ullrich-Eberius *et al.*, 1981, Ullrich-Eberius *et al.*, 1984). Ferner wurde gezeigt, dass Entkoppler des elektrochemischen  $\text{H}^+$ -Gradienten, wie FCCP, CCCP und DNP, die Pi-Aufnahme hemmen

(Mitsukawa *et al.*, 1997, Daram *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Studien wurde der Schluss gezogen, dass der in Pflanzen vorherrschende Pi-Transport ein sekundär-aktiver  $H^+$ -Symport ist. In manchen Organismen kann der Pi-Transport auch über einen  $Na^+$ -Symport ablaufen.  $Na^+$ -abhängige Transportprozesse existieren vor allem in tierischen Systemen, wurden aber ebenfalls in Bakterien (Lolkema *et al.*, 1994) und Pilzen (Martinez & Persson, 1998) beschrieben. Ein Nachweis für  $Na^+$ /Pi-Symport wurde in den grünen Algen *Chara corallina* und kürzlich in vaskulären Pflanzen erbracht (Reid *et al.*, 2000, Rausch *et al.*, 2002, Ruiz-Pavon *et al.*, 2007).



**Abbildung 1-2:** Mechanismus des Pi-Transportes durch die Plasmamembran (modifiziert nach Bucher, 2007). Eine  $H^+$ -ATPase scheidet  $H^+$  unter Verbrauch von ATP (primär-aktiver Transport) aus. Dies führt zur Ausbildung eines Membranpotenzials. Die Pi-Aufnahme findet über einen  $H^+$ /Pi-Symport statt, der durch den elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\mu H^+$ ) getrieben wird (sekundär-aktiver Transport).

### 1.5.3 Struktur und Funktion von Pi-Transportern

Pi-Transporterproteine werden in drei Gruppen eingeteilt: Pht1, Pht2 und Pht3 (Karandashov & Bucher, 2005). Diese schließen hoch-affine und niedrig-affine Pi-Transporter der Plasmamembran (Pht1) sowie Phosphattranslokatoren in zellulären Organellen (Pht3, Pht2) ein.

Die pflanzlichen Pht1-Transporter sind der Familie der Phosphat- $H^+$ -Symporter (PHS) innerhalb der „Major Facilitator Super“ Familie (MFS) zugeordnet (Pao *et al.*, 1998). Sie haben eine recht einheitliche Größe von  $\sim 518$ - $587$  Aminosäuren (Raghothama & Karthikeyan, 2005). Alle Pht1-Transporter enthalten 12 Transmembrandomänen (TMD) und intrazellulär lokalisierte N- und C-Termini (Smith, 2001). Zwischen TMD6 und TMD7 besitzen die Proteine eine hydrophile, intrazelluläre Schleife, welche die charakteristische „6+6“ Struktur der Transporter der MFS-Familie ergibt. Die Funktionsanalyse der heterolog

in Hefe exprimierten Pht1-Transporter zeigte, dass zu der Pht1-Familie sowohl hoch-affine als auch niedrig-affine Pi-Transporter gehören (Rausch *et al.*, 2002, Rae *et al.*, 2003, Nagy *et al.*, 2005).

Die ersten Gene, die Pht1-Proteine in vaskulären Pflanzen codieren, wurden auf der Basis einer EST Clone Datenbank zuerst aus *A. thaliana*, danach aus *Solanum tuberosum* und *S. lycopersicum*, isoliert (*AtPT1* und *AtPT2*, Muchhal *et al.*, 1996, *StPT1* und *StPT2*, Leggewie *et al.*, 1997, *LePT1* und *LePT2*, Liu *et al.*, 1998)\*. Diese Gene weisen eine hohe Homologie zu dem hoch-affinen Pi-Transporter *Pho84* aus *Saccharomyces cerevisiae* auf. Mittlerweile sind in verschiedenen Pflanzen jeweils zahlreiche Mitglieder der *Pht1*-Familie entdeckt worden (Bucher, 2007, Chen *et al.*, 2007). Übereinstimmend mit ihrer Rolle bei der Phosphataufnahme werden *Pht1*-Gene vorwiegend in rhizodermalen Wurzelzellen, in Wurzelhaarzellen und in der Wurzelhaube exprimiert (Daram *et al.*, 1998, Karthikeyan *et al.*, 2002, Schünmann *et al.*, 2004a). Darüber hinaus werden *Pht1*-Gene auch in Blättern und Blütenorganen, also in schnell wachsenden Pflanzenteilen, transkribiert, was auf eine Rolle bei der internen Pi-Remobilisierung hindeutet. Das räumliche und zeitliche Muster der Genexpression und der Akkumulation der entsprechenden Proteine gegenüber Pi-Mangel weist auf eine transkriptionelle Regulation der Pi-Transportersynthese hin (Rubio *et al.*, 2001, Schünmann *et al.*, 2004b). Darüber hinaus sind aber auch hoch konservierte Aminosäuresequenzen in Pht1-Transportern bekannt, die auf eine zusätzliche post-transkriptionelle Regulation der Transporter hindeuten (Raghothama *et al.*, 2005). Die Funktion und der Beitrag der Pht1-Proteine bei der direkten Pi-Aufnahme wurden an einer doppelt knock-out Mutante *pht1;1Δ4Δ* in *A. thaliana* aufgeklärt, die aufgrund einer stark verringerten Pi-Aufnahme eine drastische Wachstumshemmung zeigt (Shin *et al.*, 2004).

Der am besten untersuchte Pht2-Phosphattranslokator ist *ARAth;Pht2;1* aus *A. thaliana* (Daram *et al.*, 1999). Lokalisationsstudien zeigen die Anwesenheit des Proteins in den Hüllmembranen der Chloroplasten (Versaw & Harrison, 2002). Aufgrund seines hohen  $K_m$ -Wertes wurde das Protein als niedrig-affiner Transporter eingestuft. Pi-Mangel erhöht die Transkription des Gens im Spross, aber nicht in Wurzeln. Dies ließ eine Rolle in der Pi-Allokation vom Leitgewebe in die Blätter vermuten, was durch knock-out Mutanten bestätigt wurde (Versaw *et al.*, 2002).

---

\* *Solanum lycopersicum* (Tomate) wurde früher als *Lycopersicum esculentum* bezeichnet. Die alte Bezeichnung „*Le*“ wurde in den isolierten Genen beibehalten.



Die dritte Gruppe der Pi-Transporter (Pht3) beinhaltet mitochondriale Translokatoren (Takabatake *et al.*, 1999, Nakamori *et al.*, 2002, Rausch *et al.*, 2002). Die mitochondrialen Pi-Translokatoren befinden sich in der inneren Membran der Mitochondrien und katalysieren vermutlich einen Pi/H<sup>+</sup>-Symport, einen Pi/OH<sup>-</sup>-Antiport oder einen Pi-Austausch zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Cytoplasma (Laloi, 1999).

## **1.6 Stoffwechseleränderungen unter Pi-Mangel**

Pi ist ein direkter Reaktionspartner in zahlreichen biochemischen Reaktionen und ein entscheidender Bestandteil von NTPs. Aus diesem Grund können manche Stoffwechselwege bei Pi-Mangel nicht oder nur noch eingeschränkt ablaufen (Fernie *et al.*, 2004, Plaxton & Podesta, 2006). Um sich an diese Situation anzupassen bzw. Pi „einzusparen“, können Pflanzen Teile ihres Stoffwechsels modifizieren oder umstellen.

### **1.6.1 PPI-verbrauchende Reaktionen**

Im pflanzlichen Cytosol können Phosphatgruppen von Adenosin-Phosphaten, Uridin-Phosphaten und Pyrophosphat (PPi) übertragen werden (Plaxton, 1996). Herabgesetzte ATP- und ADP-Mengen sind eine allgemeine Folge einer Pi-Unterversorgung und anderer Stressfaktoren wie z. B. Anoxie (Ashihara *et al.*, 1988, Duff *et al.*, 1989b, Fredeen *et al.*, 1990, Theodorou *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu bleibt der PPI-Pool weitgehend unempfindlich gegenüber Stressfluktuationen und ist nicht an Adenosinphosphat- bzw. Uridinphosphat-Pools gekoppelt (Dancer *et al.*, 1990, Rychter & Randall, 1994). Vor allem bei Pi-Mangel ist PPI darum eine wichtige Alternative zu ATP. PPI entsteht als ein Nebenprodukt der Synthese von Makromolekülen, Saccharose und Stärke. In Plastiden wird das gebildete PPI durch die hydrolytische Aktivität von Pyrophosphatasen schnell abgebaut und somit dem Gleichgewicht der synthetischen Reaktion entzogen. Im Gegensatz dazu ist die PPI-Konzentration im Cytoplasma höherer Pflanzen relativ hoch, weil dem pflanzlichen Cytoplasma die Pyrophosphatase-Aktivität fehlt (Weiner *et al.*, 1987).

Durch Stoffwechselmodelle und computergestützte Simulationen wurde veranschaulicht, dass die bei der Hydrolyse von PPI freiwerdende Energie unter ATP-limitierten Wachstumsbedingungen ein wesentlicher bioenergetischer Vorteil für die Zelle darstellen kann (Davies *et al.*, 1993). Dass Pflanzen die Anhydridbindung im PPI als Energiequelle verwerten könnten, wurde bereits mit der Isolierung von cytosolischer PPI-abhängiger Phosphofruktokinase (PFP) aus *Ananas comosus* gezeigt (Carnal & Black, 1979). PFP kann

unter Verbrauch von PPi Fruktose-1-Phosphat zu Fruktose-1,6-bisphosphat umsetzen (Abbildung 1-3, Seite 18). Dieser Reaktionsschritt hat eine regulatorische Funktion für den glykolytischen Stofffluss und läuft bei der „klassischen“ Glykolyse durch die ATP-abhängige Phosphofruktokinase (PFK). Die PFP-Reaktion liegt im Cytosol nahe dem Gleichgewicht und kann daher auch die Reaktion der Fruktose-1,6-bisphosphatase ersetzen (Weiner *et al.*, 1987). PFP wurde in verschiedenen Pflanzenarten und Geweben nachgewiesen (Stitt, 1990). Es wurde gezeigt, dass die PFP-Aktivität in Pflanzenspezies, die keine Symbiose mit Mykorrhiza ausbilden können, unter Pi-Mangelstress beträchtlich zunimmt (Duff *et al.*, 1989b, Theodorou *et al.*, 1992, Theodorou & Plaxton, 1994, Murley *et al.*, 1998). Weitere Untersuchungen der Induktion der PFP-Enzymaktivität unter Pi-Mangel, der allosterischen Regulation der PFP durch Fruktose-2,6-bisphosphat (Stitt, 1990) und der Hemmung der PFP-Reaktion durch Pi (Stitt, 1989) weisen darauf hin, dass PFP die PFK-Reaktion insbesondere bei Pi-Mangel überbrücken kann (Theodorou & Plaxton, 1993, Theodorou *et al.*, 1995).

Abgesehen von der glykolytischen PFP-Bypassreaktion liefert PPi in zwei weiteren cytosolischen Prozessen Energie: bei der Verwertung von Saccharose und beim Protonentransport in die Vakuolen (Abbildung 1-3). Die Spaltung von Saccharose zu Hexosephosphaten kann über zwei Wege ablaufen (Plaxton *et al.*, 1999). Zum einen kann die Saccharose durch das Enzym Invertase zu Glukose und Fruktose gespalten werden, die ihrerseits über Hexokinase bzw. Fruktokinase unter dem Verbrauch von ATP zu Hexosephosphat umgesetzt werden. Alternativ kann die Saccharose über die Saccharose-Synthase und die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase in Fruktose und Glukose-1-Phosphat gespalten werden. Dabei wird PPi verbraucht und UTP gebildet. Die Reaktion kann im Cytosol reversibel ablaufen, weil der PPi-Pool dort stabil ist.

Zum Aufbauen des elektrochemischen H<sup>+</sup>-Gradienten besitzen Vakuolenmembranen eine ATP-abhängige Phosphatase (V-ATPase) und außerdem eine PPi-abhängige Phosphatase (V-PPiase). Die V-ATPase transportiert zwei H<sup>+</sup> pro ATP. Die V-PPiase transportiert nur ein H<sup>+</sup> pro PPi in die Vakuolen. Obwohl die V-PPiase im Vergleich zu der V-ATPase ineffizienter funktioniert, kann PPi Energie für den aktiven Transport von Protonen in die Vakuole liefern und damit den elektrochemischen Protonengradienten zwischen Cytosol und Vakuole bei Nährstoffmangel und Anoxie erhalten (Carystinos *et al.*, 1995, Kasai *et al.*, 1998, Palma *et al.*, 2000).

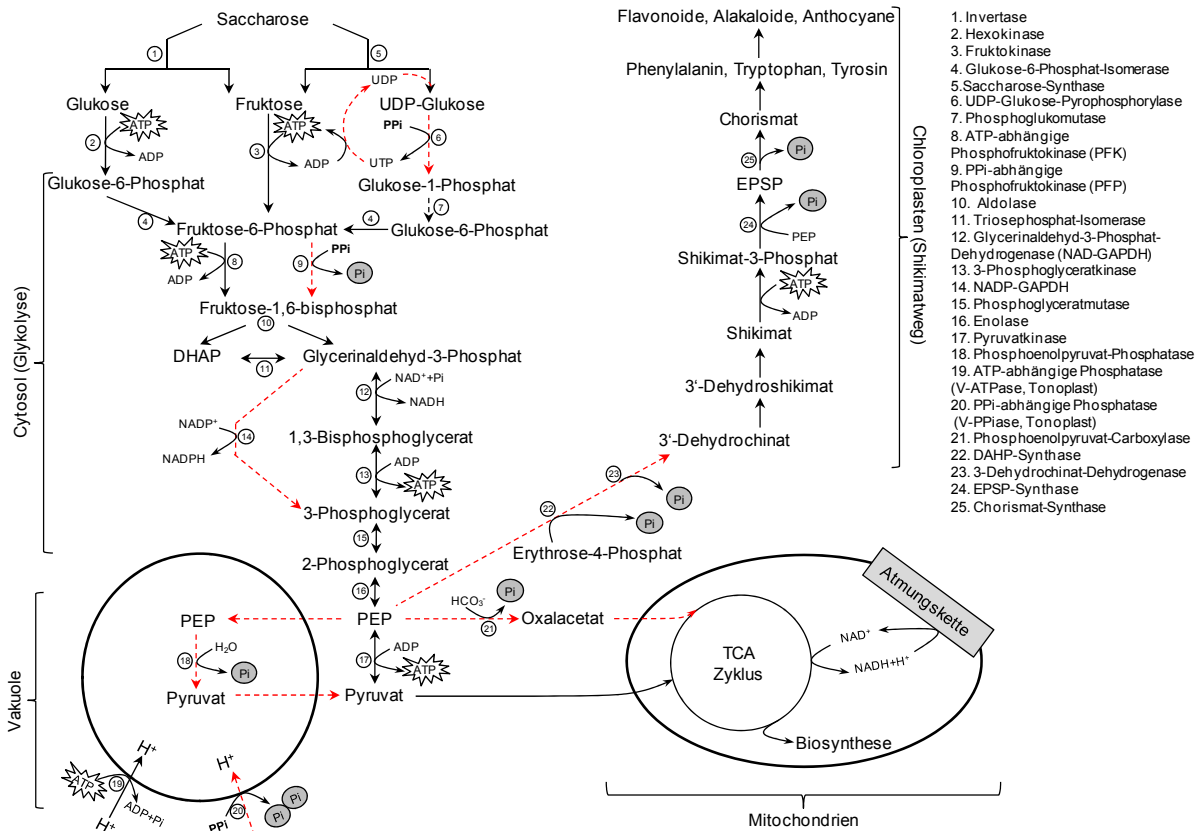
## 1.6.2 Glykolytische Bypass-Reaktionen

Die grundlegende Funktion der Glykolyse besteht im Katabolismus von Zuckern sowie in der Synthese von C3-Verbindungen (z. B. Pyruvat und Glycerin), welche für anabole Reaktionen und die Respiration notwendig sind. Außerdem entsteht bei der Glykolyse ATP. Da einige Enzyme in der Reaktionssequenz der Glykolyse ATP- und Pi-abhängig sind, können Fluktuationen in der cytosolischen Pi-Konzentration den Ablauf des zentralen Kohlenstoffwechsels beträchtlich stören. Ein schwerer Pi-Mangel könnte so unter Umständen den Stofffluss durch die Glykolyse und die Zufuhr von Substraten zum TCA-Zyklus unterbrechen. Gleichzeitig ist aber bekannt, dass auch unter Pi-Mangelbedingungen erhebliche Mengen von organischen Säuren aus TCA-Intermediaten von Wurzeln sekretiert werden, die aus glykolytischem Kohlenstoff stammen. Dies ist möglich, weil es in der im Cytosol ablaufenden pflanzlichen Glykolyse alternative Bypass-Reaktionen gibt, die nicht von ATP und Pi abhängig sind (Plaxton, 1996). Diese alternativen Reaktionen sind in Abbildung 1-3, Seite 18 dargestellt.

Die schon besprochene Phosphorylierung des Fruktose-6-Phosphats über die PFP ist eine der drei Bypass-Reaktionen der cytosolischen Glykolyse. Eine weitere Bypass-Reaktion findet bei der Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu 3-Phosphoglycerat (3-PG) statt. Bei der „klassischen“ Reaktion bewirken die NAD-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (NAD-GAPDH) und die Phosphoglycerat-Kinase (PGK) die Umsetzung von GAP zu 3-PG unter der Bildung von NADH und ATP. Neben dieser Reaktion kann die Oxidation von GAP ebenfalls durch die nicht phosphorylierende NADP-GAPDH ablaufen. Unter Pi-Mangel wurde für NADP-GAPDH eine stark erhöhte Aktivität nachgewiesen (Duff *et al.*, 1989b). In diesem Fall könnte NADP-GAPDH den Pi-abhängigen NAD-GAPDH/PGK-Reaktionsschritt überbrücken und dadurch den glykolytischen Stofffluss steigern.

Pi-Stress kann außerdem eine hemmende Wirkung auf die Aktivität der ADP-abhängigen Pyruvat-Kinase (PK), die PEP zu Pyruvat umsetzt, ausüben. Pyruvat verbindet die Glykolyse mit dem TCA-Zyklus. Darum kann eine niedrige Pyruvat-Produktion aufgrund von Pi-Mangel die Zellatmung drosseln. Die Zusammenwirkung der anaplerotischen Enzyme PEP-Carboxylase, Malatdehydrogenase und NAD-Malat-Enzym kann die PK-Reaktion umgehen und so den TCA-Zyklus mit glykolytischem Kohlenstoff versorgen (Theodorou *et al.*, 1993, Nagano *et al.*, 1994, Riviere-Rolland *et al.*, 1996, Kondracka & Rychter, 1997, Moraes & Plaxton, 2000). Hinweise auf einen zweiten alternativen Weg zum Katabolismus von PEP ergab die Isolierung einer intrazellulären Phosphatase aus *B. nigra*, die eine sehr hohe

Spezifität zu PEP (PEP-Phosphatase) aufweist (Duff *et al.*, 1989a). Das Enzym wird unter Pi-Mangel synthetisiert (Duff *et al.*, 1991b). Übereinstimmend mit ihrem sauren pH-Optimum weist die PEP-Phosphatase eine vakuoläre Lokalisation auf (Duff *et al.*, 1991a). Der Nutzen dieses postulierten Bypass-Wegs ist allerdings nicht völlig klar, da die vakuoläre Lokalisation des Enzyms den Transport von PEP in die Vakuole und Transport von Pyruvat aus der Vakuole verlangt. Das ist vor allem unter Pi- bzw. ATP-Mangel ein energetisch ungünstiger Prozess.



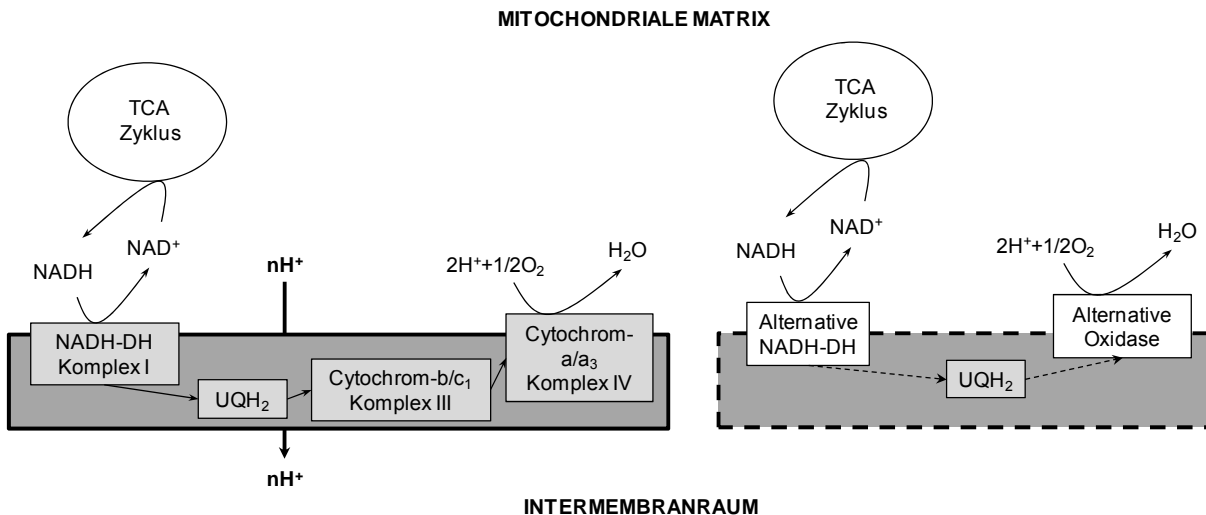
**Abbildung 1-3:** Schematische Zusammenfassung von Stoffwechselprozessen, die unter Pi-Mangel modifiziert werden (in der Abbildung gestrichelt - - -). Die Abbildung ist nach Plaxton *et al.* (1999) verändert. Die Bypass-Reaktionen der im Cytosol ablaufenden Glykolyse sind nicht ATP- und Pi-abhängig und erleichtern somit den glykolytischen Stofffluss unter Pi-Mangel. Die  $H^+$ -PPIase kann die Energie der Anhydridverbindung von PPI verwerten, um Protonen durch den Tonoplast in die Vakuole zu transportieren. Die Synthese von Sekundärstoffen (Anthocyane, Flavonoide) über den Shikimatweg liefert in vielen Reaktionsschritten Pi (vgl. Kapitel 1.6.4). PPI: Pyrophosphat; PEP: Phosphoenolpyruvat; DHAP: Dihydroxyacetonphosphat; EPSP: Enolether-5'-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat; TCA-Zyklus: Trikarbonsäurezyklus; DAHP-Synthase: 3-Deoxy-D-Arabinoseheptulosonat-7-Phosphat; Pi-Phosphat.

### 1.6.3 Mitochondriale Respiration

Die Bildung von ATP in den Mitochondrien erfolgt durch die ATP-Synthase, die von einem Protonengradienten getrieben wird, welcher wiederum durch den Elektronentransport der mitochondrialen Atemungskette erzeugt wird. Der Export von ATP ins Cytosol erfolgt im

Austausch gegen ADP und Pi. Bei limitierenden cytosolischen ADP- und Pi-Konzentrationen kann das ATP/ADP-Verhältnis nicht aufrechterhalten werden. Ein Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses kann dann den Elektronentransport über den Cytochrom-Weg hemmen (Bryce *et al.*, 1990). Es wurde vorgeschlagen, dass die pflanzlichen Mitochondrien alternative Mechanismen zur Oxidation von NADH benutzen können, die nicht mit dem Protonentransport verbunden sind, um eine übersteuerte Hemmung der Atmungskette unter Pi-Mangel zu vermeiden (Abbildung 1-4, Seite 20) (Plaxton *et al.*, 2006). Alternativ zu dem Rotenon-empfindlichen NADH-Dehydrogenase-Komplex besitzt die innere Mitochondrienmembran eine Rotenon-unempfindliche alternative NADH-Dehydrogenase (Rasmusson & Moller, 1991). Bei einem erhöhten NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis in der mitochondrialen Matrix kann die Oxidation von NADH über diesen Weg stattfinden. Zusätzlich besitzen die Pflanzenzellen eine KCN-resistente Alternative Oxidase (AOX), die parallel zum Cytochrom-Weg Elektronen direkt auf Sauerstoff übertragen kann (Day & Wiskich, 1995). Das Enzym wird allosterisch durch  $\alpha$ -Ketosäuren, besonders Pyruvat, stimuliert, was mit der erhöhten Aktivität der PEP-Carboxylase unter Pi-Mangel in Verbindung stehen könnte (Millar *et al.*, 1993, Hoefnagel *et al.*, 1995). Infolge einer Pi-Unterversorgung wurden erhöhte AOX-Aktivitäten in Wurzeln aus *Phaseolus vulgaris* nachgewiesen, während die Aktivität des Cytochrom-Respirationsweges sank und das NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis anstieg (Rychter & Mikulska, 1990, Rychter *et al.*, 1992). Eine mögliche Verknüpfung zwischen der AOX-Aktivität und Pi-Mangel wurde weiterhin aus Experimenten mit *C. roseus* (Hoefnagel *et al.*, 1993) und *N. tabacum* (Parsons *et al.*, 1999) abgeleitet. Unter Pi-Mangel zeigten beide Spezies einen Anstieg der respiratorischen Kapazität über den Cyanid-unempfindlichen Stoffwechselweg. Das Wachstum von AOX-Antisense-Tabakpflanzen wurde in Pi-freien Bedingungen inhibiert. Zusätzlich wurde eine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies gemessen, was auf eine Überlastung des Cytochrom-Weges bei Pi-Mangel hindeutet.

Zusammenfassend ermöglichen die alternative NADH-Dehydrogenase und die alternative AOX die Oxidation von NADH durch die Mitochondrien auch ohne ATP-Synthese. Damit wird der zentrale Kohlenstoffwechsel bei begrenztem ATP-, ADP- und Pi-Angebot von der ATP-Synthese entkoppelt. Obwohl es viele Indizien für den Zusammenhang zwischen Pi-Mangel und den alternativen Stoffwechselwegen der mitochondrialen Respiration gibt, scheint es, dass eine verringerte Respiration nicht bei allen Pflanzenarten eine strikte Reaktion auf Pi-Mangel ist (Theodorou *et al.*, 1993, 1995).



**Abbildung 1-4:** Schematische Darstellung der Komplexe der Atmungskette in der mitochondrialen Innenmembran. Beim Cytochrom-Weg wird durch den Elektronentransport ein Protonengradient erzeugt. Pflanzliche Mitochondrien besitzen zusätzlich eine alternative NADH-Dehydrogenase und eine alternative Oxidase. Die Reduktion/Oxidation von Ubichinon findet ohne die Bildung von Protonengradienten statt. Auf diese Weise kann bei einer suboptimalen Pi-Versorgung die ATP-Bildung gedrosselt werden. UQH<sub>2</sub>: Ubihydrochinon.

#### 1.6.4 Sekundärstoffwechsel unter Pi-Mangel

Eine allgemeine Reaktion von Pi-verarmten Pflanzen ist die Akkumulation phenolischer Substanzen (Isoflavonoide, Flavonoide, Anthocyane), die über den Shikimatweg synthetisiert werden (Herrmann & Weaver, 1999). Phenole werden über die Wurzel in die Rhizosphäre extrudiert, wo sie stabile Fe- und Al-Komplexe bilden können (Juszczuk *et al.*, 2004). Ähnlich wie die OA<sup>-</sup> erhöhen sie auf dieser Weise das Angebot an solubilisiertem Pi. Phenole stimulieren außerdem die Chemotaxis und das Wachstum der Bodenmikroorganismen und dienen als Signalsubstanzen zur Bildung von Symbiosen mit Pilzen (Dakora & Phillips, 2002). Darüber hinaus wirken Flavonoide und Anthocyane als Schirmpigmente der Pflanze. Ihre Akkumulation kann die Lichtreaktion der Photosynthese drosseln und somit einer Überreduktion des Elektronentransports unter Pi-Mangel vorbeugen.

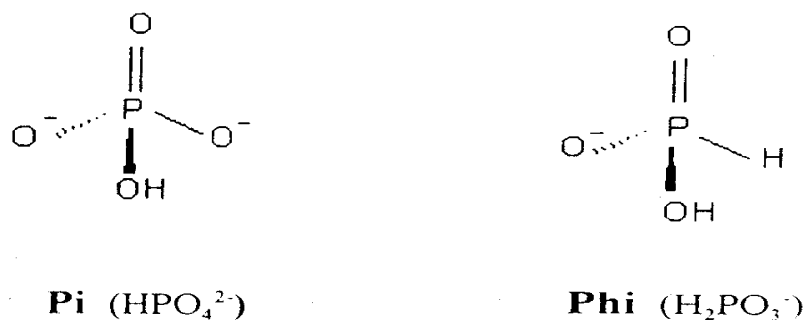
Ein stoffwechselphysiologischer Grund, warum der Shikimatweg bei Pi-Mangel überaktiviert wird, hängt mit der intrazellulären Pi-Homöostase zusammen (Abbildung 1-3, Seite 18). Der Shikimatweg ist mit dem Primärstoffwechsel über PEP verknüpft. Der Syntheseweg von Chorismat verbraucht 2 Moleküle PEP und 1 Molekül ATP. Dabei werden 4 Moleküle Pi freigesetzt. Bei den Reaktionen des Shikimatweges wird also Pi aus phosphorylierten Metaboliten freigesetzt und somit für den Gesamtstoffwechsel remobilisiert (Plaxton *et al.*, 1999).

Diese Beispiele zeigen, dass neben dem Primärmetabolismus auch der Sekundärstoffwechsel eine bedeutende Rolle für die Pi-Aneignung und Remobilisierung von Pi und damit für die Pi-Homöostase hat.

## 1.7 Phosphit und seine landwirtschaftliche Relevanz

In den vorangegangenen Abschnitten wurde beschrieben, mit welchen Anpassungsstrategien Pflanzen eine suboptimale Pi-Versorgung überwinden können. Im Folgenden soll die landwirtschaftliche Relevanz der reduzierten Form von Pi, nämlich Phosphit\* (Phi,  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ ), vorgestellt werden. Die verschiedenen Aspekte von Phi als Düngemittel, als Bekämpfungsmittel gegen Pilzbefall und als xenobiotischer Umweltschadstoff werden dazu besprochen.

Die Struktur von Phi unterscheidet sich von der Pi-Struktur, indem eine Hydroxylgruppe durch ein Wasserstoffatom ersetzt ist (Abbildung 1-5). Trotz der sehr ähnlichen Raumstruktur unterscheidet sich das Verhalten beider Anionen gegenüber biologischen Molekülen, wie zum Beispiel Enzymen oder Transportern.



**Abbildung 1-5:** Struktur von Pi und Phi aus McDonald *et al.* (2001a).

In der Vergangenheit wurde angenommen, dass Phi als Düngerezusatz zur Deckung des Pi-Bedarfs in der Landwirtschaft eingesetzt werden könnte (Rickard, 2000). Der Einsatz von Phi als Pi-Quelle hat sich allerdings nicht bewährt, da die Pflanzen auf Phi-behandeltem Boden deutlich langsamer als auf Pi-behandeltem Boden wuchsen. Heutzutage werden Phi bzw. Derivate davon überwiegend als Wirkstoff von Fungiziden (Aliette<sup>®</sup> oder Fosetyl-Al) und

\* Der Begriff Phosphit wird in der vorliegenden Arbeit als Bezeichnung der Salze der Phosphonsäure verwendet. In der Literatur werden die Begriffe Phosphit und Phosponat oft uneinheitlich benutzt. Phosphonate bezeichnen aber eigentlich organische Verbindungen der Phosphonsäure, welche C-P Verbindung enthalten. Das Herbizid Glyphosat ist eine organische Verbindung der Phosphonsäure.

Herbiziden (Glyphosat) eingesetzt (Fenn & Coffey, 1984, 1989). Phosphit wird zur Vorbeugung von Pilzbefall benutzt, der durch Oomyceten, im besonderen *Phytophthora*, verursacht wird (Hardy *et al.*, 2001). *Phytophthora*-Spezies können zu erheblichen Schäden im Pflanzenbau führen. *Phytophthora infestans* ist beispielweise der Erreger der Kraut- und Braunfäule in Kartoffeln. Mitte des 19. Jahrhunderts war der Pilz für die Vernichtung der gesamten Kartoffelernte in Irland mehrere Jahre hintereinander verantwortlich. Da die Bevölkerung von der Nutzpflanze Kartoffel extrem abhängig war, löste dies eine große Hungerkatastrophe aus. *P. infestans* kann in den Knollen überwintern, wobei eine einzige infizierte Knolle eine Epidemie hervorrufen kann. Insbesondere bei feucht-warmen Witterungsbedingungen breitet sich der Pilz sehr rasch aus.

Lange Zeit wurde angenommen, dass Phi gezielt das Wachstum des Pflanzenpathogens angreift, wobei die Pflanze unbeeinflusst bleibt. Ein charakteristisches Merkmal Phi-behandelten *Phytophthora*-Spezies ist die Akkumulation von Poly- und Pyrophosphaten sowie stark herabgesetzte Levels von ATP (Niere *et al.*, 1990, Niere *et al.*, 1994). Dazu wurden verschiedene Mechanismen für die Wirkungsweise von Phi auf Oomyceten vorgeschlagen. Die starke Akkumulation von Poly- und Pyrophosphaten könnte wichtige biosynthetische Reaktionen des pilzlichen Stoffwechsels inhibieren und demzufolge zu einer Wachstumshemmung führen (Niere *et al.*, 1994, Martin *et al.*, 1998). Der stark verminderte ATP-Level wies auf eine Hemmung der Adenylatsynthese hin (Griffith *et al.*, 1990, Niere *et al.*, 1990). Relativ hohe Konzentrationen an Phi können auch die Aktivitäten mancher Enzyme der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Wegs inhibieren (Barchietto *et al.*, 1992, Stehmann & Grant, 2000). Es lässt sich schlussfolgern, dass Phi am mehreren Stellen Einfluss auf *Phytophthora* nimmt, was zur Beeinträchtigung des Pi-Stoffwechsels führt. Dies deutet auf einer Interferenz von Phi mit dem Pi-Metabolismus des Pilzes hin.

Es gibt Organismen, die Phi durch eine alkalische Phosphatase zu Pi oxidieren können. Die Phi-Behandlung von *P. citrophthora* erhöht beispielsweise die Aktivität einer solchen alkalischen Phosphatase, wodurch der Pi-Gehalt der Pilzzelle zunimmt (Barchietto *et al.*, 1992). Gleichzeitig wurde gezeigt, dass eine Bakterielle Alkalische Phosphatase (BAP) in *Escherichia coli* die Oxidation von Phi zu Pi fördern kann. Auf dieser Weise kann *E. coli* Phi als einzige Phosphor-Quelle verwerten (Yang & Metcalf, 2004). Die Oxidation von Phi wurde ebenfalls bei anderen Prokaryoten wie *Bacillus*, *Pseudomonas* und *Desulfotignum phosphitooxidans* nachgewiesen (Schink & Friedrich, 2000, Schink *et al.*, 2002, Relyea & van der Donk, 2005).



Die Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* kann Phi dagegen nicht als Phosphor-Quelle und Ersatz für Pi verwenden. In diesem Organismus stört Phi die Adaptionen an Pi-Mangel. Dadurch führt die Phi-Applikation zu einem stark reduzierten Wachstum. Die Induktion einer sauren Phosphatase (*Pho5*) wird zusammen mit einem hoch-affinen  $H^+$ /Pi-Symporter (*Pho84*) über das *PHO*-Regulon in *S. cerevisiae* geregelt (McDonald *et al.*, 2001b). In Anwesenheit von Phi werden *Pho5* und *Pho84* stark unterdrückt. Die Autoren vermuten, dass das Angriffsziel von Phi der hoch-affine  $H^+$ /Pi-Symporter ist, der zusammen mit anderen akzessorischen Proteinen als Pi-Sensor und Transmitter des aktuellen Pi-Status dient. Das Wachstum der Pi-versorgten Hefe bleibt dagegen in der Gegenwart von Phi unbeeinflusst.

Es wird gelegentlich behauptet, dass die Wirkung von Phi-haltigen Fungiziden nur auf *Phytophthora*-Spezies begrenzt sei. Damit wird das ökologische Problem des Phi-Einsatzes allerdings verleugnet. Tatsächlich birgt die massenhafte Verwendung von Phi in der Landwirtschaft auch große Risiken. Zum einen besteht die Gefahr wachsender Resistenz in *Phytophthora* gegenüber Phi. Außerdem wird eine Selektion von Mikroorganismen, welche Phi ausnutzen können, begünstigt und das Ökosystem der Bodenorganismen verändert (Guest & Grant, 1991). Auf diese Weise kann Phi auch einen Einfluss auf die symbiotischen Wechselwirkungen mit Mykorrhiza-Pilzen nehmen, von denen die verbesserte Pi-Versorgung vieler terrestrischen Pflanzen abhängt (Seymour *et al.*, 1994, Howard *et al.*, 2000). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass Phi doch in den Stoffwechsel der Pflanzen eingreifen kann und für einen verminderten Anbauertrag besonders bei schlechter Pi-Versorgung verantwortlich sein könnte. Ein Beispiel dafür ist die Inhibierung des Wurzelwachstums in *Allium cepa* nach Behandlung mit Fosetyl-Al (Sukarno *et al.*, 1998). Weiterhin wurde berichtet, dass Phi die Proteoidwurzelbildung in *L. albus* und die Wurzelhaarbildung in *A. thaliana* hemmt (Gilbert *et al.*, 2000, Ticconi *et al.*, 2001). In *A. thaliana* verhindert Phi die Akkumulation von Sekundärstoffen wie Anthocyanen, deren Syntheseweg die Pflanze unter schweren Pi-Mangelbedingungen mit remobilisiertem Pi beliefern kann (Ticconi *et al.*, 2001). In Pflanzen wurde ebenfalls berichtet, dass Phi fähig ist, die Aktivität der PPI-abhängigen PFP zu unterdrücken, die unter Pi-Mangel die glykolytische PFK ersetzen kann (Carswell *et al.*, 1996, 1997). Alle diese Anpassungsstrategien sind wichtig für das Überleben der Pflanzen bei Pi-Mangel.

Erkenntnisse über die Aufnahme, die intrazelluläre Verteilung und das stoffwechselphysiologische Verhalten von Phi sowie die möglichen Interaktionen von Phi mit dem Pi-Stoffwechsel auf zellulärer Ebene würden das Wissen über die Regulation und die Erhaltung der zellulären Pi-Homöostase in Pflanzen darum erweitern.

## **1.8 Zielstellung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Phi auf die Pi-Mangelantwort und den Stoffwechsel von Pflanzen zu charakterisieren.

An geeigneten Modellsystemen (*S. lycopersicum*, *N. tabacum* und *A. thaliana*) sollte die Wechselwirkung von Phi mit der Anpassung an Pi-Mangel experimentell analysiert werden. Veränderte Wachstumseigenschaften sollten anhand der Entwicklung und Morphologie von Tomatenpflanzen und anhand von Wachstum, Vitalität und Zellteilungsraten von Zellkulturen bestimmt werden. Die Photosyntheseleistung und die Ausbildung von Stressmarkern sollten als weitere physiologische Parameter einbezogen werden. Der Einfluss von Phi auf die transkriptionelle Anpassung an Pi-Mangel sollte anhand ausgewählter *PSR*-Gene in Zellkulturen und ganzen Pflanzen untersucht werden.

Bislang gibt es keine Erkenntnisse zur subzellulären Verteilung von Phi in Pflanzenzellen. Um die Mechanismen der Pi-Homöostase und deren Störung durch Phi besser zu verstehen, war die Beschreibung der Aufnahme und Verteilung von Phi in den zellulären Kompartimenten darum ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen sollte der Einfluss von Phi auf die Pi-Aufnahme mithilfe kinetischer Studien mit Zellkulturen beschrieben werden. Dabei sollte der Hemmmechanismus von Phi auf das hoch-affine Pi-Transportsystem charakterisiert werden. Zum anderen sollte mit Hilfe von *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen die Aufnahme von Pi und Phi direkt in Zellkulturen nachgewiesen werden. Durch diese Methode sollte außerdem versucht werden, die subzelluläre Verteilung von Pi und Phi zu verfolgen und insbesondere ihre Translokation in die Vakuole aufzuklären.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Laborchemikalien, Labormaterialien, Kits für die Molekularbiologie, Enzyme und radioaktiv markierte Substanzen wurden bei folgenden Firmen bestellt: Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, [www.biozym.com](http://www.biozym.com)), Carl Roth GmbH & Co KG. (Karlsruhe, [www.carl-roth.de](http://www.carl-roth.de)), MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com)), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, [www.roche.de](http://www.roche.de)), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, [www.serva.de](http://www.serva.de)), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)), VWR International GmbH (Darmstadt, <http://de.vwr.com>), Hartmann Analytik GmbH (Braunschweig, [www.hartmann-analytic.com](http://www.hartmann-analytic.com)).

Reagenzien und Materialien	Hersteller
<u>Chemikalien</u>	
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Duchefa
2-Mercaptoethanol	Carl Roth
2-Propanol	Carl Roth
4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid (MUG)	Biomol
Aceton	Carl Roth
Agarose	Carl Roth
Agarose SEKem	Biozym Scientific
Ammoniummolybdat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> )	VWR International
Ammoniumvanadat (NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub> )	VWR International
Adenosin-5'-triphosphat (ATP-Na <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth
Carbonyl cyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP)	Sigma-Aldrich Chemie
Chlorophorm (CHCl <sub>3</sub> )	VWR International
Cytochrom c	SERVA Electrophoresis
Deuteriumoxid (D <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Chemie
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie
Driselase	Sigma-Aldrich Chemie
Dithiothreitol (DTT)	SERVA Electrophoresis

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Carl Roth
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	Carl Roth
Ethanol (EtOH)	Carl Roth
Ficoll 400	Amersham Biosciences
Formaldehyd (HCHO)	Carl Roth
Formamid (NH <sub>2</sub> CHO)	VWR International
Glukose-6-Phosphat	Roche Diagnostics
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat (HEPES)	Carl Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie
Kaliumdihydrogenphosphit (KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie
Kaliumhexacyanidoferrat(II) (K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]×3H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Chemie
Kaliumhexacyanidoferrat(III) (K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])	Sigma-Aldrich Chemie
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	VWR International
Kinetin (6-Furfurylaminopurin)	VWR International
Lithiumchlorid (LiCl)	Carl Roth
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth
Magnesiumhydroxycarbonat	VWR International
2-(N-Morpholino)-ethansulfonat (MES)	Carl Roth
Methylendiphosphonat (MDP)	Sigma-Aldrich Chemie
Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid	Sigma-Aldrich Chemie
3-(N-Morpholino)-propansulfonat (MOPS)	Carl Roth
MS-Medium	Duchefa
myo-Inositol	VWR International
Nicotinamidadenindinukleotid (NADH-Na <sub>2</sub> )	Carl Roth
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP-Na <sub>2</sub> )	VWR International
Natriumacetat	Carl Roth
Natriumcitrat	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumarsenat (Na <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie
Natriumhypochlorid (NaClO <sub>4</sub> )	Carl Roth
Natrium-Lauroylsarcosin	SERVA Electrophoresis
Natriumvanadat (NaVO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie
Nicotinsäureamid	VWR International
Nonidet NP-40	Sigma-Aldrich Chemie

Oxalacetat	Sigma-Aldrich Chemie
Perchlorsäure (HClO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie
Percoll	Amersham Biosciences
Phenol	Carl Roth
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonat) (PIPES)	Carl Roth
Plant-Agar	Duchefa
p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid	Carl Roth
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich
Pyridoxin B6 $\times$ HCl	Sigma-Aldrich
Pyrophosphat (PPi-Na <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Salpetersäure (HNO <sub>3</sub> )	Carl Roth
Salzsäure (HCl)	Carl Roth
D(+)-Saccharose	Carl Roth
D-Sorbitol	Carl Roth
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carl Roth
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Carl Roth
Siliconöl AR1000	Sigma-Aldrich Chemie
Siliconöl AR200	Sigma-Aldrich Chemie
Thiamin B1 $\times$ HCl	Sigma-Aldrich Chemie
Trichloressigsäure	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth
Triton X100	SERVA Electrophoresis
Tween® 20	Carl Roth
X-Gluc	ApliChem

### **Reagenzien und Kits für die Molekularbiologie**

DNA Sizer XII	PeqLab Biotechnologia
Desoxyribonuclease I (DNase I)	MBI Fermentas
First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas
Fisch Sperma DNA	Sigma-Aldrich Chemie
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics
iQ™ SYBR® Green Supermix	BioRad
Nick Translation Kit	Roche Diagnostics
Nukleotide (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	MBI Fermentas
<i>Pst</i> I	MBI Fermentas
RiboLock™ Ribonukleaseinhibitor	MBI Fermentas
Qiagen Plasmid Midi Kit	QIAGEN
<i>Taq</i> -Polymerase	MBI Fermentas

*XhoI*

MBI Fermentas

**Farbstoffe**

Bromphenolblau

SERVA Electrophoresis

4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Carl Roth

Fluoresceindiacetat

Sigma-Aldrich Chemie

Hoechst 33342

Calbiochem

Malachitgrün-Oxalat

Sigma-Aldrich Chemie

Rhodamin 123

Calbiochem

Roti® Quant (Bradford-Reagenz)

Carl Roth

Xylencyanol

SERVA Electrophoresis

**Materialien**

Glasperlen

Carl Roth

Imagerplatten, Typ BAS 2040S

Raytest

Probe-Quant™ G-50 Micro Columns

Amersham Biosciences

NMR Röhrchen, 5mm

SpintecRototec

Nylontransfermembran (Hybond N<sup>+</sup>)

Amersham Biosciences

PCR Gefäße, 200 µL

Biozym Scientific

Petri-Schalen

Greiner Bio-One

Polypropylen-Röhrchen, 400 µL

Greiner Bio-One

**Radioaktiv markierte Substanzen**[<sup>32</sup>P] H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Hartman Analytic

[<sup>33</sup>P] H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Hartman Analytic

[<sup>3</sup>H]H<sub>2</sub>O

Hartman Analytic

α-[<sup>32</sup>P] dCTP

Hartman Analytic

Szintillationscocktail (Rotiszint® eco)

Carl Roth

**2.2 Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Modell</b>
Aspirator	UniEquip	UNIJET II Refrigerated Aspirator
Durchfluscytometer	Becton Dickinson	LSR I
Elektrophoresekammer	BiotecFischer	horizontal
Flüssigkeitsszintillations- spektrometer	Packard	TriCarb-2100 TR
Gefriertrocknungsanlage	STERIS	LYOVAC GT 2
Geldokumentationssystem	PharmaciaBiotech	Thermal Imaging System FTI 500
Inkubator	Infors	HT Infors, Multitron 2

Inkubator	NewBrunswickScientific	INNOVA 4230
Isotopenmeßgerät	Raytest	FujiFilm BAS 1500
Klimaschrank	Percival Scientific	AR-22L
Magnetrührer	VARIOMAG	MAXI HP1P
Mikroskop	Zeiss	Axioskop
NMR-Gerät	Bruker	AV-300
NMR-Gerät	Bruker	DRX-600
Osmometer	Gonotec	Osmomat 030
PCR-Gerät	BioRad	iCycler iQ RealTime Detection System
pH-Meter	WTW	pH 526
Photosynthesis Analyser	Walz	Mini-PAM
Pipetten	Gilson	5000, 1000, 200, 100, 20, 10, 2 µL
Schüttler	ILKA Labortechnik	KS 250 basic
Spannungsquelle	Amersham Biosciences	EPS 301
Spektrometer	PerkinElmer	Lumineszenz Spektrometer LS-50 B
Spektrometer	PharmaciaBiotech	Ultrospec 3300 pro
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer 5436
Ultraschall-Desintegrator	BANDELIN electronic	Sonoplus
UV-crosslinker	Stratagene	UV-Stratalinker 1800
Waage	Sartorius	PT 3100
Waage, fein	Sartorius	BP 211D
Waage, fein	CHYO	MJ-300
Wasseranlage (ddH <sub>2</sub> O)	TKA	MicroPure
Zentrifuge	Beckman	GS-15R
Zentrifuge	Beckman	Microfuge 12
Zentrifuge	Eppendorf	5415 R
Zentrifuge	Eppendorf	5415 C
Zentrifuge	Eppendorf	5403

### 2.3 Zellsuspensionskulturen

In der vorliegenden Arbeit wurden heterotroph wachsenden Zellsuspensionskulturen von Tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Lukullus) und Tabak (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2, BY-2) benutzt. Tabelle 2-1 erfasst die Kultivierungsbedingungen beider Zellsysteme. Das Kulturwachstum erfolgte in Murashige-Skoog Nährmedium (MS-Medium, Murashige & Skoog, 1962) mit 3 % (w/v) Saccharose in Schüttelkolben (vgl. Kapitel 7.3, Tabelle 7-1 bzw. Tabelle 7-2). Die Pi-Ausgangskonzentration, soweit nicht anders vermerkt, lag in allen Zellkulturmedien bei 2.5 mM.

Pi-Mangelbedingungen (-Pi-Kultur) wurden hergestellt, indem Zellen mit phosphatfreiem Medium gewaschen und 24 Stunden in Medium ohne organische oder anorganische Pi-Quellen kultiviert wurden. +Pi-Kulturen erhielten dagegen täglich KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, wodurch eine

annähernd konstante Konzentration von Pi sichergestellt war. Als Pi-Quelle wurde sterile  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung benutzt. Die Behandlung mit Phi wurde mit steriler  $\text{KH}_2\text{PO}_3$ -Lösung (pH 6.5) durchgeführt.

**Tabelle 2-1:** Anzuchtbedingungen von Tomaten- und Tabakzellkulturen.

Zellkultur	Medium	Temperatur	Belichtung	Rotation	Passagieren	Referenz
Tomate	modifiziertes MS-Medium*, pH 6.0, 100 mL	28 °C	keine	160 U/min	alle 3-4 Tage	(Tewes <i>et al.</i> , 1984)
Tabak	MS-Medium (Duchefa)** , pH 5.8, 30 mL	23 °C	keine	120 U/min	wöchentlich	(Nagata <i>et al.</i> , 1992)

\* $\text{CoCl}_2$  und  $\text{CuSO}_4$  wurden vom Nährmedium weggelassen. *Myo*-Inosit (100 mg/L), Thiamin (0.5 mg/L), Pyridoxin (0.5 mg/L), Nicotinsäureamid (1.0 mg/L), 2,4-D (0.1 mg/L) und 6-Furfurylaminopurin (0.02 mg/L) wurden zum Basalmedium zugegeben.

\*\*Es wurde MS-Medium ohne Vitamine verwendet (Duchefa, M0221). *Myo*-Inosit (100 mg/L), Thiamin (1.0 mg/L) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (0.04 mg/L) wurden zum Basalmedium zugegeben.

## 2.4 Pflanzenanzucht

### 2.4.1 Anzucht von Tomatenpflanzen als Hydrokultur

Für hydroponische Versuche mit Pflanzen wurden die Tomatensorte *Solanum lycopersicum* cv. Lukullus (Wildtyp) sowie eine transgene Linie mit *PromLX::uidA* cv. Lukullus verwendet (Köck *et al.*, 2006). Die transgene Linie 10 *PromLX::uidA* wurde freundlicherweise von Dr. M. Köck (Biozentrum der Martin-Luther-Universität) zur Verfügung gestellt.

Die Tomatenpflanzen wurden als Hydrokultur auf 1× Hoagland-Medium angezogen. Das Hoagland-Medium wurde nach Daram *et al.* (1998) hergestellt und ist im Anhang aufgeführt (vgl. Kapitel 7.3, Tabelle 7-3 bzw. Tabelle 7-4). Die Samen wurden für 10 min mit 4 %  $\text{NaClO}_4$ -Lösung sterilisiert, 5× mit sterilem  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen, auf Glasperlen und Medium ausgelegt und 3 Tage bei 28 °C im Dunkeln angekeimt. Danach wurden die Pflanzen in Kleingewächshäusern bei 22 °C unter Langtagbelichtung (16 h Tag/ 8 h Nacht) angezogen. Nach 7 Tagen Wachstum wurden die Keimlinge in Versuchen eingesetzt.

### 2.4.2 Erdanzucht von Tomatenpflanzen

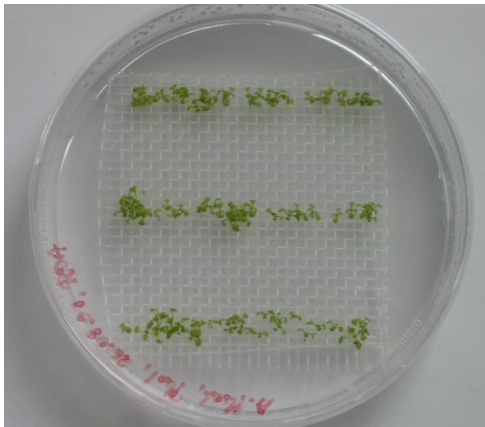
Untersuchungen zur Verwundung und zum Einfluss von Phi wurden mit 4 Wochen alten Tomatenpflanzen (Wildtyp) durchgeführt. Die Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen bei einer Tagestemperatur von 23-24 °C (16 h) und Langtag-



Belichtungsdauer mit Zusatzbeleuchtung von Samen angezogen. Die Nachttemperatur lag bei 19-20 °C (8 h).

### 2.4.3 Pflanzen von *Arabidopsis thaliana*

Zur Anzucht von Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* wurden Wildtyp-Pflanzen (cv. Columbia) und die Mutanten *pho1* und *pho2* (cv. Columbia; Prof. S. Abel, University of California) verwendet. Die Samen wurden für 2 min in 70 % EtOH inkubiert und danach für 10 min mit NaClO<sub>4</sub> behandelt. Auf Anzuchtagar mit Pi (1× Hoagland-Medium, 1 % (w/v) Saccharose, 0.8 % (w/v) Plant-Agar (Duchefa), 0.05 % (w/v) MES, pH 5.7) wurde Siebgewebe ausgelegt und darauf wurden die Samen ausgesät (Abbildung 2-1). Zur gleichmäßigen Keimung der Samen wurden die Agar-Platten dunkel bei 4 °C für 48 h gestellt. Das Keimlingswachstum erfolgte danach bei 50 % relativer Luftfeuchte, 22 °C/ Tagestemperatur und 18 °C/ Nachttemperatur (Klimaschrank AR-22L). Die Beleuchtung entsprach Kurztagbedingungen mit einer Lichtdauer von 8 h (16 h Dunkelheit) und mit Lichtintensität von 111 μE m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>. Nach 2 Wochen Keimung wurden die Pflanzen mithilfe des Siebgewebes in flüssiges 1× Hoagland-Medium überführt. Das Medium wurde wöchentlich gewechselt. Nach 2 Wochen Wachstum wurden die Keimlinge in Versuchen eingesetzt.



**Abbildung 2-1:** Anzuchtssystem für Keimlinge von *Arabidopsis thaliana*. Die desinfizierten Samen wurden auf Siebgewebe auf Agar-haltigem Nährmedium ausgesät.

## 2.5 Analytisch-biochemische Bestimmungen

### 2.5.1 Phosphatbestimmung

Zur Phosphatbestimmung wurden zwei Methoden eingesetzt (Malachitgrün und Ammoniummolybdat/Vanadat), die auf der Bildung von farbigen Phosphormolybdat Komplexen beruhen.

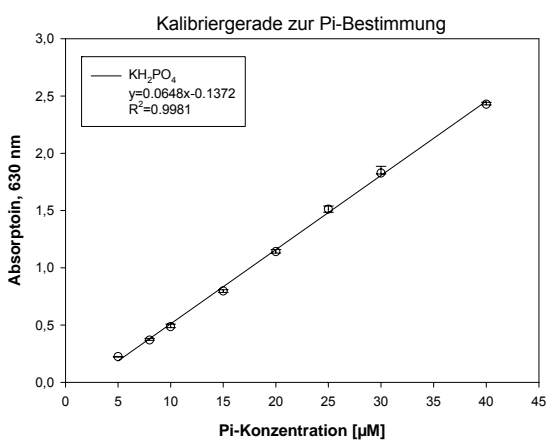
### 2.5.1.1 Vorbehandlung von Proben für die Phosphatbestimmung

Zur Bestimmung des Phosphatgehaltes in den Nährlösungen wurde das Medium zuerst durch Zentrifugation von den Zellen geklärt und der Phosphatgehalt im Überstand bestimmt.

Zur Bestimmung des intrazellulären Phosphates wurden die Zellen vom Medium durch Vakuumfiltration abgetrennt und mit Pi freiem Medium gewaschen. Die Zellen wurden in 4 mL 10 % Trichloressigsäure resuspendiert und durch Ultraschall (3 x 30 sec, 40 W, Mikrospritze, Ultraschall-Desintegrator Sonoplus) aufgeschlossen. Die Zellbruchstücke wurden abzentrifugiert und der Überstand wurde zur Analyse des Gehaltes an löslichem Phosphat verwendet. Die intrazelluläre Pi-Konzentration wurde auf das ermittelte Frischgewicht bezogen. Als Phosphatstandard diente in allen Fällen  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in Pi-freiem Nährmedium.

### 2.5.1.2 Malachitgrün-Methode

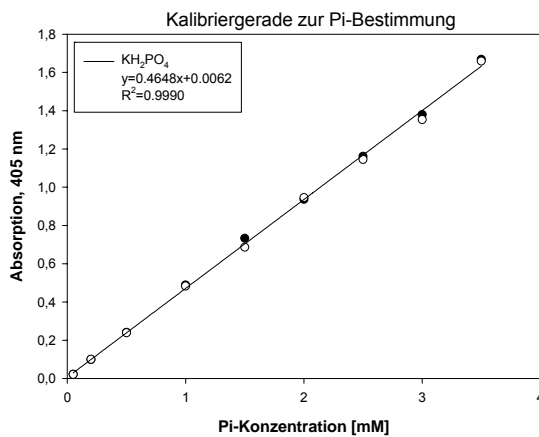
Die Phosphatbestimmung mit Malachitgrün beruht auf der Bildung eines Malachitgrün-Phosphomolybdat-Komplexes (Baykov *et al.*, 1988). Es wurden 800  $\mu\text{L}$  Probe mit 200  $\mu\text{L}$  Malachitreagenz vermischt und für 20 min inkubiert (Raumtemperatur). Das Malachitreagenz wurde aus 2.5 mL 7.5 % Ammoniummolybdat, 0.2 mL 11 % Tween 20 und 10 mL Farbstofflösung (0.44 g Malachitgrün in 300 mL 3 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) zusammengesetzt. Die Phosphatkonzentration wurde durch Absorption bei 630 nm bestimmt. Anhand einer Kalibriergeraden konnte die Phosphatkonzentration der Proben berechnet werden. Ein Beispiel für eine Eichgerade ist in Abbildung 2-2 gezeigt.



**Abbildung 2-2:** Kalibriergerade zur Pi-Bestimmung nach der Malachitgrün-Methode. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 5 bis 40  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  gemessen. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei Messungen gezeigt. Die Regressionsgerade ist dem Median angepasst.

### 2.5.1.3 Ammoniummolybdat/Vanadat-Methode

Bei dieser Methode basiert die Phosphatbestimmung auf der spektrophotometrischen Messung eines Phosphomolybdat/Vanadat-Komplexes bei 405 nm (Rebeille *et al.*, 1982). Die Proben wurden mit 20 % Trichloressigsäure für 30 min auf Eis behandelt (Deproteinisierung). Nach Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, 4 °C) wurden 500 µL des Überstandes mit 500 µL 40 mM Ammoniummolybdat/ 2.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 500 µL 21 mM Ammoniumvanadat/ 0.28 N HNO<sub>3</sub> vermischt. Nach 15 min Inkubation wurde die Absorption des Überstandes bei 405 nm spektrophotometrisch (Spektrometer Ultrospec 3300 *pro*) vermessen. Anhand einer Kalibriergeraden konnte die Phosphatkonzentration der Proben berechnet werden (Abbildung 2-3).



**Abbildung 2-3:** Kalibriergerade zur Pi-Bestimmung nach der Ammoniumvanadat/Molybdat-Methode. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 0,05 bis 3,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gemessen. Die Regressionsgerade ist dem Mittelwert einer Doppelbestimmung angepasst.

## 2.5.2 Pigmentbestimmung

### 2.5.2.1 Chlorophyllbestimmung

Der Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalt wurden nach Extraktion mit 2 % (w/v) Mg-Hydroxycarbonat/Aceton (Chlorophyll-Extraktionspuffer) spektrophotometrisch bestimmt (Arnon, 1949). Dazu wurden die bei -80 °C gelagerten Blattproben in flüssigem Stickstoff gemörsert und dann mit 5 mL Chlorophyll-Extraktionspuffer behandelt. Die Extrakte wurden 30 sec lang stark geschüttelt. Die Zelltrümmer wurden danach bei 4 °C und 10000 g für 10 min abzentrifugiert. Der Pigmentgehalt wurde aus der Absorption des Überstandes des acetonischen Extraktes bei 720 nm, 470 nm, 645 nm und 662 nm ermittelt. Nach Subtraktion des Trübungswertes (Extinktion bei 720 nm) wurden die Pigmentkonzentrationen mithilfe der von Lichtenthaler (1987) angegebenen Formeln errechnet:

$$\text{Chlorophyll } a = 11.24 \times A_{662} - 2.04 \times A_{645},$$

$$\text{Chlorophyll } b = 20.13 \times A_{645} - 4.19 \times A_{662},$$

$$\text{Carotinoide} = \frac{1000 \times A_{470} - 1.90 \times \text{Chlorophyll } a - 63.14 \times \text{Chlorophyll } b}{214}.$$

Durch Einbeziehen des Frischgewichtes wurde der Pigmentgehalt pro mg Frischgewicht ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  FG) angegeben.

### 2.5.2.2 Anthocyanbestimmung

Zur Bestimmung des Anthocyangehaltes in Blättern wurden Blattproben zu feinem Pulver gemörsert und mit 5 mL Anthocyan-Extraktionspuffer (18:1:81 = Propanol:37 % HCl:H<sub>2</sub>O) behandelt (Ticconi *et al.*, 2001). Nach einer Homogenisierung wurden die Proben für 3 min in einem kochenden Wasserbad inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, 4 °C) wurde die Absorption des Überstandes bei 535 nm und 650 nm (Trübungswert) gemessen. Die Anthocyanabsorption wurde durch Abziehen des Trübungswertes bestimmt und auf das ermittelte Frischgewicht bezogen ( $A_{535}/\text{g}$  FG):

$$A_{\text{Anthocyan}} = A_{535} - A_{650}.$$

### 2.5.2.3 Photosyntheseeffizienz

Zur Bestimmung der Photosyntheseleistung in Blättern wurde die Effizienz des Photosystems II (PSII) nach Humbeck & Krupinska (1996) ermittelt. Bei der Methode wird das Verhältnis zwischen der variablen und der maximalen Fluoreszenz ( $F_v/F_m$ ) des Chlorophylls im PSII bestimmt. Dies dient als Maß für die Quantenausbeute des PSII. Die Chlorophyllfluoreszenzmessungen wurden mit einem Pulse-Amplituden-Modulations-Fluorometer (Mini-PAM) in der Blattmitte durchgeführt. Nach einer 30-minütigen Dunkeladaptation der Blätter wurde die Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) gemessen. Dazu wurden die Blätter mit einer Lichtintensität von  $0.1 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \times \text{sec})$  bestrahlt, die keine signifikante Energieumwandlung (z. B. Fluoreszenz) gestattete. Die maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ) wurde nach einer Blitzlichtapplikation (700 msec, Weißlicht) mit einer Intensität von  $4000 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \times \text{sec})$  bestimmt. Die Photosyntheseleistung wurde aus der folgenden Gleichung berechnet:

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

### 2.5.3 Proteinbestimmung

Die Gesamtproteinmenge wurde nach Bradford bestimmt. Die Methode beruht auf der Absorptionsänderung des Coomassie-Farbstoffes (Brillant Blue-G250), die sich durch Bindung des Farbstoffes an Proteine ergibt (Bradford, 1976). Das Roti<sup>®</sup> Quant-Reagenz wurde laut Herstellerangaben verwendet und die Absorption wurde bei 595 nm bestimmt. Für die Quantifizierung der Proben wurde eine Eichgerade mit BSA im Konzentrationsbereich von 0.2 bis 1 µg/µL erstellt.

### 2.5.4 Enzymbestimmungen

In der vorliegenden Arbeit kamen verschiedene Enzymtests zur Anwendung. Die Verwendung und der Zweck der einzelnen Enzymbestimmungen sind in Tabelle 2-2 aufgeführt.

**Tabelle 2-2:** Liste der verwendeten Enzymtests. Die Tabelle fasst den Zweck der einzelnen Enzymbestimmungen zusammen.

Enzym	Verwendung	Zweck	Referenz
α-Mannosidase	Markerenzym, vakuoläre Lokalisation	Berechnung der Vakuolenausbeute	(Boller & Kende, 1979)
Malat-Dehydrogenase	Markerenzym, mitochondriale Lokalisation	Reinheitscharakterisierung der Vakuolenfraktion, Kontamination mit Protoplasten und Mitochondrien	(Bergmeyer, 1974)
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Markerenzym, cytosolische Lokalisation	Reinheitscharakterisierung der Vakuolenfraktion, Kontamination mit Protoplasten	(Bergmeyer & Bergmeyer, 1984)
NADH-cytochrom-c-Reduktase	Markerenzym, Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum (ER)	Reinheitscharakterisierung der Vakuolenfraktion, Kontamination mit ER	(Tolbert, 1974)
β-Glucuronidase	Fluorometrische und histochemische Analyse der β-Glucuronidase-Aktivität	Charakterisierung der <i>RNaseLX</i> Promoteraktivität	(Jefferson <i>et al.</i> , 1987, Blume & Grierson, 1997)

#### 2.5.4.1 $\alpha$ -Mannosidase

In Tomatenzellen ist  $\alpha$ -Mannosidase (EC 3.2.1.24) ausschließlich vakuolär lokalisiert. Das Enzym diente als Markerenzym zur Berechnung der Vakuolenausbeute. Dazu wurde die Aktivität der  $\alpha$ -Mannosidase zuerst in Protoplasten und dann in isolierten Vakuolen ermittelt. Die Vakuolenausbeute wurde aus dem Verhältnis der  $\alpha$ -Mannosidaseaktivität der Vakuolenfraktion gegenüber der Aktivität in der Gesamtprotoplastenfraktion berechnet. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte kolorimetrisch nach Boller & Kende (1979) oder fluorometrisch nach Hörtensteiner *et al.* (1992). Als Substrat für die kolorimetrische Bestimmung diente p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid (Absorption bei 405 nm). Zur fluorometrischen Bestimmung wurde Methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid als Substrat verwendet (Anregungswellenlänge 366 nm, Emissionswellenlänge 448 nm, Lumineszenz Spektrometer LS-50 B).

#### 2.5.4.2 Malat-Dehydrogenase

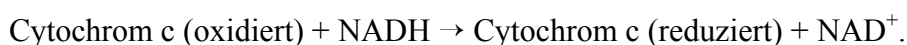
Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37) wurde als Markerenzym für zelluläre Verunreinigungen (Protoplasten und Mitochondrien) der Vakuolenfraktion eingesetzt und nach der Methode von Bergmeyer (1974) bestimmt. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Oxalacetat zu Malat, wobei NADH gleichzeitig zu  $\text{NAD}^+$  umgewandelt wird. Der Verbrauch von NADH wurde spektrophotometrisch bei 340 nm gemessen.

#### 2.5.4.3 Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Die Aktivität von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) wurde nach der Methode von Bergmeyer & Bergmeyer (1984) bestimmt. Das Enzym katalysiert die Reaktion von D-Glukose-6-Phosphat und  $\text{NADP}^+$  zu D-Gluconat-6-Phosphat und  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . Die Menge des entstehenden NADPH wurde spektrophotometrisch bei 340 nm gemessen.

#### 2.5.4.4 NADH-Cytochrom-c-Reduktase

NADH-Cytochrom-c-Reductase (EC 1.6.99.3) wurde als Markerenzym für Kontamination der Vakuolenpräparation mit Endoplasmatischem Retikulum benutzt. Das Enzym katalysiert die folgende Reaktion:



Die Enzymaktivität wurde spektrophotometrisch bei 550 nm nach Tolbert (1974) erfasst.

#### 2.5.4.5 $\beta$ -Glucuronidase

Die Aktivität von  $\beta$ -Glucuronidase (GUS, EC 3.2.1.128) in der transgenen *PromLX::uidA* Linie 10 wurde in Zellextrakten durch fluorometrische Analyse und in ganzen Pflanzen durch histochemische Analyse nachgewiesen.

##### 2.5.4.5.1 Fluorometrischer GUS-Assay für Zellextrakte

Bei dem fluorometrischen GUS-Assay wurde die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase in Zellextrakten bestimmt. Als Substrat wurde 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronid (MUG) eingesetzt, welches durch die  $\beta$ -Glucuronidase zu 4-Methyl-Umbelliferon (MU) umgesetzt wird (Jefferson *et al.*, 1987). Die Bildung von MU wurde fluorometrisch gemessen (365 nm Anregungswellenlänge, 455 nm Emissionswellenlänge, Lumineszenz Spektrometer LS-50 B). Zur Herstellung der Zellextrakte wurde das Pflanzenmaterial (ca. 200 mg) in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 2 mL GUS-Extraktionspuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O (pH 7.0), 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 0.1 % (v/v) Na-Lauroylsarcosain, 0.1 % (v/v) Triton X-100) aufgenommen. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C wurde der Überstand zur Proteinbestimmung und Aktivitätsbestimmung der  $\beta$ -Glucuronidase verwendet. Zur Aktivitätsanalyse wurden je 20  $\mu$ L des Überstandes mit 1 mL GUS-Assay-Puffer (GUS-Extraktionspuffer, 1 mM MUG) bei 37 °C inkubiert. Die Kinetik der Reaktion wurde in Zeitabständen von 15 min verfolgt, wobei je 200  $\mu$ L des Reaktionsansatzes entnommen und mit 800  $\mu$ L 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestoppt wurden.

##### 2.5.4.5.2 Histochemischer GUS-Assay für ganze Pflanzenorgane

Bei der histochemischen GUS-Analyse wurde die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase durch Spaltung von X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-glucopyranosid) in den einzelnen Pflanzenorganen nachgewiesen (Blume *et al.*, 1997). Das bei der enzymatischen Reaktion freigesetzte Indolderivat war als blaues Präzipitat zu erkennen.

Frisches Pflanzenmaterial wurde mit 0.3 % (v/v) Formaldehyd, 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7.0) und 1 mM EDTA für 5 min in Vakuum gebracht (vakuuminfiltriert) und anschließend mit der gleichen Lösung für weitere 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7.0)/1 mM EDTA wurden die Pflanzen mit einer Färbelösung (0.5 mM X-Gluc, 100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7.0),

50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2 % (v/v) Triton X-100, 0.1 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$  und 0.1 mM  $K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$  über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 2 h in 45 % (v/v) EtOH, 5 % Formaldehyd und 5 % (v/v) Essigsäure fixiert. Durch mehrmaliges Waschen mit 96 % EtOH wurde das Chlorophyll entfärbt. Die Pflanzen wurden bis zur fotografischen Dokumentation in 70 %-igem EtOH bei 4 °C aufbewahrt.

## 2.6 Mikroskopische Analyse

### 2.6.1 Mitose-Index

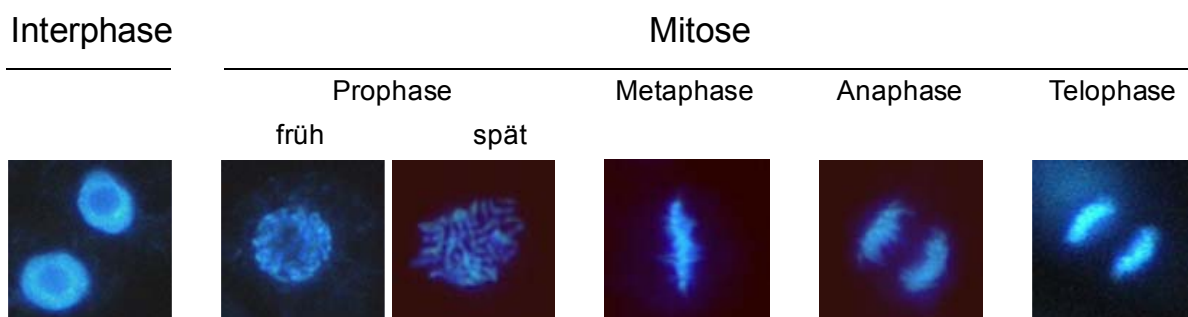
Der Mitose-Index ist eine wichtige Messgröße des Zellzyklus und der Zellteilungsrate einer Zelllinie. Zur Bestimmung des Mitose-Index wurden Zellkerne mit DAPI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Barrierefilter 450-490 nm) analysiert.

Die Zellen wurden dazu zuerst bei leichtem Schütteln für 15 min mit 3 % Paraformaldehyd fixiert, dann abzentrifugiert und anschließend mit 900  $\mu$ L Präparationspuffer (0.1 M PIPES, 5 % DMSO, 0.05 % Nonidet NP-40, 1 mM EGTA, 10 % Saccharose, pH 7.2) und 100  $\mu$ L DAPI (0.01 mg/ mL) für 30 min im Dunkeln gefärbt.

Für jede Probe wurden am Fluoreszenzmikroskop ca. 1000 Zellen ausgewertet indem die einzelnen Teilungsphasen bestimmt wurden (Abbildung 2-4). Der Mitose-Index wurde mit der folgenden Gleichung errechnet:

$$\text{Mitose Index [\%]} = \frac{P+M+A+T}{I+P+M+A+T} \times 100,$$

wobei  $P$ =Prophase,  $M$ =Metaphase,  $A$ =Anaphase,  $T$ =Telophase und  $I$ =Interphase.



**Abbildung 2-4:** Darstellung der Interphase und der einzelnen Teilungsphasen der Mitose.



## 2.6.2 Vitalitätstest

Zur Vitalitätsbestimmung der Zellpopulation wurde Fluoresceindiacetat (FDA) verwendet (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1970). Lebende Zellen setzen FDA durch Esterasen zu einem fluoreszierenden Produkt um und behalten den Farbstoff innerhalb der intakten Zellmembran. Tote Zellen haben keine intakte Membran und werden nicht durch FDA gefärbt.

Die Zellen wurden mit 0.01 % FDA vermischt und sofort am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die lebenden Zellen fluoreszieren nach Blauanregung grün. Bei jeder Probe wurden ca. 1000 Zellen ausgezählt. Der Anteil an vitalen Zellen wurde aus der folgenden Gleichung errechnet:

$$\text{Vitale Zellen [\%]} = \frac{\text{vitale Zellen}}{\text{vitale Zellen} + \text{tote Zellen}} \times 100.$$

## 2.7 Durchflusscytometrische Analyse

Eine durchflusscytometrische Analyse wurde zur Überprüfung der Reinheit von Vakuolen durchgeführt. Die Vakuolen wurden dazu mit Rhodamin 123 (0.1 µg/mL) und Hoechst 33342 (2.5 µg/mL) für ca. 10 min. bei Raumtemperatur gefärbt. Zur Messung wurde ein LSR I Durchflusscytometer von Becton Dickinson verwendet. Die Anregung der Farbstoffe erfolgte bei 350 nm (Hoechst) und 488 nm (Rhodamin 123) mit geeigneten Lasern. Die Fluoreszenzen wurden bei 530/28 nm (Rhodamin 123) und 500/11 nm (Hoechst) gemessen.

Färbung und Messung konnte freundlicherweise in der Core-Unit Fluoreszenztechnologie (Dr. Andreas Lösche) des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) Leipzig durchgeführt werden.

## 2.8 Transkriptionsanalyse

Wasser und Geräte für die Arbeit mit RNA wurden vor Gebrauch mit 0.1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. DEPC acyliert Aminogruppen und inaktiviert so Proteine, wie z. B. RNasen. Nach Autoklavieren zersetzt sich DEPC vollständig zu CO<sub>2</sub> und Ethanol. Lösungen für die Arbeit mit RNA wurden ausschließlich mit DEPC-behandeltem Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) angesetzt.

## 2.8.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde aus Zellkulturen oder Pflanzenteilen isoliert. Das gefrorene Material wurde durch Mörsern in flüssigem Stickstoff zerrieben und in 2 mL RNA-Extraktionspuffer (0.1 M NaCl, 10 mM TRIS/HCl, 1 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, pH 7.5) und 2 mL Phenol/Chloroform (1:1) aufgenommen. Das Extraktionsgemisch wurde für 5 min stark geschüttelt. Zur Abtrennung der phenolischen von der wässrigen Phase erfolgte eine Zentrifugation bei 4800 rpm und 4 °C (10 min). Zur vollständigen Extraktion der vorhandenen Proteine wurde die wässrige Phase zusätzlich noch zweimal mit Phenol/Chloroform behandelt. Die Nukleinsäuren wurden mit 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat und 0.7 Volumen 2-Propanol über Nacht bei -20 °C präzipitiert, durch Zentrifugation sedimentiert, getrocknet und im DEPC-H<sub>2</sub>O aufgelöst.

## 2.8.2 Northern-Blots

### 2.8.2.1 Lithiumchlorid-Fällung der Gesamt-RNA

Für die Northern Blot-Analyse wurde RNA durch eine LiCl-Fällung weiter gereinigt und von genomischer DNA getrennt. Die Gesamt-RNA wurde in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgelöst und mit dem gleichen Volumen 4 M LiCl-Lösung über Nacht bei 4 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C für 30 min wurde das Pellet mit 70 %-igem EtOH gewaschen. Die RNA wurde zentrifugiert, getrocknet und in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Ausbeute an Gesamt-RNA wurde spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm quantifiziert (Spektrometer Ultraspec 3300 *pro*).

### 2.8.2.2 Elektrophorese

Zur Northern Blot-Analyse wurde zuerst eine elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA (25 µg) unter denaturierenden Bedingungen in Formaldehyd-haltigem Agarosegel (1.5 %) vorgenommen. Als Probe- und Laufpuffer wurde 1×MOPS-RNA-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7.0) verwendet. Die RNA-Proben wurden im Denaturierungspuffer (18.5 % (v/v) Formaldehyd, 1×MOPS-RNA-Puffer, 12.5 M Formamid) für 15 min bei 65 °C behandelt und dann sofort auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 3.5 µL Ladepuffer (0.2 % (w/v) Ethidiumbromid, 0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylencyanol, 50 % (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA, pH 8) zu 25 µL Probe wurde

die RNA auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch (4 V/cm Elektrodenabstand) aufgetrennt.

### 2.8.2.3 RNA-Blot

Nach der Elektrophorese wurde die RNA durch Kapillartransfer über 24 Stunden auf eine positiv geladene Nylontransfermembran (Hybond N<sup>+</sup>) geblottet. Als Transferpuffer wurde 20×SSC (3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat, pH 7.0) benutzt. Durch UV-cross-linking im Auto-Crosslink-Modus (120 000 µJ, 25 bis 50 sec, UV-Stratalinker 1800) und Erhitzen bei 80 °C (2 h) wurde die RNA irreversibel auf der Membran fixiert.

### 2.8.2.4 cDNA-Sonden aus Plasmiden

Alle cDNAs wurden freundlicherweise als Plasmide von Dr. M. Köck (Biozentrum der Martin-Luther-Universität) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide wurden mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit isoliert. Die cDNA-Fragmente für *RNaseLE*, *RNaseLX* und *LePS2* wurden aus den Plasmiden pRLE, pRLX und pPSI 14B durch Verdau mit *PstI/XhoI* ausgeschnitten und aus Agarosegelen aufgereinigt (High Pure PCR Product Purification Kit).

### 2.8.2.5 PCR-amplifizierte cDNA-Sonden

Die cDNA-Sonden für *LePT2* und *EF1α* wurden zusätzlich durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus pCR2.1-TOPO-Vektor (pLePT2 bzw. pEF1α) amplifiziert, da die Ausbeute dieser cDNAs aus den Plasmiden gering war. Die Amplifikation wurde in einem PCR-Gerät (iCycler iQ) mit Reaktionslösungen von MBI Fermentas durchgeführt. Ein PCR-Ansatz (50 µL) enthielt 1×PCR-Puffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, je 20 pmol Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 20-100 ng *Template*-DNA und 1 U *Taq*-Polymerase. Die Sequenz-spezifischen Primer sind in Kapitel 2.8.4 aufgeführt. Es wurde das folgende PCR-Programm verwendet: 1. initiale Denaturierung bei 95 °C, 2 min; 2. Denaturierung: 95 °C, 1 min; 3. Annealing: 62 °C, 1 min; 4. Elongation: 72 °C; 5. finale Elongation: 72 °C, 10 min. Die Amplifikation erfolgte mit 35 Zyklen (Wiederholung der Schritte 2-4).

### 2.8.2.6 Radioaktive Markierung der cDNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der cDNA-Fragmente erfolgte mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P[dCTP] durch Nick-Translation laut Herstellerangaben (Nick Translation Kit, RocheDiagnostics). Anschließend wurden die radioaktiv markierten cDNA-Sonden über MicroSpin-Zentrifugationsröhrchen (Probe-Quant™ G-50 Micro Columns) gereinigt. Unmittelbar vor der Verwendung wurde die cDNA-Sonde für 10 min bei 95 °C denaturiert.

### 2.8.2.7 Hybridisierung und Autoradiographie

Die Northern-Hybridisierung wurde nach Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989) durchgeführt. Als Hybridisierungsproben wurden  $\alpha$ -<sup>32</sup>P[dCTP] radioaktivmarkierten cDNA-Sonden für *RNaseLE*, *RNaseLX*, *LePS2*, *LePT2* und *EF1 $\alpha$*  benutzt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die mit RNA beladene Nylonmembran für 2 h mit Prähybridisierungslösung (6×SSC, 5×Denhardt's, 0.5 % (w/v) SDS, 100  $\mu$ g Fisch-Sperma-DNA) bei 65 °C behandelt. Die 5×Denhardt's-Lösung enthielt 0.5 g Ficoll 400, 0.5 g Polyvinylpyrrolidon und 0.5 g BSA. Danach erfolgte die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde bei 65 °C für ca. 16 h. Die Nylonmembran wurde danach mit 2×SSC/0.1 % (v/v) SDS bzw. 1×SSC/0.1 % (v/v) SDS für 20 min bei 65 °C gewaschen. Anschließend wurde die Membran autoradiographisch analysiert (Imagerplatten Typ BAS 2040 S). Die Expositionszeiten betragen 12 h. Die Auswertung wurde mit einem FUJI BAS Imager und mit dem Softwareprogramm TINA (Raytest) durchgeführt. Zur quantitativen Auswertung der Signale wurde zuerst die Hintergrundintensität abgezogen. Um die Variationen beim Auftragen der Proben zu korrigieren, wurden die Signalintensitäten des jeweiligen Gens auf die Signalintensität von *EF1 $\alpha$*  bezogen. Die relative Transkriptmenge wurde graphisch als Prozent der maximalen Intensität des jeweiligen Gens dargestellt.

### 2.8.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Zur qRT-PCR Analyse wurde die DNase I behandelte Gesamt-RNA zuerst über Probe-Quant™ G-50 Micro Columns gereinigt. Danach wurde cDNA synthetisiert, die als *Template* für die PCR eingesetzt wurde. Als Kontrollen wurden PCR-Ansätze mit sterilem H<sub>2</sub>O und DNase behandelten mRNA-Proben mitgeführt. Die Größe der PCR-Produkte (Basenpaare, bp) wurde durch Analyse der Reaktion auf einem 2 %-igen Agarosegel geprüft. Zusätzlich wurde die Spezifität der PCR-Produkte durch die Schmelzkurven charakterisiert.

### 2.8.3.1 DNase I Verdau

RNA für die qRT-PCR Analyse wurde mit Deoxyribonuclease I (DNase I) versetzt. Zur Behandlung der Gesamt-RNA mit DNase I wurde ein 50 µL-Ansatz verwendet: 10 µg Gesamt-RNA; 1×Reaktionspuffer; 1 U/µL Ribonukleaseinhibitor; 0.1 U/µL DNase I. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung der DNase I durch Zugabe von 5 µL 25 mM EDTA und eine Inkubation bei 65 °C für 10 min.

### 2.8.3.2 Reverse Transkription

Zur cDNA-Synthese kam der First Strand cDNA Synthesis Kit zum Einsatz. Die Synthese erfolgte laut Herstellerangaben. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 2-3 aufgeführt. Das cDNA-*Template* wurde 1:50 verdünnt und in der qRT-PCR eingesetzt.

**Tabelle 2-3:** Reaktionsansatz zur cDNA Synthese.

Reagenz	Menge
DNA-freie Gesamt-RNA	2 µg
Oligo-dT18-Primer (0.5 µg/ µL)	1 µL
Deionisiertes H <sub>2</sub> O	auf 11 µL
5 min Inkubation bei 70 °C	
5x Reaktionspuffer	4 µL
Ribonukleaseinhibitor (20 U/ µL)	1 µL
dNTPs (10 mM)	2 µL
5 min Inkubation bei 37 °C	
M-MLV Reverse Transkriptase (20 U/ µL)	2 µL
1 h Inkubation bei 37 °C	
Inaktivierung durch Inkubation bei 70 °C für 10 min	

### 2.8.3.3 Real-Time PCR

Real-Time PCR wurde im 20 µL Maßstab durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte in iCycler iQ RealTime PCR Detection System unter der Verwendung von iQ™ SYBR® Green Supermix. Der Reaktionsansatz und das PCR Programm sind in Tabelle 2-4 bzw. Tabelle 2-5 aufgeführt. Um die Spezifität und die Effizienz der PCR zu erhöhen, wurde die Annealing-Temperatur für jedes untersuchte Gen optimiert. Die Sequenzspezifischen Primer sind in Kapitel 2.8.3.4 aufgeführt.

**Tabelle 2-4:** Reaktionsansatz für Real Time PCR.

Reagenz	Menge
iQ <sup>TM</sup> SYBR <sup>®</sup> Green Supermix	10 µL
Vorwärts-Primer (1 µM)	2 µL
Rückwärts-Primer (1 µM)	2 µL
Steriles H <sub>2</sub> O	5 µL
cDNA (1:50 Verdünnung)	1 µL

**Tabelle 2-5:** Amplifikationsbedingungen der Real-Time PCR. Die Anealing-Temperatur (X °C) wurde für jedes Gen spezifisch optimiert (vgl. Kapitel 2.8.3.4).

Schritt	Dauer	Temperatur
1. Initiale Denaturierung/Hot-Start-Taq (1x)	5 min	95 °C
2. Amplifikation (40x)		
2.1 Denaturierung	20 sec	95 °C
2.2 Anealing	20 sec	X °C
2.3 Elongation	20 sec	72 °C
3. Stop	∞	4 °C

### 2.8.3.4 Quantitative Auswertung

Zur Auswertung der Genexpressionsergebnisse wurde das  $\Delta\Delta C_t$ -Modell angewandt. Bei diesem Berechnungsmodell wird die Transkriptmenge des Zielgens ( $C_{t,Zielgen}$ ) auf die Transkriptmenge des Referenzgens ( $C_{t,Refgen}$ ) bezogen. So erhält man den  $\Delta C_t$ -Wert. Der relative Expressionsunterschied (x-fache Expression,  $\Delta\Delta C_t$ -Wert) wurde berechnet, indem die  $\Delta C_t$ -Werte eines Gens in einer Probe und einer Kontrollprobe ins Verhältnis gesetzt wurden. Um die x-fachen Expressionslevel (Über- oder Unterexpression) darzustellen, wurden die Ergebnisse graphisch auf einer logarithmischen Skala abgebildet. Dabei zeigt ein Verhältniswert über 1 eine höhere und ein Verhältniswert unter 1 eine niedrigere Transkription im Vergleich zur Kontrollprobe.

Die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode setzt eine Verdopplung des *Templates* in jedem Zyklus voraus, d.h. man geht von einem idealisierten PCR-Effizienz ( $E=2$ ) in allen Proben aus. Große Schwankungen in der PCR-Effizienzen könnten darum zu enormen Unterschieden in den Expressionslevels führen. Die Ermittlung der PCR-Effizienzen der Zielgene und der entsprechenden Referenzgene ergab jedoch sehr geringe Schwankungen der Werte (vgl. Kapitel 2.8.4), sodass die Effizienzunterschiede vernachlässigt werden konnten.

Falls nicht anders vermerkt, wurde zur relativen Quantifizierung der Expressionsergebnisse Ubiquitin (*Ubi*) als nicht reguliertes „housekeeping Gen“ (HKG, Referenzgen) verwendet.

## 2.8.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion International GmbH synthetisiert. Die Tabelle unten fasst die Oligonukleotidsequenzen, die Produktgröße und die Datenbankzugangsnummer der entsprechenden Gene zusammen. Um eine fehlerhafte Auswertung der relativen Expressionsunterschiede auszuschließen, wurden zusätzlich die PCR-Effizienzen der einzelnen Primerpaare ermittelt. Die Bestimmung der PCR-Effizienzen wies keine großen Schwankungen auf. Die PCR-Effizienzen sind ebenfalls in der Tabelle unten aufgelistet. In den Oligonamen steht „f“ für Vorwärts- und „r“ für Rückwärts-Primer.

**Tabelle 2-6:** Zusammenfassung von verwendeten Sequenz-spezifischen Primern zur Durchführung von PCR und RT-PCR.

Oligo	Oligonukleotidsequenzen * : 5'→3'	Produkt bp	Annealing-Temp.	PCR-Effizienz	Acc. Nummer
UBI, f	GGTTAAGCT CGCTGTGTTGCAG	159	62 °C	75.1 %	X58253 <i>S.lycopersicum</i>
UBI, r	AAACGTAGGTGAGCCCACAC				
PIN2, f	GGATGTACCACGTGTTGCAC	111	62 °C	72.1 %	K03291 <i>S.lycopersicum</i>
PIN2, r	ACAGGGTACATATTTGCCTTGG				
RNLX, f	ATGGCACTTGTTTCAGCTCTTAACC	152	62 °C	80.3 %	X79338 <i>S.lycopersicum</i>
RNLX, r	TGCACTCTATAAATGGTGTGT GTCC				
RNLE, f	CCAAACAGTCCTTATGACCAATCTC	190	62 °C	71.3 %	X79337 <i>S.lycopersicum</i>
RNLE, r	TGAGAACGGATTCAGCACAAGTG				
Actin, f <sup>**</sup>	CATCACTTGTTGGAATGGAAG	230	58 °C	-	AB158612 <i>N. tabacum</i>
Actin, r <sup>**</sup>	CCAGACACTGTACTTGCCTTC				
NtPT1, f <sup>**</sup>	TGATGCCGGTTACCCTGCTGG	169	58 °C	-	AB042950 <i>N. tabacum</i>
NtPT1, r <sup>**</sup>	CATTTCTGTTCACCTTCTCCTC				
NtPT2, f <sup>**</sup>	ACGGGTTCTCTACGCTGCA	140	62 °C	-	AB042951 <i>N. tabacum</i>
NtPT2, r <sup>**</sup>	CCTTTGGACTCTGGCACTCA				
LePT2, f <sup>***</sup>	GGCATTATGGCTGTGGGGGATAATG	1650	62 °C	-	AF022874 <i>S.lycopersicum</i>
LePT2, r <sup>***</sup>	CTCATGCTTCTCCAGTTATAGTTTC				
EF1 $\alpha$ , f <sup>***</sup>	CACATCAGCATTTGGTTCATTTGGTC	650	62 °C	-	X14449 <i>S.lycopersicum</i>
EF1 $\alpha$ , r <sup>***</sup>	CGTTAATCTGGTCAAGAGCCTCAAG				

\*Die Primer-Sequenzen und die Annealing-Temperatur wurden mit Hilfe folgender Software-Programme analysiert:

Oligonucleotide Properties Calculator: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

FastPCR: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/history.htm>

\*\*Die PCR-Effizienz der Primer wurde nicht bestimmt.

\*\*\*Die Primer-Sequenzen lagen zu Beginn der Arbeit vor und wurden zur Herstellung von PCR-amplifizierten cDNA-Sonden für Northern-Analyse benutzt.

## 2.9 NMR-Spektroskopie

### 2.9.1 *In vivo* $^{31}\text{P}$ -NMR

Alle *in vivo* NMR-Experimente wurden in Kooperation mit Dr. Cor Dijkema und Dr. Pieter de Waard am WNMRC der Universität Wageningen in Wageningen, Niederlande durchgeführt.

#### 2.9.1.1 NMR-Messparameter

*In vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren wurden an einem Bruker AV-300 Spektrometer mit einer Messfrequenz von 121.5 MHz aufgenommen. Das Spektrometer wurde mit einem 20 mm  $^{31}\text{P}/^{13}\text{C}$  Probenkopf ausgerüstet. Die Erfassungszeit jedes Spektrums betrug 60 min und entsprach 6700 Scans. Alle Messungen wurden ohne  $^{31}\text{P}$ - $^1\text{H}$  Entkopplung durchgeführt. Die NMR-Spektren wurden mit einer Spektrallinienbreite von 10 Hz ausgewertet. Die Auswertung und die Integration der Signale erfolgten mit Hilfe der TopSpin Software (Bruker). Als Referenzverbindung und als externer Standard diente Methylendiphosphonat (MDP). MDP hatte eine chemische Verschiebung von 16.92 ppm bezüglich 85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0 ppm).

Die NMR-Signale wurden nach Literaturdaten zugeordnet (Roberts & Jardetzky, 1981, Kime *et al.*, 1982, Aubert *et al.*, 1996). Zusätzlich wurden Referenzspektren von Pi und Phi bei verschiedenen pH-Werten vermessen. Die pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von Pi ist im Anhang Kapitel 0 dargestellt. Die pH-sensitive chemische Verschiebung der Pi- und Phi-Signale konnte durch einen Vergleich mit diesen Referenzspektren exakt zugeordnet werden.

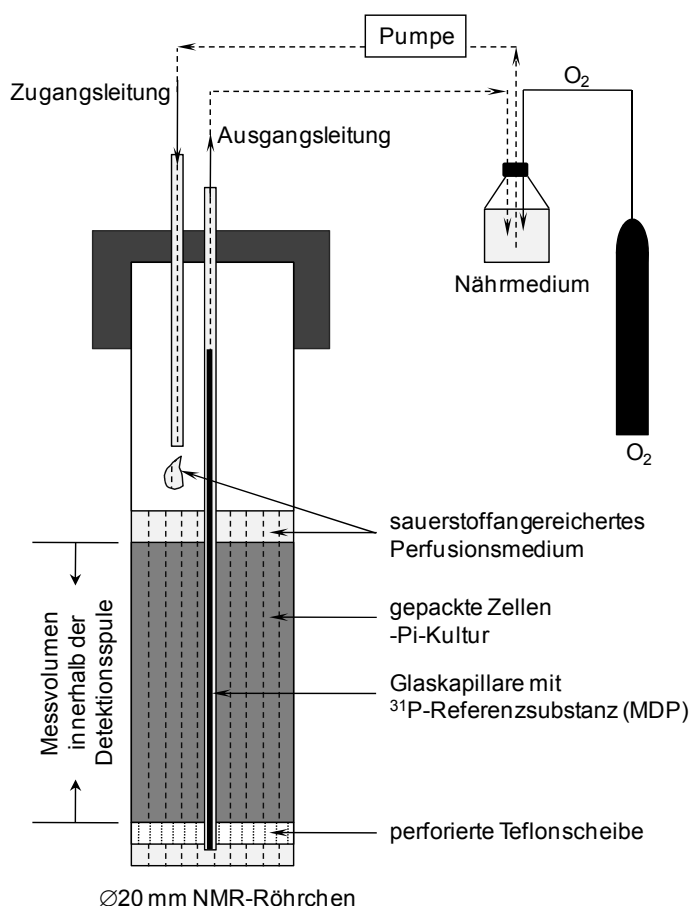
#### 2.9.1.2 Perfusionssystem

Es wurde eine Perfusionsausrüstung nach Roby *et al.* (1987a) benutzt. Eine schematische Darstellung des Perfusionssystems ist in Abbildung 2-5 gezeigt. Unmittelbar vor der NMR-Analyse wurden Tabakzellen entweder in Pi-haltigem oder in Pi-freiem Medium für 24 h kultiviert um +Pi bzw. -Pi-Zellen herzustellen. Durch Waschen und Zentrifugieren wurden die Zellen in einem NMR-Röhrchen mit einem Durchmesser von  $\varnothing 20$  mm dicht gepackt. Das gepackte Zellvolumen entsprach ca. 15 mL. Auf dem Boden des Röhrchens befand sich eine perforierte Teflonscheibe, welche die Zellaggregate zurückhielt, aber das Medium ungehindert durchfließen ließ.



Das NMR-Röhrchen besaß Glasrohrleitungen für Zufluß und Abfluß des sauerstoffangereicherten Mediums. Das Medium wurde mit einer peristaltischen Pumpe mit einer Geschwindigkeit von 16 mL/min durch die Zellpackung gepumpt. Die Temperatur des Mediums und der Probe wurde bei 25 °C gehalten. Der pH des Mediums wurde auf pH 6.6 eingestellt. Die Zusammensetzung des Mediums beruhte auf MS-Medium, wobei, abweichend von der Rezeptur, kein  $\text{MnSO}_4$  und  $\text{FeSO}_4$  zugefügt wurden (Murashige *et al.*, 1962). Mangan- und Eisenionen besitzen paramagnetische Eigenschaften, die zur Verbreiterung der NMR-Signale führen.

In der Ausgangsleitung befand sich eine geschlossene Glaskapillare mit der Referenzsubstanz MDP. Grundsätzlich wurde in allen Experimenten –Pi-Medium verwendet. Für die Versuche mit Pi und/oder Phi wurde  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - und  $\text{KH}_2\text{PO}_3$ -Lösung (pH 6.6) zu einer Endkonzentration von jeweils 1 mM zugegeben.



**Abbildung 2-5:** Schematische Darstellung des Perfusionssystems für *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR Messungen. Der Umlauf des Mediums ermöglichte eine gleichmäßige Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der gepackten Zellen. Gleichzeitig erlaubten die große Zellmasse und die hohe Zelldichte eine gute Identifikation der detektierbaren Metaboliten.

### 2.9.2 *In vitro* $^{31}\text{P}$ -NMR

Neben *in vivo* NMR-Experimenten wurden auch NMR-Messungen an Extrakten von Pflanzenteilen durchgeführt. In diesen Experimenten wurden Wildtyppflanzen sowie *pho1*-

und *pho2*-Mutanten von *A. thaliana* eingesetzt. Die Mutanten wurden freundlicherweise von Prof. Steffen Abel (University of California) zur Verfügung gestellt. Die NMR-Messungen wurden in einer Kooperation mit Dr. Beate Fuchs (Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Leipzig) durchgeführt.

### **2.9.2.1 Perchlorsäureextrakte**

Gefrorene Blattproben wurden gemörsert, gefriergetrocknet und mit 35 % (v/v)  $\text{H}_3\text{ClO}_4$  extrahiert. Zusätzlich wurden die Proben mit Ultraschall (3 x 30 sec, 40 W, Mikrospitze, Ultraschall-Desintegrator Sonoplus) behandelt. Die Extrakte wurden mit 2.5 mM  $\text{KHCO}_3$  neutralisiert, gefriergetrocknet und anschließend in 0.5 mL 100 mM TRIS/HCl Puffer aufgenommen (pH 6.5).

### **2.9.2.2 NMR-Messungen**

$^{31}\text{P}$ -NMR Spektren wurden an einem Bruker DRX-600 Spektrometer mit einer Messfrequenz von 242.88 MHz in 5 mm NMR-Röhrchen aufgenommen. Als Locksignal wurde  $\text{D}_2\text{O}$  benutzt. Alle Messungen wurden bei 30 °C mit einer Walz-16  $^1\text{H}$  Entkopplung durchgeführt. Weitere Messparameter waren: Erfassungszeit: 1 sec, Datengröße: 8-16k, 90 ° Puls (10  $\mu\text{s}$ ), Pulsverzögerung: 2 sec, Spektrallinienbreite: 1 Hz. Als Referenz und externer Standard wurde MDP benutzt (16.92 ppm). Die Zuordnung der Pi- bzw. Phi-Signale wurde durch einen Vergleich mit den Spektren von Pi- und Phi-Standardlösungen durchgeführt.

## **2.10 Transportversuche**

Die Aufnahmekinetik von Pi und Phi in Zellen und Vakuolen wurde durch Transportversuche mit radioaktiv markiertem Pi untersucht.

### **2.10.1 Transportversuche mit Zellsuspensionskulturen**

Die Kinetikstudien wurden mit  $-\text{Pi}$ - bzw.  $+\text{Pi}$ -Kulturen der Tomaten- und Tabakzellen durchgeführt. Die Transportversuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der pH-Wert des Aufnahmemediums wurde auf 5.8 eingestellt. Bei diesem Wert dominiert die monovalente Form des Phosphats ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), die am besten von den Pflanzen assimiliert wird (Ullrich-Eberius *et al.*, 1984).

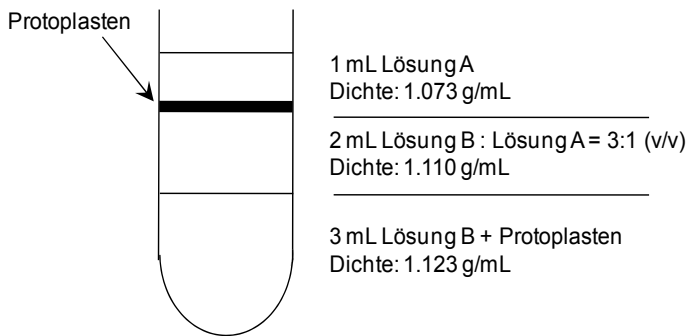
Für die zeitabhängige Pi-Aufnahme wurde zu jeder Probe 0.1  $\mu\text{Ci}$  (3.7 KBq) radioaktiv markierte Phosphorsäure  $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$  zugegeben und nach bestimmten Zeitintervallen die aufgenommene Radioaktivität gemessen. Die konzentrationsabhängige Pi-Aufnahme wurde in der Gegenwart von 0.1  $\mu\text{Ci}$   $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$  und bei steigenden Konzentrationen von extrazellulärem Pi durchgeführt. Unter ständigem Schütteln und nach einem Zeitraum von 1 min wurde das Aufnahmemedium durch Vakuumfiltration entfernt. Um eine unspezifische Adsorption des radioaktiven Pi zu entfernen, wurden die Zellen mit einer eiskalten 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gewaschen. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte durch Cherenkov-Messung in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (TriCarb-2100 TR).

## 2.10.2 Transportversuche mit intakten Vakuolen

Vakuolen wurden aus 4 Tage alten Suspensionskulturen der Tomate hergestellt. Die Präparation erfolgte sowohl aus  $-\text{Pi}$ - als auch aus  $+\text{Pi}$ -Zellen. Vakuolen wurden durch alkalische EDTA-Lyse von Protoplasten und Reinigung durch eine Zentrifugation im diskontinuierlichen Dichtegradienten gewonnen. Die Transportversuche wurden unter der Anwendung von Siliconöl-Filtrationszentrifugation durchgeführt (Martinoia *et al.*, 1985, Rentsch & Martinoia, 1991).

### 2.10.2.1 Isolierung und Reinigung von Protoplasten

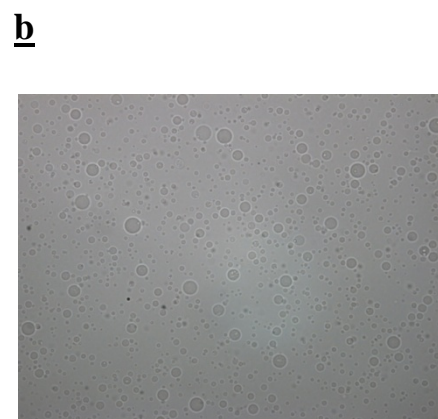
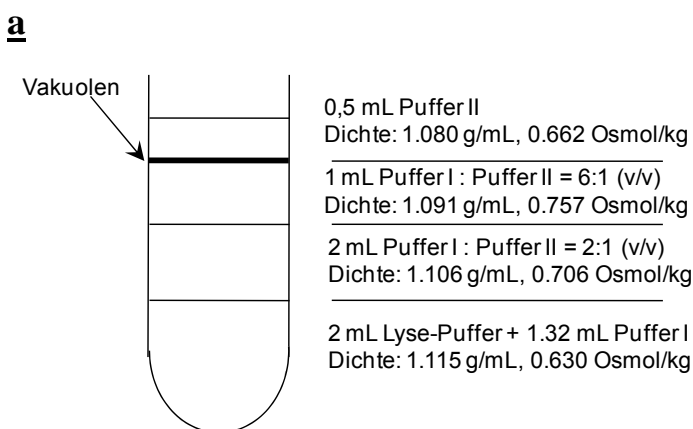
Protoplasten wurden nach Tewes *et al.* (1984) gewonnen. Die Zellen wurden durch Absaugen auf Filterpapier (0.5 g FG) geerntet und in 12 mL Cellulase-Medium (0.5 M Sorbitol, 1 % (w/v) Driselase und 0.01 % (w/v) HUPc-Cellulase in CPW-Medium) aufgenommen. Das CPW-Medium wurde nach Frearson *et al.* (1973) hergestellt. Die Zusammensetzung des CPW-Mediums ist im Anhang aufgeführt (vgl. Kapitel 7.3, Tabelle 2-1). Für die Protoplastierung von  $+\text{Pi}$ -Zellen enthielt das CPW-Medium 2.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  analog dem Kulturmedium. Beim Zellwandverdau von  $-\text{Pi}$ -Zellen wurde auf das Phosphat verzichtet. Die Zellen wurden im Dunkeln für 12 h bei 23 °C und 75 rpm inkubiert. Die Protoplasten wurden mit Lösung A (CPW-Medium mit 0.4 M Sorbitol) gewaschen. Zelltrümmer wurden durch Flotation der Protoplasten in diskontinuierlichen Dichtegradienten, die aus Lösung A und Lösung B (CPW-Medium mit 0.4 M Sorbitol und 5 % Ficoll 400) zusammengesetzt wurden, entfernt. Die Mengen und die Mischungsverhältnisse sind in Abbildung 2-6 dargestellt. Die Protoplasten wurden von der ersten Interphase entnommen und mit MES-Vakuolen-Puffer (5 mM MES/TRIS-Puffer, pH 6.0, 0.4 M Sorbitol) gewaschen.



**Abbildung 2-6:** Diskontinuierlicher Dichtegradient zur Protoplastenreinigung.

### 2.10.2.2 Isolierung und Reinigung von Vakuolen

Der Zellaufschluss zur Vakuolengewinnung erfolgte durch eine isotonisch-alkalische Lyse mit EDTA (Glund *et al.*, 1984). Die gereinigten Protoplasten wurden in 1 mL Lyse-Puffer (20 mM HEPES, 30 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4 M Sorbitol, 20 mM EDTA, pH 8.0) aufgenommen und für 15 min unter starkem Schütteln bei Raumtemperatur lysiert. Die Reinigung der Vakuolen erfolgte in einem diskontinuierlichen Gradienten, der aus verschiedenen Mischungen der Puffer I (20 mM HEPES, 30 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4 M Sorbit, 7 % (w/v) Ficoll 400, pH 7.2) und Puffer II (Puffer I ohne Ficoll 400) geschichtet wurde. Die Puffermenge und die Pufferverhältnisse sind in Abbildung 2-7 dargestellt. Die Flotation der Vakuolen erfolgte durch eine Zentrifugation bei 4 °C und 1500 g für 20 min ohne Bremse (Beckman GS-15R, Ausschwingrotor). Die Vakuolenfraktion wurde von der obersten Interphase abgenommen. Anschließend wurden die Aktivitäten von Markerenzymen (vgl. Kapitel 2.5.4) der verschiedenen Zellkompartimente bestimmt, um Reinheit und Ausbeute der Vakuolen zu ermitteln.

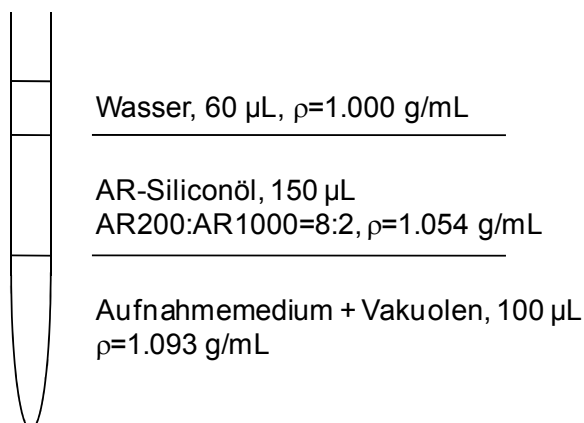


**Abbildung 2-7:** Isolierung und Reinigung von Vakuolen aus Tomatenzellkultur. **a:** Diskontinuierlicher Dichtegradient zur Vakuolenisolierung. **b:** Vakuolensuspension nach der Flotation in Dichtegradienten.

### 2.10.2.3 Aufnahmestudien und Siliconöl-Filtrationszentrifugation

Für Kinetikstudien mit intakten Vakuolen wurde die Siliconöl-Filtrationszentrifugation verwendet. Dazu wurden jeweils 70  $\mu\text{L}$  des Aufnahmemediums in 400  $\mu\text{L}$  Polypropylen-Röhrchen aliquotiert. Das Aufnahmemedium war aus 25 % (v/v) Percoll, 20 mM HEPES, 30 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.4 M Sorbitol, pH 7.2, 0.12 % (w/v) BSA, 1 mM DTT, 0.1  $\mu\text{Ci}$  (3.7 kBq)  $[\text{}^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ , 0.1  $\mu\text{Ci}$  (3.7 kBq)  $[\text{}^{33}\text{P}]\text{H}_2\text{PO}_4$  und 100  $\mu\text{M}$  unmarkiertem Pi zusammengesetzt. Der Transport wurde durch die Zugabe von ATP bzw. PPi aktiviert. Dazu wurden  $\text{MgCl}_2$  und ATP (PPi) in Konzentrationen von 6 mM bzw. 1.5 mM zugesetzt. Zur Kontrolle wurden Transportstudien ohne ATP bzw. PPi mit 1 mM  $\text{MgCl}_2$  durchgeführt. Je Versuchsbedingung wurden 6 Replikate durchgeführt.

Der Transportversuch wurde durch die Zugabe von 30  $\mu\text{L}$  konzentrierter Vakuolensuspension gestartet. Das Aufnahmemedium wurde schnell mit 150  $\mu\text{L}$  Siliconöl (AR200:AR1000=8:2) und danach 60  $\mu\text{L}$  Wasser überschichtet. Die Dichtegradienten sind schematisch in Abbildung 2-8 gezeigt. Die Inkubation wurde nach einer definierten Zeit durch Zentrifugation bei 10000 g für 15 s beendet (Microfuge 12, Horizontalrotor). Dabei flotierten die Vakuolen durch die Siliconölschicht in die oberste wässrige Phase. Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden 50  $\mu\text{L}$  der wässrigen Phase entnommen und mit 2 mL Szintillationscocktail (Rotiszint® eco) vermischt. Die Radiaktivität wurde unter der Verwendung eines  $^1\text{H}$ - $^{33}\text{P}$  Programms für doppelt-radioaktive Markierung im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (TriCarb-2100 TR) gemessen. So konnte gleichzeitig die Menge an  $[\text{}^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$  (als interne Referenz) und  $[\text{}^{33}\text{P}]\text{H}_2\text{PO}_3$  bestimmt werden.



**Abbildung 2-8:** Dichtegradienten zu Transportstudien mit intakten Vakuolen. Das Transportexperiment wurde durch Zentrifugation des Reaktionsgefäßes beendet. Die Zentrifugation fand in einer Beckman-Zentrifuge mit horizontalem Rotor statt.

### 2.10.3 Berechnung kinetischer Parameter

Die kinetischen Parameter ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $IC_{50}$ ,  $K_i$ ) wurden mit Standardmethoden (Michaelis-Menten-Kinetik, Hill-Kinetik, Eadie-Hofstee Linearisierung, Dixon-Diagramm) aus den erhaltenen Daten berechnet. Die Rechenschritte sind im Anhang Kapitel 7.5 aufgeführt.

Die Regressionsanpassungen und die statistische Analyse wurden unter der Verwendung von SigmaPlot Software ausgeführt. Die durch die Regressionsanpassungen ermittelten kinetischen Parameter sind als Wert  $\pm$  SE angegeben. Die Messwerte in den graphischen Darstellungen, soweit nicht anders vermerkt, repräsentieren den Median, Maximum und Minimum einer Dreifachbestimmung.

### 2.11 Statistik

Zur statistischen Bewertung der experimentellen Ergebnisse wurde der t-Test nach Student eingesetzt, sofern Daten von mehr als 6 Replikaten vorlagen.

Die meisten Experimente wurden allerdings mit weniger Replikaten, meistens in Triplikaten, durchgeführt. Bei Triplikaten ist eine statistisch-rechnerische Bewertung der Messwerte nicht sinnvoll. Um die Daten aber möglichst exakt abzubilden, wurden in Diagrammen in der Regel Median, Maximum und Minimum abgebildet. Bei Triplikaten ist so jeder Messwert erkennbar und aus der graphischen Darstellung kann die Signifikanz eines Ergebnisses abgeschätzt werden.

Fast alle Experimente wurden mindestens einmal wiederholt, um das Ergebnis zu verifizieren. In diesen Fällen wurden in der Regel Daten eines repräsentativen Experimentes (vgl. Abbildungsbeschriftungen) gezeigt.

## 3 Ergebnisse

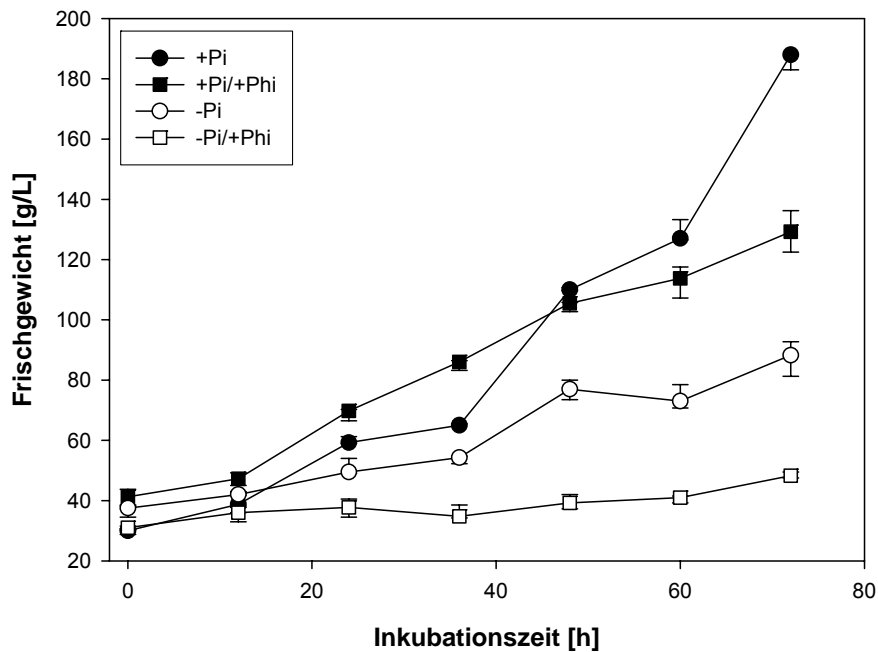
### 3.1 *Physiologische Anpassungen an Pi-Mangel unter dem Einfluss von Phi*

#### 3.1.1 Wachstum und Morphologie

Suboptimale Pi-Versorgung führt zu Anpassungsreaktionen auf physiologisch-biochemischer und transkriptioneller Ebene in den Pflanzen. Um Erkenntnisse über die Beeinflussung der morphologischen Adaptionen an Pi-Mangel durch Phi zu gewinnen, wurde die Pflanzenentwicklung anhand ausgewählter Wachstumsparameter bei Phosphatmangelstress und unter dem Einfluss von Phi untersucht.

##### 3.1.1.1 Wachstum von Zellkulturen

Die Wirkung von Phi auf das Wachstum pflanzlicher Zellen wurde in Tomatenzellkulturen untersucht. Dazu wurden Tomatenzellen aus der stationären Wachstumsphase in Wachstumsmedium mit und ohne Pi und Phi überführt (Abbildung 3-1). Am dritten Kulturtag (72 h) war das Zellwachstum im –Pi-Medium im Vergleich zu +Pi-Wachstumsbedingungen um 68 % verringert. Die –Pi/+Phi-Zellen zeigten eine noch stärkere Wachstumsreduzierung, nämlich 89 % weniger Frischgewicht im Vergleich zu +Pi-Bedingungen. Bei ausreichender Pi-Versorgung übte die Zugabe von Phi bis zum zweiten Kulturtag noch keine Wirkung auf das Zellwachstum aus. Im weiteren Wachstumsverlauf zeigten die Zellen eine 44 %-ige Wachstumsreduzierung im Vergleich zu der +Pi-Kultur. Die Hemmung im späteren Kulturverlauf trat ein, als Pi vermutlich weitgehend aufgebraucht war. In einem vergleichbaren Experiment konnte belegt werden, dass nach 48 h kein Pi im Medium mehr nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 3-8a). Möglicherweise trat die Wachstumshemmung erst in dieser Phase auf, weil die Pi-Mangelantwort der Zellen durch Phi negativ beeinflusst wurde.

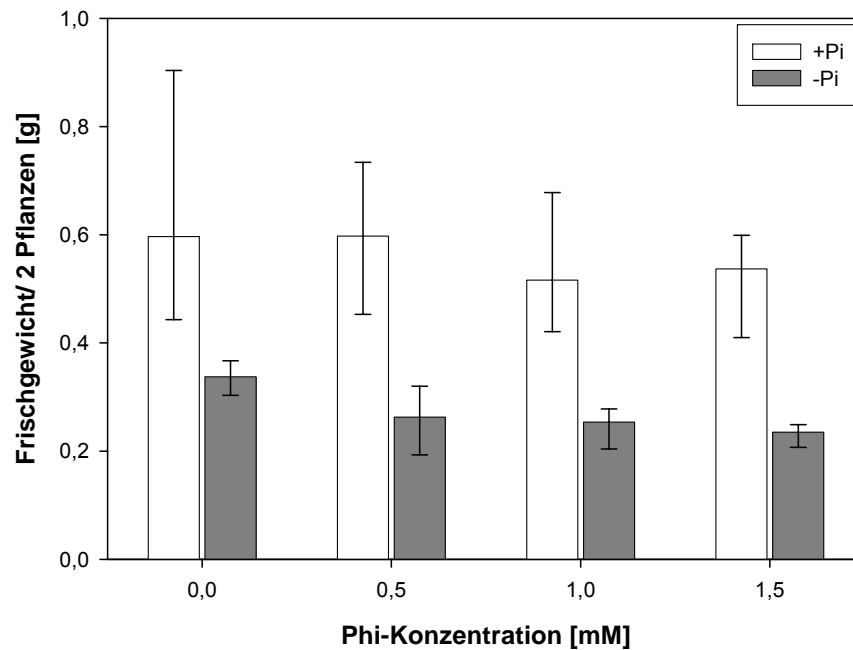


**Abbildung 3-1:** In der Abwesenheit von Pi bewirkte Phi eine deutliche Reduzierung des Zellwachstums. Tomatenzellen wurden in +Pi-, -Pi-, +Pi/+Phi- und -Pi/+Phi-Kulturmedien kultiviert. Die Ausgangsdichte ( $OD_{600}$ ) der Zellsuspension entsprach 0.35 für alle Kultivierungsbedingungen. In der Gegenwart von Pi wurde das Zellwachstum erst nach 48 h gehemmt. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen ( $n=3$ ) in einem repräsentativen Experiment gezeigt.

### 3.1.1.2 Wachstum von hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen

Neben dem Einfluss von Phi auf Zellkulturen wurde die Entwicklung von Phi-behandelten Tomatenpflanzen anhand des Frischgewichtes analysiert. Das Frischgewicht der Tomatenpflanzen mit Pi-Mangel war 43 % geringer, als das Frischgewicht der +Pi-Pflanzen (Abbildung 3-2). Sowohl bei ausreichender Pi-Versorgung als auch bei Pi-Mangel führte Phi zu einer leichten Entwicklungshemmung. Unter Pi-Mangelbedingungen bewirkten schon 0.5 mM Phi eine Verringerung des Frischgewichtes um 22 % im Vergleich zur -Pi/-Phi-Kontrolle. Höhere Phi-Konzentrationen führen in diesem Experiment zu keiner weiteren Hemmung des Wachstums. Bei +Pi-Pflanzen wurde eine leichte Wachstumsreduzierung erst ab einer Phi-Konzentration von 1 mM festgestellt.





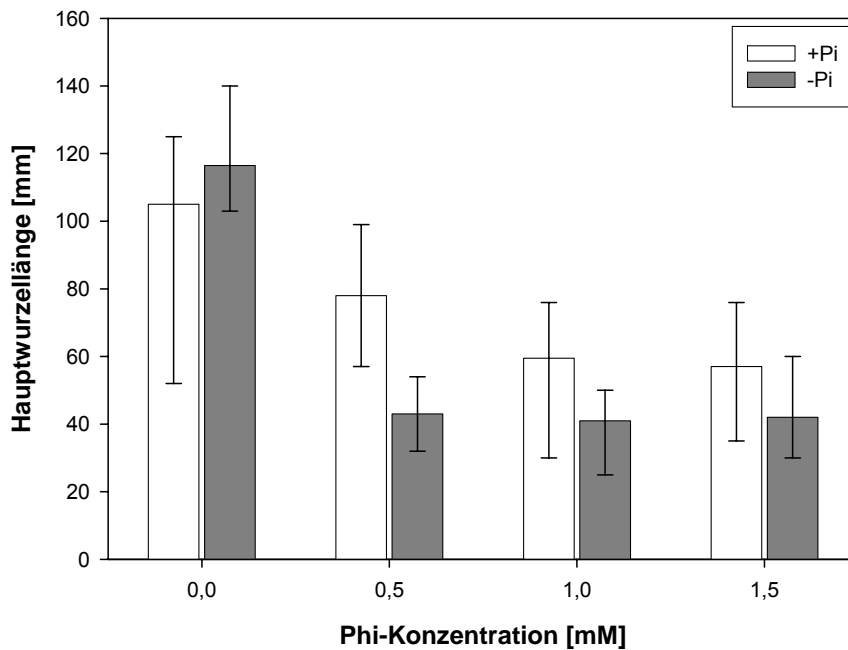
**Abbildung 3-2:** Phi bewirkt eine Reduzierung des Frischgewichtes von Tomatenpflanzen sowohl bei ausreichender als auch bei defizienter Pi-Versorgung. Tomatenpflanzen wurden als Hydrokultur in Medien mit und ohne Pi und mit den angegebenen Phi-Konzentrationen kultiviert. Nach 7 Tagen Wachstum wurde das Frischgewicht bestimmt. Es sind Median, Maximum und Minimum von zehn parallelen Messungen ( $n=10$ ) in einem repräsentativen Experiment dargestellt. Zur statistischen Bewertung durch t-Test wurden alle Versuche mit Phi ( $\pm$ Pi) jeweils mit der Kontrollbedingung ohne Phi verglichen. Außerdem wurden die Phi-freien Experimente mit und ohne Pi verglichen. Alle Unterschiede unter Pi-freien Bedingungen sind signifikant mit  $p<0.001$ . Bei den vollernährten Pflanzen bewirkt Phi eine signifikante Wachstumsreduzierung erst ab 1.0 mM ( $p<0.05$ ).

### 3.1.1.3 Hauptwurzellänge und Wurzel/Spross Verhältnis

Veränderungen der Morphologie des Wurzelsystems und ein erhöhtes Wurzel/Spross-Verhältnis sind charakteristische morphologische Anpassungen von Pflanzen an Pi-Mangel. Darum wurde der Einfluss von Phi auf das Wurzelwachstum und das Wurzel/Spross-Verhältnis von hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen näher betrachtet.

In Abbildung 3-3 ist das Ergebnis der Analyse des Hauptwurzelswachstums der Tomatenpflanzen dargestellt. Pi-Mangel führte zu erhöhtem Hauptwurzelswachstum. Bereits 0.5 mM Phi waren ausreichend, um die Verlängerung der Hauptwurzel zu hemmen und die Pi-Anpassung zu unterdrücken. Die Wurzellänge war 7 Tage nach Phi-Zugabe um 63 % kürzer als die Wurzellänge der Kontrollpflanzen ohne Phi. Die Anwendung höherer Phi-Konzentrationen führte zu keiner weiteren Reduktion des Wurzelwachstums.

Eine Inhibierung des Wurzelwachstums wurde auch bei Tomatenpflanzen festgestellt, die bei ausreichender Pi-Versorgung gewachsen waren. Hier war der Effekt jedoch geringer und setzte erst bei höheren Konzentrationen ein.

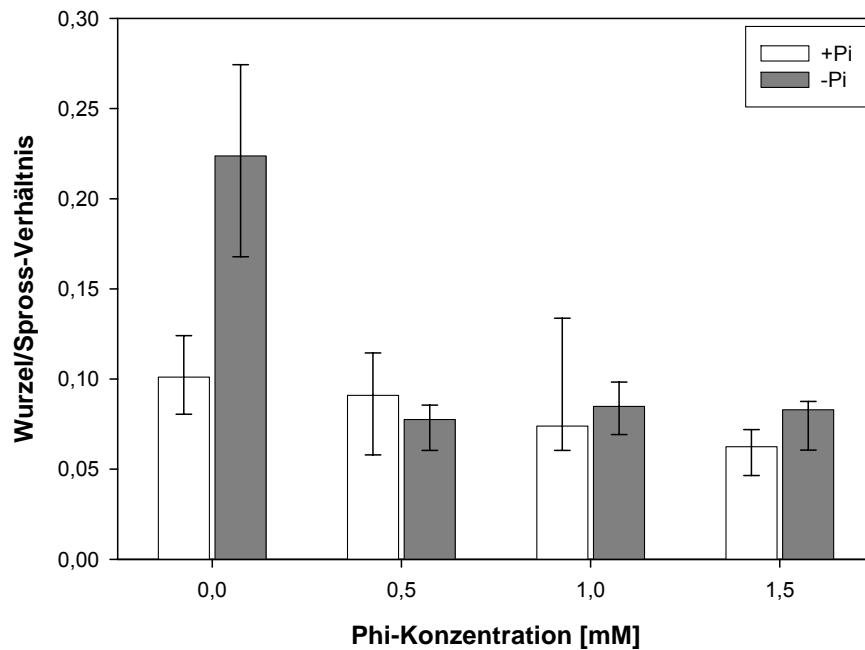


**Abbildung 3-3:** Phi hemmt das Wachstum der Hauptwurzel in Tomatenpflanzen. Die Hauptwurzellänge wurde an hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen nach 7 Tagen Wachstum bei ausreichender und limitierter Pi-Versorgung und bei den angegebenen Phi-Konzentrationen gemessen. Es sind Median, Maximum und Minimum von vierzig parallelen Messungen ( $n=40$ ) in einem repräsentativen Experiment dargestellt. Zur statistischen Bewertung durch t-Test wurden alle Versuche mit Phi ( $\pm$ Pi) jeweils mit der Kontrollbedingung ohne Phi verglichen. Außerdem wurden die Phi-freien Experimente mit und ohne Pi verglichen. Alle Unterschiede sind signifikant mit  $p<0.001$ .

Die spezifische Hemmwirkung von Phi auf die Entwicklung der Hauptwurzel zeigte sich am Wurzel/Spross-Verhältnis noch deutlicher. In Abbildung 3-4 ist zu erkennen, dass die verstärkte Entwicklung des Wurzelsystems unter Pi-Mangel in einem erhöhten Wurzel/Spross-Verhältnis resultierte. Die Zugabe von 0.5 mM Phi zu Pi-freiem Medium verhinderte diese Anpassung der Pflanzen an Pi-Mangel und verringerte das Wurzel/Spross-Verhältnis um 67 % im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Höhere Phi-Konzentrationen lieferten keine weiteren Unterschiede beim Wurzel/Spross-Verhältnis.

Eine leichte Abnahme des Wurzel/Spross-Verhältnisses zeigte sich auch bei Phi-behandelten Pflanzen, die mit Pi gewachsen waren.

Zusammengefasst belegen die Ergebnisse, dass Phi zu einer starken Hemmung der frühen Pflanzenentwicklung führt. Besonders betroffen war die Pflanzenentwicklung unter Pi-Mangelbedingungen, da die Verlängerung der Hauptwurzel hier durch Phi unterdrückt wurde. Dies belegt eine Interaktion von Phi mit den morphologischen Anpassungen der Pflanzen bei schlechter Pi-Versorgung.



**Abbildung 3-4:** Phi führte zu einer starken Reduktion des Wurzel/Spross-Verhältnisses in Tomatenpflanzen. Das Wurzel/Spross-Verhältnis wurde nach 7 Tagen Wachstum unter ausreichender und limitierter Pi-Versorgung und unter den angegebenen Phi-Konzentrationen analysiert. Es sind Median, Maximum und Minimum von zehn parallelen Messungen ( $n=10$ ) in einem repräsentativen Experiment dargestellt. Zur statistischen Bewertung durch t-Test wurden alle Versuche mit Phi ( $\pm$ Pi) jeweils mit der Kontrollbedingung ohne Phi verglichen. Außerdem wurden die Phi-freien Experimente mit und ohne Pi verglichen. Alle Unterschiede unter Pi-freien Bedingungen sind signifikant mit  $p<0.001$ . Bei den vollernährten Pflanzen bewirkt Phi eine signifikante Wachstumsreduzierung erst ab 1.0 mM ( $p<0.05$ ).

### 3.1.2 Sekundäre Pflanzenstoffe und Photosyntheseleistung

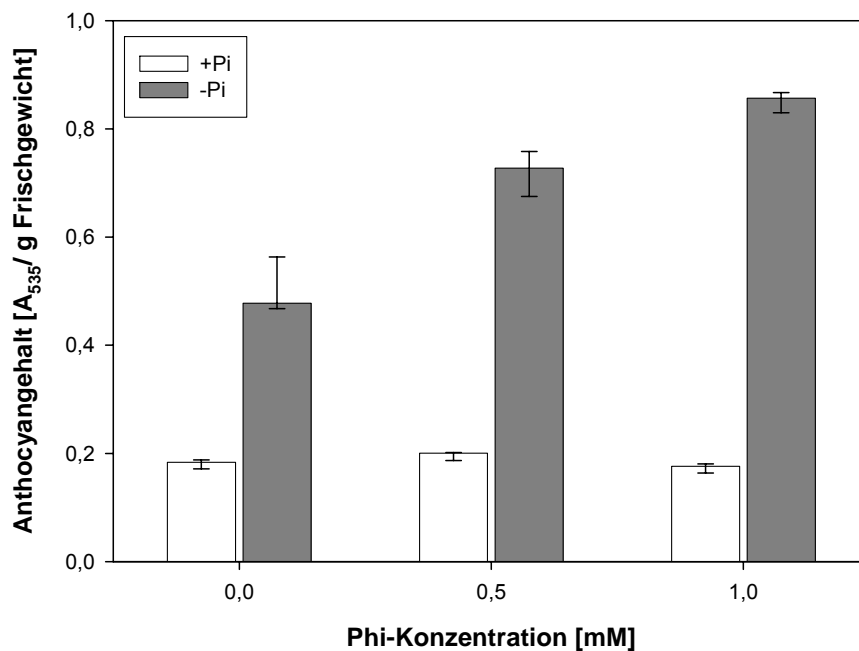
Die Akkumulation sekundärer Pflanzenstoffe dient als Abwehrreaktion nicht nur bei Starklicht, sondern ist auch ein Indikator für schlechte Wasser- und Nährstoffversorgung. Bei Stresseinflüssen, wie auch bei Pi-Mangel, kann aus den Anfangsreaktionen des Shikimatweges, welcher vom Erythrose-4-Phosphat und PEP ausgeht (vgl. Abbildung 1-3, Seite 18), freies Pi für den Grundstoffwechsel zurückgewonnen werden. Die Biosynthese der sekundären Pflanzenstoffe steht darum in engem Zusammenhang mit dem primären Stoffwechsel, wobei Pi eine essenzielle Rolle spielt.

Die Auswirkung von Phi auf die frühe Pflanzenwachstumsphase wurde hier anhand des Anthocyan- (Stressmarker), Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes und der Effizienz des Photosystems II (Vitalitätsmarker) untersucht.

### 3.1.2.1 Anthocyanakkumulation

Die Akkumulation von Anthocyanen ist bei Pi-Unterernährung eine charakteristische Stressreaktion vieler Pflanzen. Am Beispiel von Tomatenpflanzen konnte dies nachvollzogen werden. Tomatenkeimlinge mit Pi-Mangel besaßen einen dreifach höheren Anthocyangehalt im Vergleich zu vollernährten Pflanzen (Abbildung 3-5).

Bei Behandlung der Tomatenpflanzen mit 0,5, 1 und 1,5 mM Phi wurde keine signifikante Reduktion des Anthocyangehaltes in den Blättern festgestellt. Stattdessen stiegen die Anthocyanwerte im Vergleich zur Kontrollbedingung weiter an. Der maximale Anthocyangehalt wurde bei 1,0 mM Phi und gleichzeitigem Pi-Mangel beobachtet. Phi alleine hatte unter ausreichender Pi-Versorgung keinen Einfluss auf die Anthocyanakkumulation.



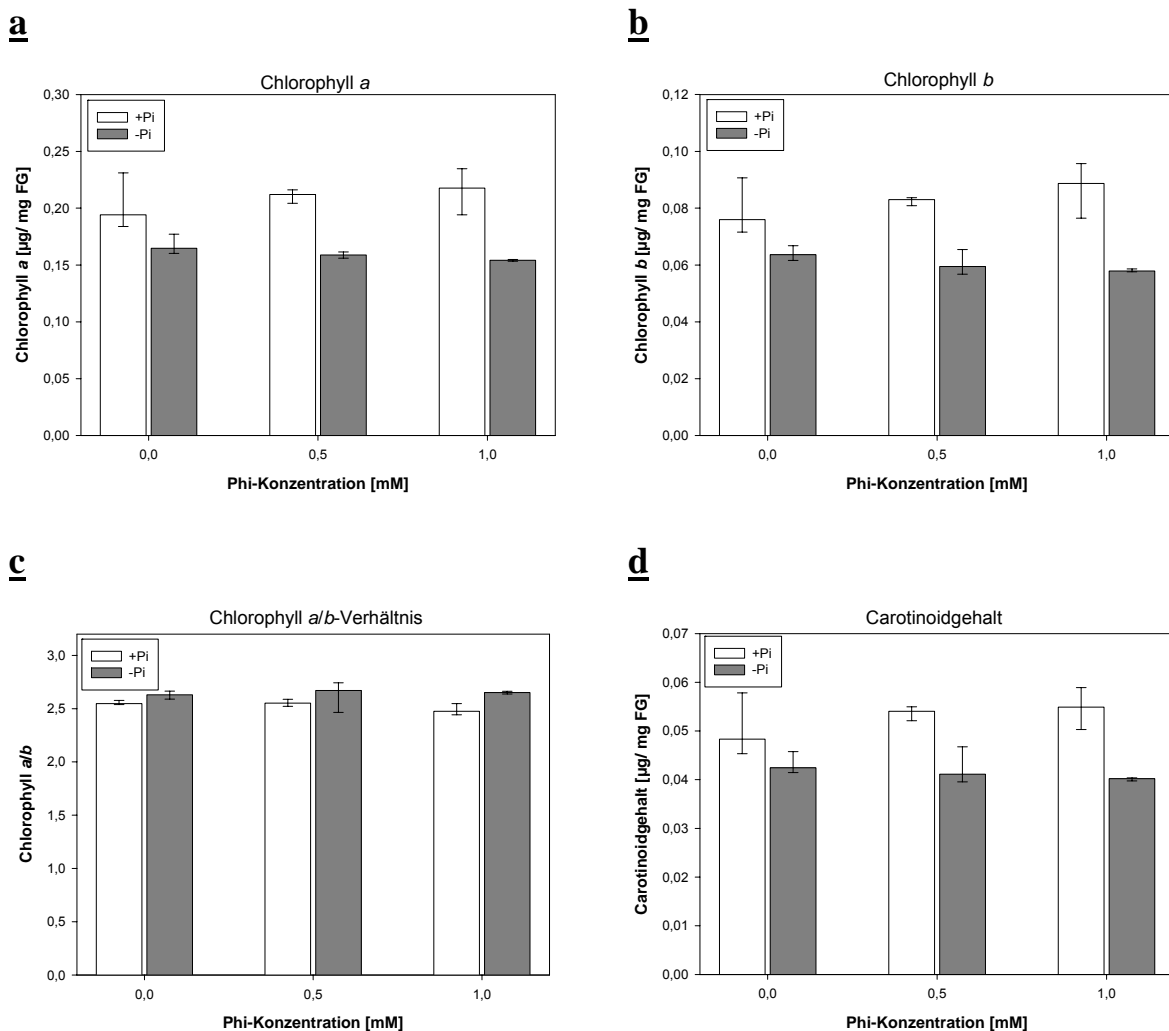
**Abbildung 3-5:** Die Anthocyanakkumulation wurde in Pi-verarmten Tomatenpflanzen durch Phi nicht beeinflusst. Die Tomatenpflanzen wurden für eine Woche als Hydrokultur auf Medium mit und ohne Pi kultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen für eine weitere Woche auf Medium mit und ohne Pi mit den angegebenen Phi-Konzentrationen kultiviert. Der Anthocyangehalt wurde wie unter Kapitel 2.5.2.2 beschrieben analysiert. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen ( $n=3$ ) in einem repräsentativen Experiment gezeigt.

### 3.1.2.2 Chlorophyllgehalt

Der Phi-Einfluss auf den Chlorophyll- und den Carotinoidgehalt wurde unter +Pi- und -Pi-Bedingungen in hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen analysiert. Nach 7 Tagen Wachstum wurden Chlorophyll und Carotinoide aus den Blättern der Tomatenpflanzen

extrahiert und anschließend spektrophotometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-6 dargestellt.

Die Pigmentanalyse zeigte, dass Pflanzen, die an Pi-Mangel litten, einen niedrigeren Blattchlorophyllgehalt hatten, als Pflanzen, die mit Pi gewachsen waren. Ein vergleichbares Ergebnis ergab sich auch für den Gehalt an Carotinoiden. Die Behandlung mit Phi führte innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs zu keiner Änderung des Chlorophyllgehaltes unter Pi-Mangelbedingungen. Eine Auswirkung von Phi auf den Gehalt an Carotinoiden war ebenfalls nicht erkennbar (Abbildung 3-6, graue Balken). Im Vergleich dazu konnte jedoch eine leichte Zunahme sowohl des Gehaltes an Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b* als auch des Carotinoidgehaltes in Blättern aus Pi-versorgten Pflanzen mit Pi bei 0.5 und 1.0 mM Phi festgestellt werden (Abbildung 3-6, weiße Balken).



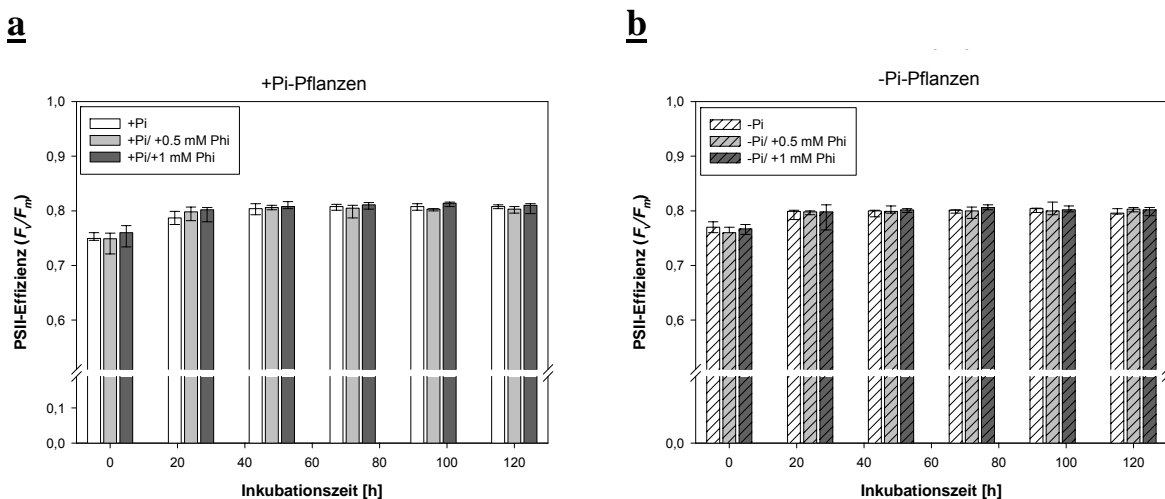
**Abbildung 3-6:** Auswirkung verschiedener Phi-Konzentrationen auf den Chlorophyll- und Carotinoidgehalt in Tomatenblättern. Die Tomatenpflanzen wurden für eine Woche als Hydrokultur auf Medium mit bzw. ohne Pi kultiviert. Danach wurden die Pflanzen für eine weitere Woche in Medium mit Phi umgesetzt. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen (n=3) in einem repräsentativen Experiment gezeigt. **a:** Bestimmung des Gehaltes an Chlorophyll *a*; **b:** Bestimmung des Gehaltes an Chlorophyll *b*; **c:** Bestimmung des Chlorophyll *a/b*-Verhältnisses; **d:** Bestimmung des Gehaltes an Carotinoiden.

Zusätzlich wurde überprüft, ob Änderungen im Chlorophyll *a/b*-Verhältnis bei den verschiedenen Anzuchtbedingungen auftraten (Abbildung 3-6c). Insgesamt lag das Chlorophyll *a/b*-Verhältnis der Pflanzen ohne Pi in dieser Versuchsreihe etwas höher als bei vollgedüngten Pflanzen. In keinem Fall wurde ein messbarer Einfluss von Phi auf das Chlorophyll *a/b*-Verhältnis in der Gruppe der Pflanzen mit oder ohne Pi festgestellt.

### 3.1.2.3 Photosyntheseleistung

Pi-Mangel kann den Photosyntheseablauf direkt durch Inhibierung der Energieumwandlungsprozesse (ADP-Phosphorylierung) oder indirekt durch Inhibierung von Enzymen des Calvinzyklus hemmen. Zur weiteren Charakterisierung der physiologischen Stressreaktionen gegenüber Pi-Mangel und der Belastung mit Phi wurde die Effizienz des Photosystems II (PSII) analysiert ( $F_v/F_m$ ). Der  $F_v/F_m$ -Wert stellt das Verhältnis zwischen der variablen und der maximalen Fluoreszenz des Chlorophylls im PSII dar. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-7 gezeigt.

Unter den hier getesteten Bedingungen wurden keine Unterschiede zwischen den PSII-Effizienzen der Pflanzen mit Pi (Abbildung 3-7a) bzw. ohne Pi festgestellt (Abbildung 3-7b). In den ersten 24 h nach der Zugabe von Phi nahm die PSII-Effizienz sowohl in Pflanzen mit Pi als auch in Pflanzen ohne Pi leicht zu. Diese Zunahme war unabhängig von den angesetzten Phi-Konzentrationen. Im weiteren Verlauf des Versuches blieben die  $F_v/F_m$ -Werte bis zu 120 h unverändert. Somit erschien die PSII-Effizienz von Phi unabhängig.



**Abbildung 3-7:** Phi hat keine Auswirkung auf die PSII-Effizienz ( $F_v/F_m$ ) in Tomaten. Die Tomatenpflanzen wurden als Hydrokultur für 7 Tage unter +Pi- und -Pi-Bedingungen und unter der Applikation der angegebenen Phi-Konzentrationen behandelt. Es sind Median, Maximum und Minimum von fünf parallelen Messungen ( $n=5$ ) in einem repräsentativen Experiment gezeigt. **a:** Pflanzen gewachsen auf +Pi-Medium; **b:** Pflanzen gewachsen auf -Pi-Medium.

### **3.2 Zellteilungsrate und Vitalität**

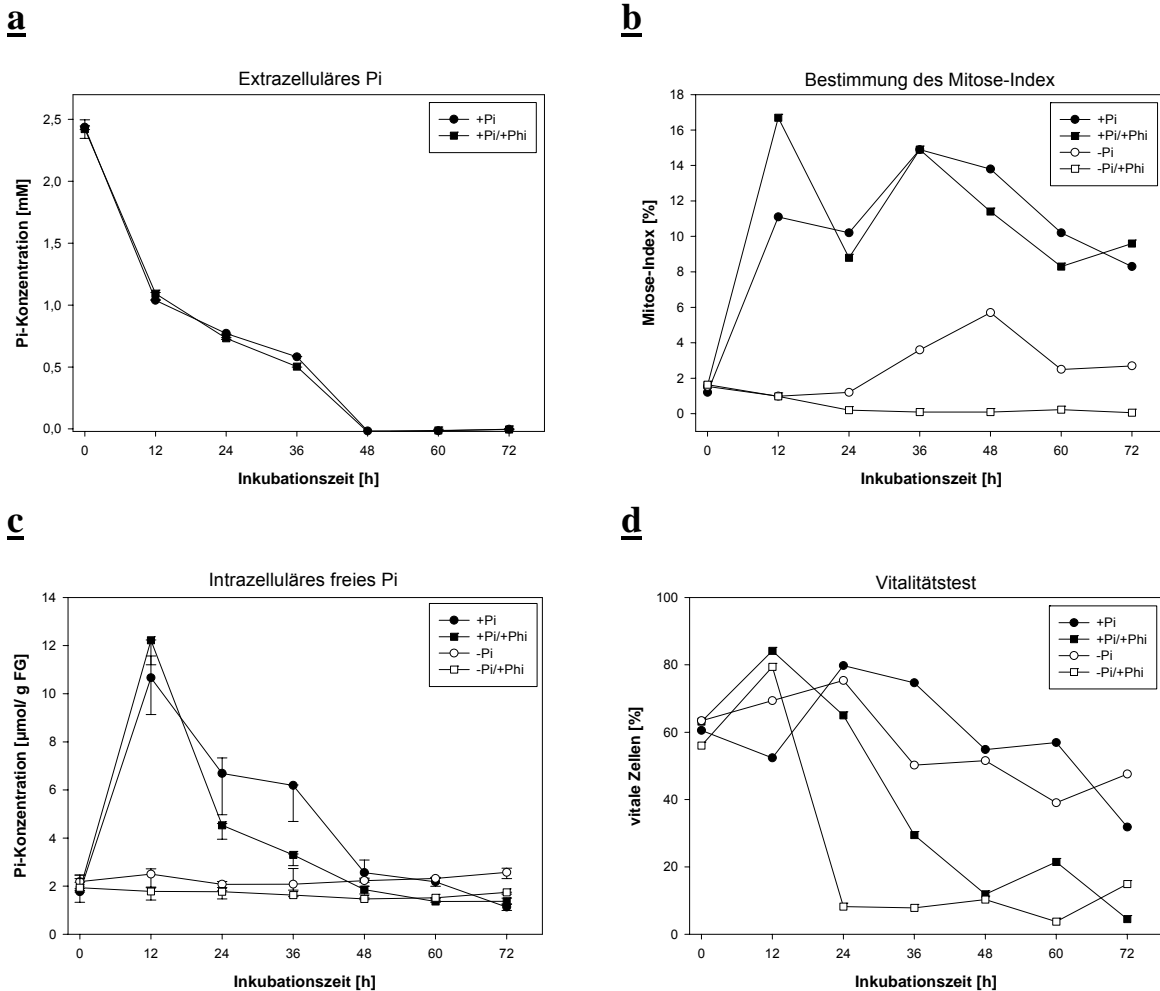
Phi führte zu einer deutlichen Hemmung des Zellwachstums sowohl in Tomatenzellkulturen als auch in Tomatenpflanzen. Daher stellte sich die Frage nach dem Einfluss von Phi auf die Zellteilung. Um das zu untersuchen, wurde der Mitose-Index in Tomatenzellkulturen betrachtet, der ein Maß für die Zellteilungsgeschwindigkeit der Zellen ist. Zusätzlich wurde die Vitalität der Zellpopulationen unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen mittels Fluoresceindiacetat (FDA) bestimmt. Zellen aus der stationären Wachstumsphase der Vorkultur (4 Tage alt) wurden in +Pi, +Pi/+Phi, -Pi, und -Pi/+Phi Medien überführt. Die Ausgangskonzentration von Phi bzw. Pi war 2.5 mM. Die Zellen in allen Versuchsansätzen hatten zu Beginn des Experimentes eine niedrige Zellteilungsrate.

Unter +Pi-Wachstumsbedingungen zeigte sich ein starker Anstieg des Mitose-Index innerhalb der ersten 12 h, der von einer Zunahme des intrazellulären, freien Pi gekennzeichnet war (Abbildung 3-8b und c). Danach nahmen die Zellteilungsrate und die Konzentration des intrazellulären Pi ab. Dies korrelierte ebenfalls mit dem Verbrauch an extrazellulärem Pi, welches innerhalb von 48 h komplett erschöpft war (Abbildung 3-8a). Der parallel durchgeführte Vitalitätstest zeigte eine langsame Abnahme der vitalen Zellen über 72 h (Abbildung 3-8d).

Unter Pi-Mangel (-Pi) stieg der Mitose-Index erst 12 h nach dem Versuchsstart leicht an und erreichte ein Maximum von 5.7 % bei 48 h. Der prozentuale Anteil an vitalen Zellen war bei Pi-Mangel vergleichbar zur +Pi-Kultur.

In +Pi/+Phi-Medium zeigten die Tomatenzellen ein mit der +Pi-Kultur vergleichbares Zellteilungsverhalten. Phi übte keinen Einfluss auf den Phosphatverbrauch aus, verringerte jedoch die intrazelluläre Pi-Konzentration am zweiten Kulturtag. Auffallend war, dass der Vitalitätstest ebenfalls nach dem zweiten Versuchstag eine stark verminderte Anzahl an vitalen Zellen zeigte.

Die Präsenz von Phi im Pi-freien Medium führte zu einer sehr starken Hemmung der Zellteilungsrate. Der Vitalitätstest zeigte einen sehr starken Abfall an vitalen Zellen zwischen 12 und 24 h.

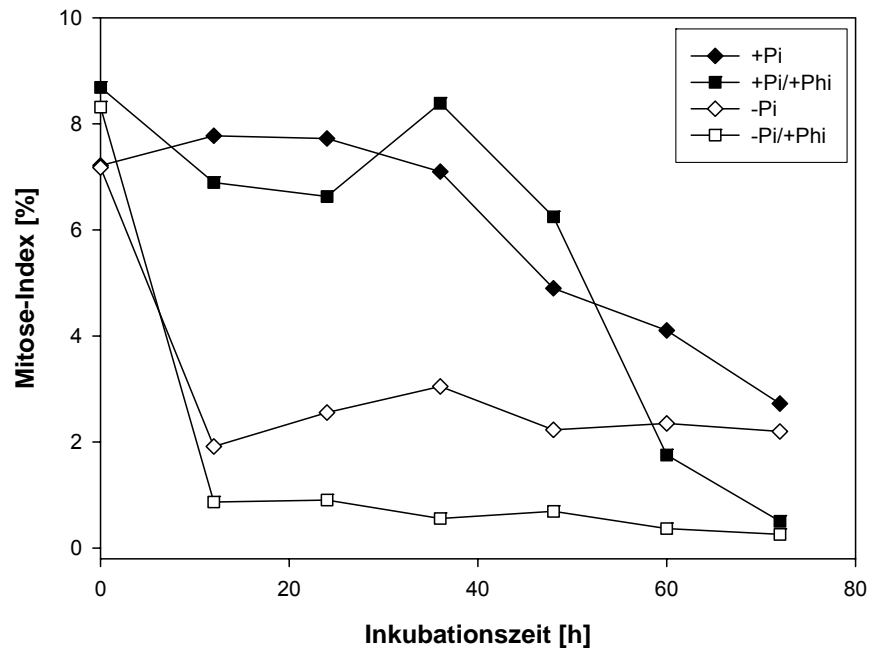


**Abbildung 3-8:** Phi hemmt die Zellteilungsrate und führt zu einer starken Verringerung des prozentualen Anteils an vitalen Zellen in Pi-freiem Medium. Tomatenzellen wurden mit +Pi-, -Pi-, +Pi/+Phi- und -Pi/+Phi-Medien behandelt. Pi-Verbrauch, Mitose-Index, intrazelluläres, freies Pi und Vitalität der Zellen wurden zu den angegebenen Inkubationszeiten bestimmt. **a:** Verbrauch an extrazellulärem Pi; **b:** Bestimmung des Mitose-Index mittels DAPI-Färbung der Zellkerne; **c:** Konzentration des intrazellulären, freien Pi; **d:** Vitalitätstest. In den Abbildungen **a** und **c** sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Phosphatbestimmungen ( $n=3$ ) in einem repräsentativen Experiment dargestellt. In den Abbildungen **b** und **c** sind Mitose-Index bzw. Vitalität als prozentualer Anteil aus jeweils 1000 ausgewerteten Zellen in einem repräsentativen Experiment dargestellt.

In einem weiteren Experiment wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase der Vorkultur entnommen und in die oben genannten Kulturbedingungen überführt (Abbildung 3-9). Erwartungsgemäß wiesen alle exponentiell wachsenden Zellen zu Beginn eine hohe Zellteilungsrate auf. Die +Pi- und +Pi/+Phi-Kulturen zeigten innerhalb der ersten 36 h einen konstanten Mitose-Index. Im weiteren Versuchsverlauf nahm die Zellteilungsrate ab, wobei die Phi-behandelten Zellen einen schnelleren Abfall der Teilungsrate zeigten. Im Gegensatz dazu fiel der Mitose-Index der -Pi- und -Pi/+Phi-Zellkultur innerhalb der ersten 12 h auf unter 2 % ab. Pi-Mangel hemmte also bei stationären und auch bei exponentiell wachsenden Zellen die Zellteilung. Im weiteren Versuchsverlauf nahm der Mitose-Index der -Pi-Zellen leicht zu und erreichte einen Höchstwert von 3.1 % (36 h). Die Zellteilung der Phi-



behandelten Zellen war stark inhibiert. Der Mitose-Index betrug im Versuchsverlauf weniger als 0.9 %.



**Abbildung 3-9:** Phi führt zu einem stark herabgesetzten Mitose-Index in Tomatenzellen, die aus der exponentiellen Wachstumsphase der Vorkultur entnommen und in Medien mit +Pi, +Pi/+Phi, -Pi- bzw. -Pi/+Phi überführt wurden. Jeder Messwert stellt den prozentualen Anteil der mitotischen Zellen in insgesamt 1000 ausgewerteten Zellen dar.

Zusammengefasst zeigten die Versuche zum Mitose-Index, dass Pi-Mangel die Zellteilung hemmt und dass dieser Effekt in Anwesenheit von Phi verstärkt wird. Weiterhin konnte auch bei ausreichender Pi-Versorgung ein negativer Einfluss von Phi auf die intrazelluläre Pi-Konzentration und die Vitalität gezeigt werden. Die Wirkung von Pi-Mangel und Phi war unabhängig vom Wachstumsstadium der Zellen, da Zellen aus der stationären Wachstumsphase ganz ähnlich wie Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase reagierten. Lai *et al.* (2007) haben in ihren Untersuchungen einen engen Zusammenhang zwischen Wachstum (Zellteilung), erhöhten Pi-Bedarf und *PSR*-Genexpression nachgewiesen. Der im Vergleich zu -Pi-Bedingungen extrem niedrige Mitose-Index unter -Pi/+Phi-Bedingungen könnte hier eine Folge der Herabregulation der *PSR*-Genexpression sein. Darum wurde der Einfluss von Phi auf die Pi-Mangelanpassungen auf transkriptioneller Ebene näher untersucht.

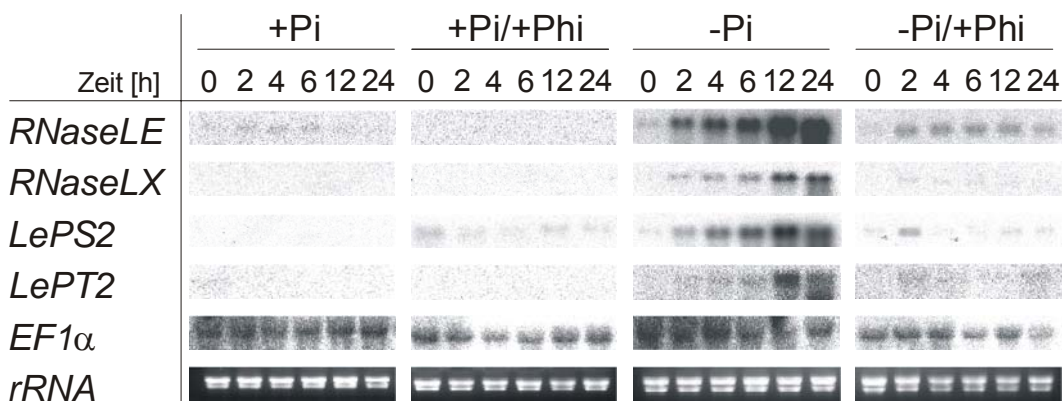
### 3.3 Expressionsanalyse von *PSR*-Gene

In den folgenden Abschnitten werden Ergebnisse präsentiert, die den Einfluss von Phi auf die Phosphatmangelantwort auf Genexpressionsebene beschreiben. Zunächst wurde die

Genexpression ausgewählter *PSR*-Gene in Tomatenzellkulturen und in Tomatenpflanzen mittels Northern-Blot untersucht. Dazu wurde die Transkription der Gene *LePS2*, *LePT2*, *RNaseLX* und *RNaseLE* beobachtet. *LePS2* ist eine saure Phosphatase, die zu einer Familie von drei intrazellulären Phosphohydrolasen gehört. *LePT2* ist ein hoch-affiner Pi-Transporter. *RNaseLX* und *RNaseLE* sind Gene für RNA-spezifische Endonukleasen. Ergänzend wurden mit Hilfe von transgenen Pflanzen Promotoraktivitätsstudien der *RNaseLX* unter verschiedenen Kulturbedingungen durchgeführt.

### 3.3.1 Genexpressionsstudien in Tomatenzellkulturen

Genexpressionsanalysen wurden mittels Northern-Hybridisierung mit  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markierten cDNA-Sonden für *RNaseLE*, *RNaseLX*, *LePS2* und *LePT2* durchgeführt. *EF1 $\alpha$*  wurde als interne Kontrolle benutzt.



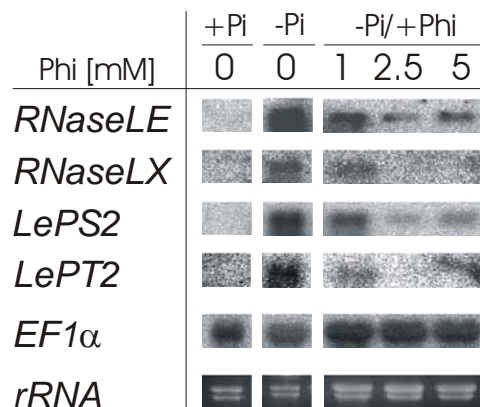
**Abbildung 3-10:** Phi unterdrückte die Transkription aller analysierten *PSR*-Gene (*RNaseLE*, *RNaseLX*, *LePS2* und *LePT2*) trotz Pi-Mangel (vierte Spalte). Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Transkriptakkumulation der *PSR*-Gene in Tomatenzellkulturen in Abhängigkeit der extrazellulären Pi- bzw. Phi-Versorgung. In Abwesenheit von Pi und Phi wurde die Transkription der *PSR*-Gene aktiviert (dritte Spalte). Die Transkriptionsanalyse wurde durch Northern-Blot durchgeführt. Phi bzw. Pi wurden in einer Konzentration von 2.5 mM zugesetzt. *EF1 $\alpha$*  diente als konstitutiv exprimierte interne Kontrolle.

Abbildung 3-10 zeigt die zeitliche Transkriptakkumulation der ausgewählten *PSR*-Gene in Tomatenzellkulturen. Unter +Pi-Bedingungen konnten im Northern-Blot keine Transkripte von *RNaseLX* und *LePT2* nachgewiesen werden. Ein schwaches Expressionslevel wurde für *RNaseLE* detektiert. In der Anwesenheit von Phi waren *RNaseLE*-Transkripte nicht mehr detektierbar. Eine geringe Genexpression wurde aber für *LePS2* mit Phi festgestellt.

In Abwesenheit von exogenem Pi konnten mRNAs aller vier untersuchten Gene schon 2 h nach dem Mediumswechsel nachgewiesen werden. Mit der Zeit wurde die Transkriptmenge der *PSR*-Gene größer und erreichte bei 12-24 h das Maximum. Der Zusatz von Phi führt in

der Abwesenheit von Pi zu einer deutlichen Unterdrückung der *PSR*-Genexpression, wobei die mRNA-Menge schon 2 h nach der Zugabe von Phi deutlich reduziert war.

Um den Einfluss von Phi auf die *PSR*-Genexpression weiter zu erforschen, wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Phi-Wirkung untersucht. Dazu wurden Tomatenzellen mit Pi, unter Pi-Mangel und unter Pi-Mangel mit steigenden Konzentrationen an Phi kultiviert. Die Auswirkung von 1, 2.5 und 5 mM Phi wurde nach 12 h Inkubationszeit anhand der Transkriptmengen der *PSR*-Gene untersucht und ist in Abbildung 3-11 dargestellt. Eine Repression der *PSR*-Gene war bereits bei 1 mM Phi zu erkennen. Bei Phi-Konzentrationen von 2.5 und 5 mM Phi war die Expression von *RNaseLX* und *LePT2* im Northern-Blot nicht mehr nachweisbar und die Expression von *RNaseLE* und *LePS2* war stark herabgesetzt. Dies bedeutete, dass die Transkription der *PSR*-Gene durch Phi konzentrationsabhängig gehemmt wurde.



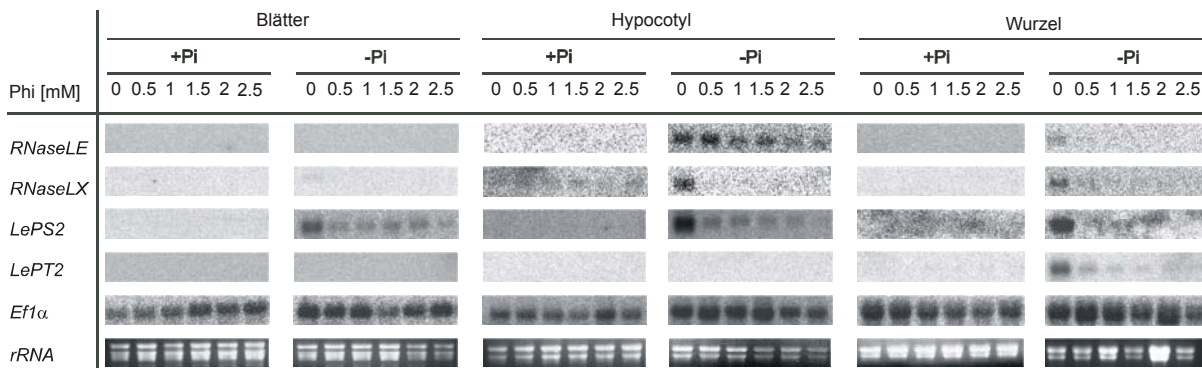
**Abbildung 3-11:** Die Genexpression der *PSR*-Gene (*RNaseLE*, *RNaseLX*, *LePS2* und *LePT2*) wurde konzentrationsabhängig durch Phi unterdrückt. Auf dem Bild ist die Transkription der *PSR*-Gene bei Anwesenheit von Pi (+Pi), unter Pi-Mangel (-Pi) und unter Pi-Mangel mit 1, 2.5 und 5 mM Phi (-Pi/+Phi) 12 h nach Mediumwechsel gezeigt. *EF1α* diente als konstitutiv exprimierte interne Kontrolle.

### 3.3.2 Genexpressionsstudien in Tomatenkeimlingen

Der Phi-Effekt bei Pi-Mangelbedingungen wurde auch in hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen untersucht. Unter +Pi-Bedingungen war die Ausgangskonzentration an Pi immer 0.5 mM. Phi wurde in steigenden Konzentrationen von 0.5, 1, 1.5, 2 und 2.5 mM zu +Pi- und -Pi-Medium zugesetzt. Die *PSR*-Gene wurden in Blättern, Hypocotylen und Wurzeln analysiert. Die Northern-Blot-Analyse ist in Abbildung 3-12 dargestellt. Ähnlich wie bei Tomatenzellkulturen aktivierte Pi-Mangel die Transkription der untersuchten *PSR*-Gene. Unter Pi-Mangel wurden Transkripte von *RNaseLE* und *RNaseLX* in Hypocotylen und Wurzeln detektiert, wobei ein sehr schwaches Signal von *RNaseLX* auch in Blättern gefunden wurde. *RNaseLX* konnte auch unter +Pi-Bedingungen in Hypocotylen nachgewiesen werden.

*LePS2* wurde in Blättern, Hypocotylen und Wurzeln transkribiert. *LePT2*-Transkripte akkumulierten unter Pi-Mangel nur in der Wurzel.

Durch Phi wurde die Induktion der *PSR*-Gene in Tomatenpflanzen konzentrationsabhängig gehemmt. Die Genexpressionsanalyse der Tomatenpflanzen korrelierte gut mit den Ergebnissen aus den Tomatenzellkulturen und bestätigte diese Ergebnisse.

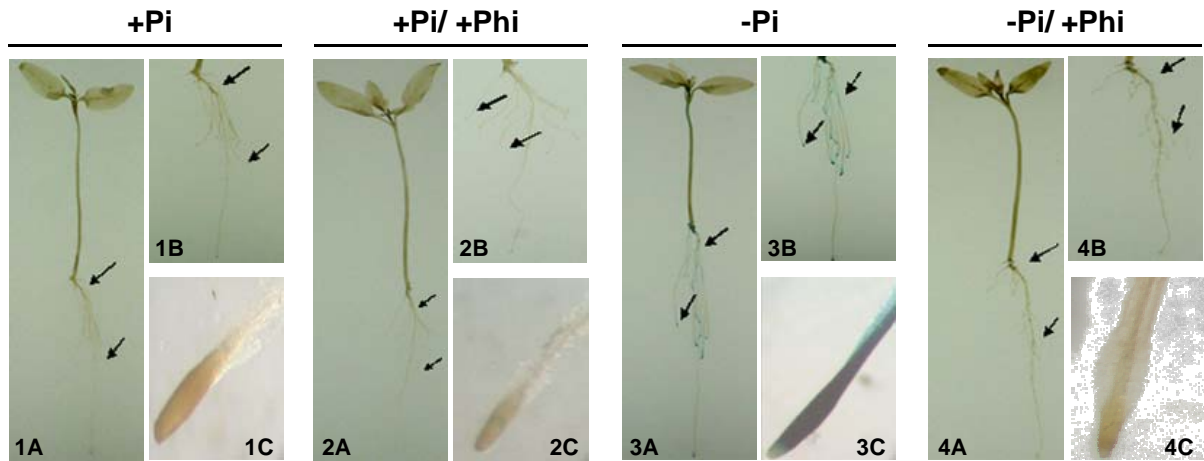


**Abbildung 3-12:** Die Zugabe von Phi unterdrückt die Transkription der analysierten *PSR*-Gene (*RNaseLE*, *RNaseLX*, *LePS2* und *LePT2*) in Tomatenpflanzen trotz Pi-Mangel. Der Effekt war konzentrationsabhängig. Tomatenpflanzen wurden als Hydrokultur in Medien mit Pi und ohne Pi und mit den angegebenen Phi-Konzentrationen kultiviert. Die Transkription der *PSR*-Gene wurde unter Pi-freien und Pi-gesättigten Bedingungen nach 7 Tagen Wachstum in Blättern, Hypocotylen und Wurzeln durch Northern-Blot untersucht. *EF1α* diente als konstitutiv exprimierte interne Kontrolle.

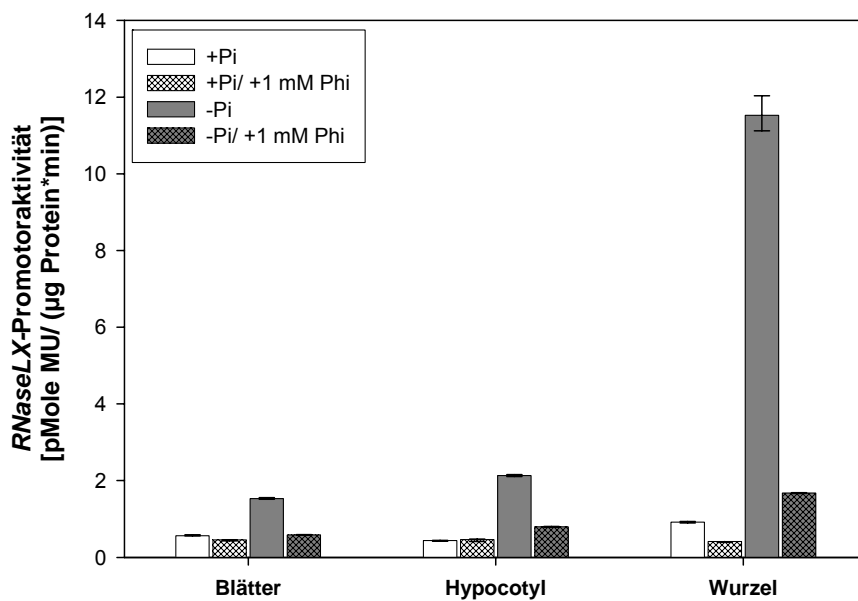
### 3.3.3 Einfluss von Phi auf die *RNaseLX*-Promotoraktivität

Ergänzend zu den Transkriptionsstudien wurde die Phi-Wirkung auch in transgenen Tomatenpflanzen untersucht. Zu diesem Zweck wurde die transgene *PromLX::uida* Linie 10 verwendet, die das  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Gen unter der Kontrolle des *RNaseLX*-Promotors exprimiert (Köck *et al.*, 2006). In Abbildung 3-13 ist die histochemische Analyse des Expressionsmusters des *RNaseLX*-Promotors gezeigt. Für das Experiment wurde eine Konzentration von 1 mM Phi eingesetzt. Bei ausreichender Pi-Versorgung wurde keine GUS-Aktivität, d. h. keine *RNaseLX*-Promotoraktivität, nachgewiesen. Bei Pi-Mangel war die Aktivität des *RNaseLX*-Promotors hauptsächlich in Wurzelspitzen und auch weniger stark im Hypocotyl detektierbar. In Blättern war keine GUS-Aktivität festzustellen. Die Zugabe von 1 mM Phi führte zu einer deutlichen Suppression der *RNaseLX*-Promotoraktivität. GUS-Aktivität konnte weder in Hypocotyl noch in Wurzeln nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse konnten auch quantitativ durch eine fluorometrische GUS-Analyse in Blättern, Hypocotylen und Wurzeln bestätigt werden (Abbildung 3-14). Die GUS-Analysen bestätigten damit die Ergebnisse der Northern-Blots und zeigten, dass Phi die Transkription von *PSR*-Genen unterdrückt.



**Abbildung 3-13:** Phi führte zur Repression der *RNaseLX*-Promotoraktivität. Die Abbildung zeigt die histochemische Analyse von der transgenen Linie 10 mit dem *RNaseLX*-Promotor-GUS-Konstrukt *PromLX::uidA*. Die transgenen Tomatenpflanzen wurden als Hydrokultur angezogen und nach 10 Tagen Wachstum auf +Pi-Medium (1A, 1B, 1C), +Pi/+Phi-Medium (2A, 2B, 2C), -Pi-Medium (3A, 3B, 3C) und -Pi/+Phi-Medium (4A, 4B, 4C) analysiert. Durch eine X-Gluc-Färbung der Pflanzen konnte die Aktivität des *RNaseLX*-Promotors hauptsächlich in Wurzeln und weniger stark in Hypocotyl unter Pi-Mangel nachgewiesen werden.



**Abbildung 3-14:** Phi unterdrückt die Aktivität des *RNaseLX*-Promotors bei Pi-Mangel. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der fluorometrischen GUS-Analyse von der transgenen Linie 10 mit dem *RNaseLX*-Promotor-GUS-Konstrukt *PromLX::uidA*. Bei Pi-freien Bedingungen war die GUS-Aktivität in Wurzeln und Hypocotylen erhöht. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei Messungen (n=3) gezeigt.

### 3.3.4 Wirkung von Phi auf die Genexpression der *RNaseLE*

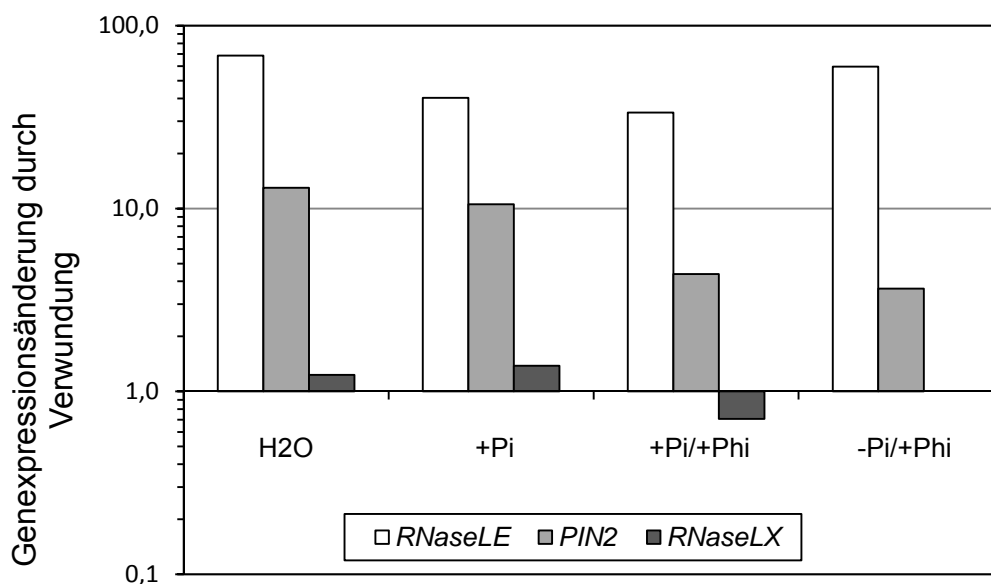
Die Genexpression von *RNaseLE* wird nicht nur durch Pi-Mangel sondern auch durch Verwundung aktiviert (Köck *et al.*, 2004). Aus unveröffentlichten Untersuchungen der

eigenen Arbeitsgruppe war zudem bekannt, dass die Genexpression von *RNaseLE* auch durch Zellwandabbauprozesse induziert wird. In den nachstehenden Versuchen wurde überprüft, ob Phi auch mit anderen Signalwegen bzw. Regulationsmechanismen zur Genaktivierung interagieren kann. Darum wurde der Einfluss von Phi auf die wund- und die zellwandabbauinduzierte Genexpression der *RNaseLE* untersucht. Die Genexpression von *RNaseLX* und *PIN2* wurde als Kontrolle mit analysiert, wobei *RNaseLX* als Beispiel für ein durch Pi-Mangel induziertes und *PIN2* für ein durch Verwundung induziertes Gen dienten.

### 3.3.4.1 Wundinduktion

Die Akkumulation der *RNaseLE*, *PIN2* und *RNaseLX* wurde in verwundeten und unverwundeten Blättern von 4 Wochen alten Tomatenpflanzen (Erdanzucht) untersucht. Isolierte Blätter wurden in H<sub>2</sub>O, +Pi-, +Pi/+Phi- und -Pi/+Phi-Hoagland-Medium für 8 h inkubiert. Abbildung 3-15 zeigt die Transkriptionsanalyse durch qRT-PCR.

*RNaseLE*-Transkripte akkumulieren in verwundeten Blättern, die sowohl mit Pi-haltigem Medium als auch mit H<sub>2</sub>O behandelt wurden. Die Genexpression der *RNaseLE* konnte nicht durch Phi reprimiert werden. Erwartungsgemäß wurde das *PIN2*-Gen in allen verwundeten Blattproben exprimiert. Wie bei *RNaseLE* wurde auch bei *PIN2* keine Repression der wundinduzierten Expression durch Phi festgestellt. *RNaseLX* war in keiner der Blattproben aktiviert.

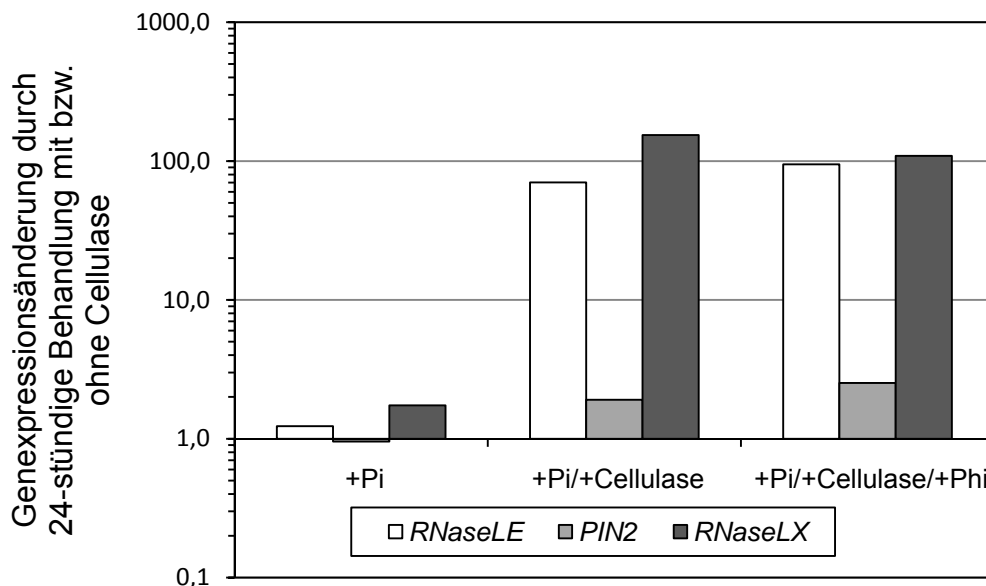


**Abbildung 3-15:** Phi beeinflusste die wundinduzierte Genexpression von *RNaseLE* und *PIN2* nicht. Logarithmische Darstellung des Expressionslevels von *RNaseLE*, *PIN2* und *RNaseLX* in isolierten Blättern von 4 Wochen alten Tomatenpflanzen nach Verwundung, bestimmt durch qRT-PCR. mRNA wurde aus Proben von unverwundeten und verwundeten Blättern isoliert. Das Expressionslevel der Gene wurde nach dem  $\Delta\Delta C_T$ -Berechnungsmodell auf das Expressionslevel in unverwundeten Blättern bezogen. Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde *Ubi* als Referenzgen benutzt.

### 3.3.4.2 Zellwandabbau

Der Zellwandverdau wurde einmal in Pi-haltigem CPW-Medium (0.5 M Sorbitol) mit Cellulase-Lösung (+Pi/+Cellulase) und einmal zusätzlich mit Phi (+Pi/+Cellulase/+Phi) für 24 h durchgeführt. Als Kontrolle wurden Tomatenzellen in Pi-haltigem CPW-Medium ohne Cellulase-Lösung und ohne Phi mitgeführt (+Pi). mRNA wurde sofort (0 h) und nach 24 h Inkubation isoliert. Die Genexpressionsanalyse ist in Abbildung 3-16 dargestellt.

Bei +Pi-Versuchsbedingungen wurde keine Expression der analysierten Gene festgestellt. Demgegenüber zeigte die qRT-PCR-Analyse hohe Expressionslevel der *RNaseLE* sowohl unter +Pi/+Cellulase-Bedingungen (70-fach hochreguliert), als auch unter +Pi/+Cellulase/+Phi-Bedingungen (95-fach hochreguliert). Das *PIN2*-Gen wurde unter diesen Versuchsbedingungen nicht exprimiert. Bemerkenswert war die starke Induktion der *RNaseLX*-Genexpression in Cellulase-behandelten Zellen. In +Pi/+Cellulase-Bedingungen war *RNaseLX* um den Faktor 154 und unter +Pi/+Cellulase/+Phi-Bedingungen um den Faktor 108 hochreguliert. Da der Zellwandverdau mit exogenem Pi durchgeführt wurde, konnte eine mögliche Pi-Mangelinduktion ausgeschlossen werden. Phi übte während des Zellwandabbaus keine reprimierende Wirkung auf die Genexpression aus.



**Abbildung 3-16:** Phi konnte die durch den Zellwandabbau induzierte *RNaseLE*-Genexpression nicht reprimieren (24 h Inkubation). Die Genexpression von *RNaseLX* wurde ebenfalls induziert, aber nicht durch Phi reprimiert. Tomatenzellen wurden unter Kontrollbedingungen (+Pi), mit Cellulase-Lösung (+Pi/+Cellulase) und in der gleichzeitigen Anwesenheit von Cellulase und Phi inkubiert (+Pi/+Cellulase/+Phi). mRNA wurde aus Proben vom Zeitpunkt  $t=0$  h (Kontrolle) und aus 24 h inkubierten Proben isoliert. Das Expressionslevel der Gene wurde nach dem  $\Delta\Delta C_t$ -Berechnungsmodell auf das Expressionslevel in der 0 h-Kontrolle bezogen. Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde *Ubi* als Referenzgen benutzt.

Zusammengefasst belegten die Ergebnisse, dass Phi die Aktivierung der *PSR*-Gene *LePS2*, *RNaseLX*, *RNaseLE* und *LePT2*, die normalerweise bei Pi-Mangel exprimiert werden und zur Aufrechterhaltung der Pi-Homöostase beitragen, stark unterdrückt. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig. Phi war nicht fähig, die Aktivierung der *RNaseLE* sowohl in der Wundantwort als auch in Zellwandabbauprozessen zu reprimieren. Somit konnte den Schluss gezogen werden, dass Phi selektiv und spezifisch die Phosphatmangelantwort beeinflusst.

### **3.4 Membrantransportstudien**

Pflanzen erhalten die Pi-Homöostase durch Regulation des Membrantransportes und durch Änderungen der metabolischen Aktivität. Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Phi mit den Adaptionsreaktionen auf Pi-Mangel interferiert.

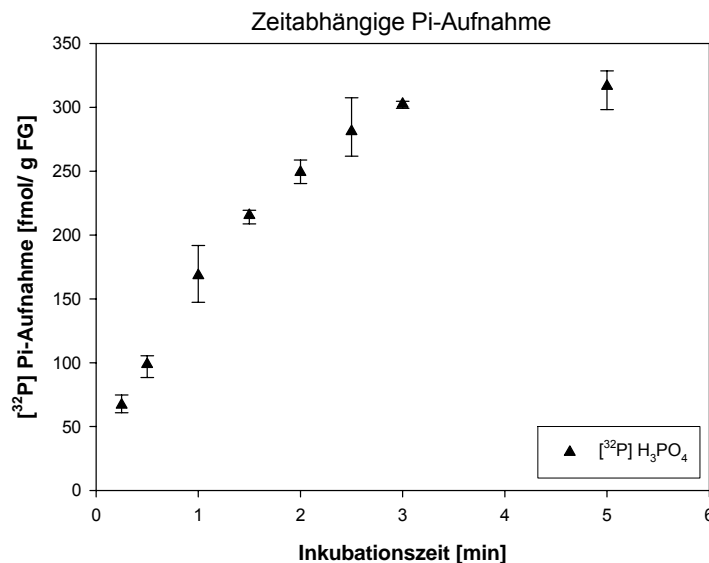
In den folgenden Abschnitten werden kinetische Studien der Pi-Aufnahme an Zellsuspensionskulturen aus *S. lycopersicum* (Tomatenzellen) und *N. tabacum* (Tabakzellen) und an isolierten Vakuolen präsentiert. Eine mögliche Konkurrenz von Phi mit dem Pi-Transport wurde in  $-$ Pi-Zellen näher charakterisiert. Radioaktiv markierte Phosphorsäure ( $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$  bzw.  $[^{33}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ ) wurde für die Aufnahmeexperimente benutzt. Das aufgenommene, radioaktiv markierte Phosphat wurde anhand der Cherenkov-Methode im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gemessen.

#### **3.4.1 Transportstudien mit Tomatenzellkulturen (*S. lycopersicum*)**

##### **3.4.1.1 Charakterisierung des Pi-Transportsystems**

Um den linearen Bereich des Pi-Transportes in Tomatenzellen zu ermitteln, wurde zuerst die Pi-Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Die zeitabhängige Pi-Aufnahme wurde in  $-$ Pi-Zellen gemessen und ist in Abbildung 3-17 dargestellt. Der Pi-Transport blieb innerhalb der ersten 1.5 min linear. Danach erreichte der Transport ein Plateau, möglicherweise weil die Zellen mit Pi gesättigt waren und die Aufnahmekapazität erreicht war. Basierend auf der zeitabhängigen Pi-Aufnahme, wurde für die nachfolgenden Transportstudien eine Inkubationszeit von 1 min festgelegt.





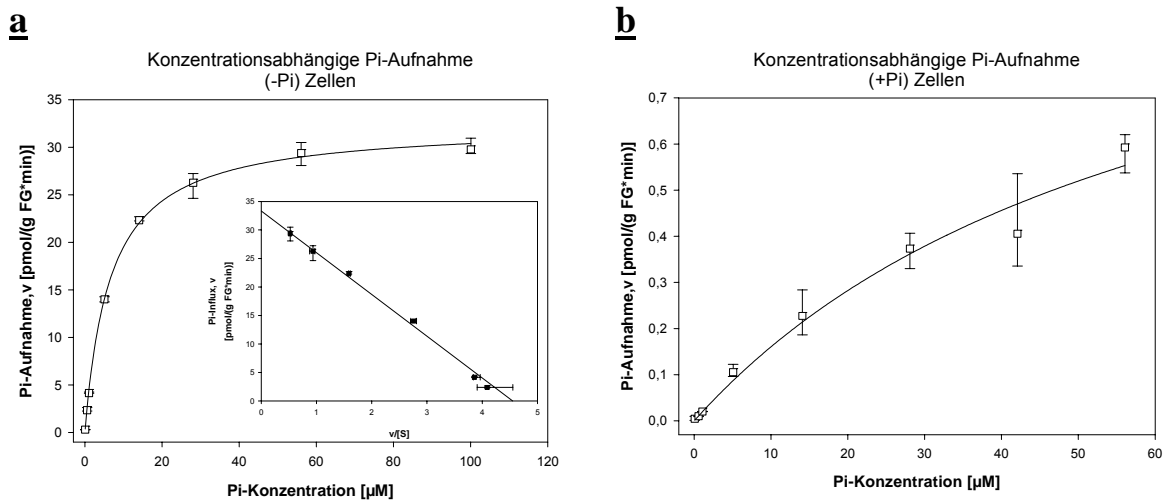
**Abbildung 3-17:** Zeitabhängigkeit der Pi-Aufnahme in Pi-verarmten Tomatenzellen. Wie in allen weiteren Experimenten, wurden die Aufnahmestudien bei pH 6.0 durchgeführt. Zu den Zellen wurde stets 37 KBq (7.5 nM) radioaktiv markiertes Phosphat ( $[^{32}\text{P}] \text{H}_3\text{PO}_4$ ) zugegeben. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen in einem repräsentativen Experiment gezeigt.

Im Weiteren wurde die Pi-Aufnahme in Abhängigkeit von der extrazellulären Pi-Konzentration bestimmt. Die konzentrationsabhängige Pi-Aufnahme wurde sowohl an +Pi- als auch an –Pi-Zellen gemessen. Die Pi-Influxisothermen sind in Abbildung 3-18 dargestellt. Die Auswertung der Daten ergab für die –Pi-Zellen eine typische Michaelis-Menten-Kinetik mit einer scheinbaren Michaelis-Menten-Konstante\* von  $K_m = 6.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$  und eine maximale Transportgeschwindigkeit von  $V_{max} = 32.4 \pm 0.4 \text{ pmol}/(\text{g FG} \cdot \text{min})$ . Die Auftragung der Daten im Eadie-Hofstee-Plot resultierte in einer Geraden. Diese Linearität wies darauf hin, dass nur ein Transportsystem am Pi-Transport beteiligt war.  $K_m$  und  $V_{max}$  stimmten mit den aus der nichtlinearen Regressionsanpassung ermittelten Werten überein.

+Pi-Zellen zeigten eine im Vergleich zu –Pi-Zellen sehr viel geringere Pi-Aufnahme, die im untersuchten Konzentrationsbereich keine Sättigung des Transportes aufwies. Dies könnte bedeuten, dass zwei Transportsysteme mit unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften an der Pi-Aufnahme in Abhängigkeit von der extrazellulären Pi-Konzentration beteiligt sind. Alternativ könnte die beobachtete Aufnahme allein durch Diffusion zustande gekommen sein.

---

\* Die  $K_m$ -Konstante beschreibt die kinetischen Eigenschaften des gesamten hoch-affinen Pi-Transportsystems, an dem mindestens zwei hoch-affine Pi-Transporter, *LePT1* und *LePT2*, beteiligt sind. Darum wurde sie als „scheinbare“  $K_m$ -Konstante betrachtet.

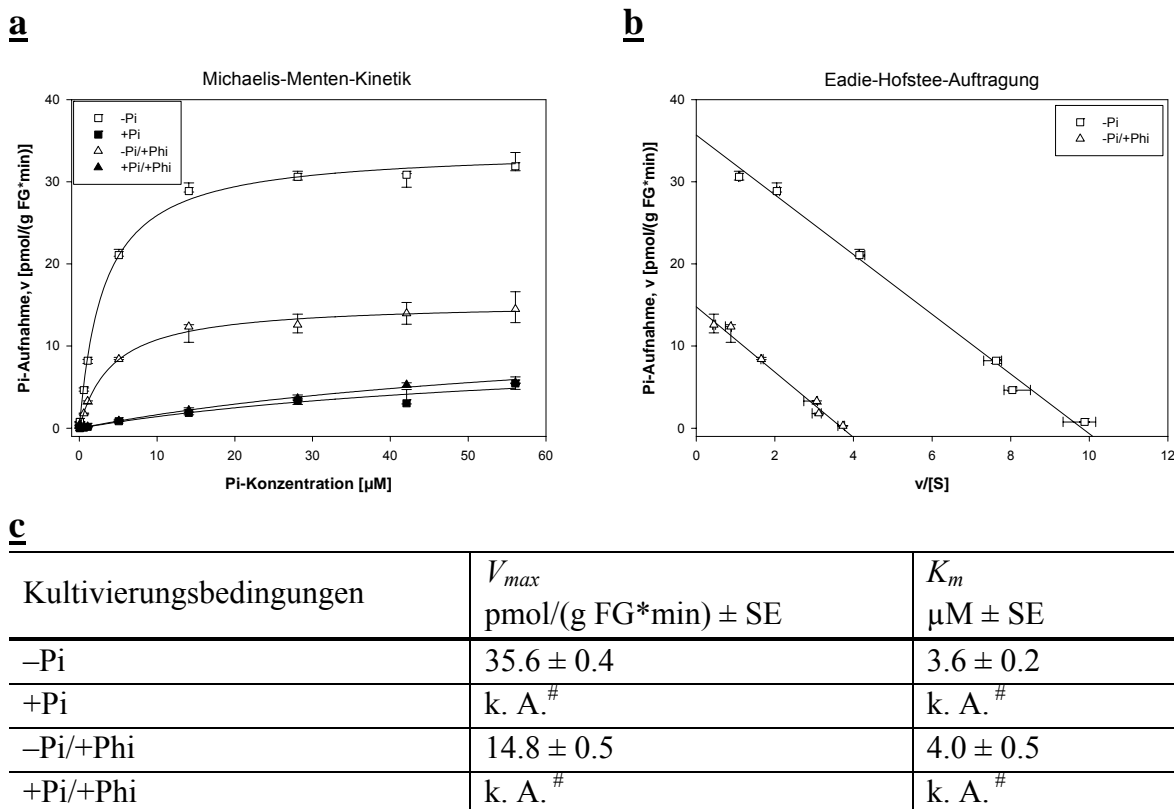


**Abbildung 3-18:** -Pi- und +Pi-Zellen zeigten unterschiedliche Pi-Aufnahmekinetiken. Die konzentrationsabhängige Pi-Aufnahme ist in (a) -Pi- und (b) +Pi-Tomatenzellen dargestellt. Die Pi-Aufnahme in -Pi-Zellen folgte einer typischen Michaelis-Menten-Kinetik. Im Gegensatz dazu war der Pi-Transport in +Pi-Zellen sehr gering. Eine sichtbare Sättigung des Transportsystems wurde im untersuchten Konzentrationsbereich nicht erreicht. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen ( $n=3$ ) in einem repräsentativen Experiment gezeigt.

Im nächsten Experiment wurden +Pi- und -Pi-Zellen über Nacht mit 2.5 mM Phi inkubiert und danach deren Transporteigenschaften untersucht. Die Michaelis-Menten-Kinetik und die Linearisierung der Daten sind in Abbildung 3-19 dargestellt. Die -Pi/+Phi-Zellen zeigten im Gegensatz zu -Pi-Zellen eine deutlich herabgesetzte maximale Transportgeschwindigkeit ( $V_{max}=14.8 \pm 0.5$  pmol/(g FG\*min)). Gleichzeitig blieb der  $K_m$ -Wert unverändert ( $K_m=4.0 \pm 0.5$  µM). Dies konnte deutlich durch die Eadie-Hofstee-Auftragung der Daten und den parallelen Verlauf der -Pi- und -Pi/+Phi-Regressionsgeraden gezeigt werden. Dies bedeutet, dass die Pi-Aufnahmekapazität dieser Zellen, vermutlich wegen einer verringerten Menge von aktiven Pi-Transportern, gering war.

Ein fast identischer Verlauf der Pi-Aufnahme wurde in +Pi- und +Pi/+Phi-Zellen beobachtet. Die Pi-Aufnahme war noch einmal deutlich geringer, als in -Pi- bzw. -Pi/+Phi-Zellen.

Die kinetischen Daten sind konsistent mit den schon gezeigten Transkriptionsanalysen, die belegten, dass Pi-Transporter wie z. B. *LePT2* bei Pi-Überschuss nicht exprimiert werden und dass Phi die Induktion der hoch-affinen Pi-Transporter bei Pi-Mangel reprimiert (vgl. Kapitel 3.3.1).

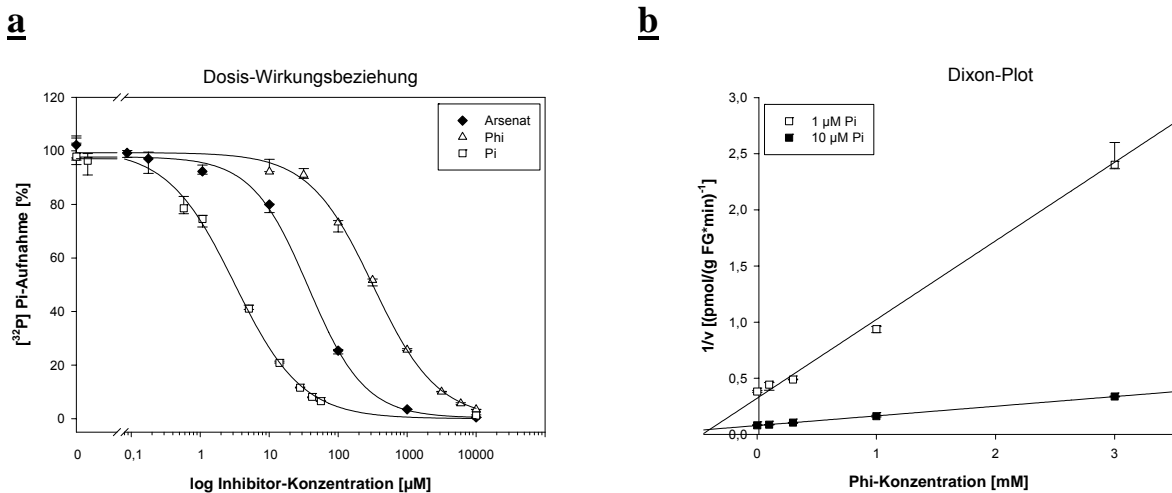


**Abbildung 3-19:** Die -Pi/+Phi-Zellen zeigten nach 24 h Inkubation mit 2.5 mM Phi ein deutlich reduziertes  $V_{max}$ . Die Phi-Behandlung veränderte den  $K_m$ -Wert nicht. **a:** Pi-Aufnahme in -Pi-, +Pi-, +Pi/+Phi- und -Pi/+Phi-Tomatenzellen in Abhängigkeit von der extrazellulären Pi-Konzentration. **b:** Auftragung der Daten nach Eadie-Hofstee aus -Pi- und -Pi/+Phi-Zellen. **c:** Zusammenfassung der kinetischen Parameter. Die Tabelle erfasst die Daten  $\pm$  SE, die aus der Eadie-Hofstee-Auftragung ermittelt wurden. In den Abbildungen **a** und **b** sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen ( $n=3$ ) in einem repräsentativen Experiment gezeigt.

#Die Bestimmung der kinetischen Parameter in +Pi- und +Pi/+Phi-Zellen war nicht möglich, weil im untersuchten Konzentrationsbereich keine Sättigung der Pi-Aufnahme festzustellen war.

### 3.4.1.2 Wettbewerbsversuche

Die nachfolgenden Wettbewerbsstudien wurden mit -Pi-Zellen durchgeführt. Zunächst wurde die Substratspezifität des hoch-affinen Pi-Transportsystems untersucht. Die Aufnahme von radioaktiv markiertem  $^{32}\text{Pi}$  wurde in der Gegenwart steigender Konzentrationen von Phi sowie verschiedener Pi-Strukturanaloga und Inhibitoren des Ionentransportes gemessen (Abbildung 3-20, vgl. Anhang Abbildung 7-1). Mittels nichtlinearer Regressionsanpassung der Daten an die Logistik-Gleichung für Dosis-Wirkungsbeziehungen (allosterische Hill-Kinetik) konnten für Phi die  $IC_{50}$ -Werte und daraus durch die Anwendung der Cheng-Prusoff-Gleichung die Inhibitor-Konstanten ( $K_i$ ) errechnet werden. Ein  $K_i$ -Wert von  $320 \pm 19.6 \mu\text{M}$  wurde für Phi ermittelt. Ergänzend wurde ein  $K_i$ -Wert von  $397 \mu\text{M}$  anhand des Dixon-Plots bestimmt. Demzufolge ergaben zwei unabhängige Methoden vergleichbare  $K_i$ -Werte für Phi.

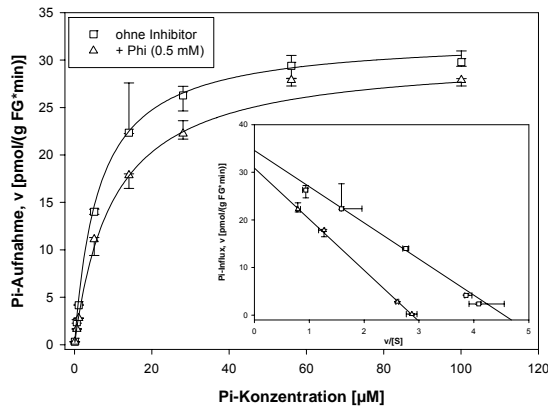


**Abbildung 3-20:** In Pi-verarmten Tomatenzellen wurden vergleichbare  $K_i$ -Werte von Phi anhand (a) der Dosis-Wirkungsbeziehung ( $K_i=320 \pm 19.6 \mu\text{M}$ ) und (b) des Dixon-Plots ( $K_i=397 \mu\text{M}$ ) berechnet. a: Die Pi-Aufnahme wurde in der Anwesenheit steigender Pi- ( $K_i=3.15 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ), Arsenat- ( $K_i=37.1 \pm 2.8 \mu\text{M}$ ) und Phi-Konzentrationen gehemmt. Die Pi-Aufnahme ohne Inhibitor wurde als 100 % festgelegt. b: Die Pi-Aufnahme wurde bei zwei festgelegten Pi-Konzentrationen (1 und 10  $\mu\text{M}$ ) und bei steigenden Phi-Konzentrationen gemessen. Der Schnittpunkt beider Kurven stellt den  $K_i$ -Wert dar. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei Messungen ( $n=3$ ) in einem repräsentativen Experiment gezeigt.

Der Schnittpunkt beider Geraden im Dixon-Diagramm befindet sich im zweiten Quadranten über der X-Achse. Dies deutet auf eine kompetitive Inhibierung der Pi-Aufnahme durch Phi hin (Dixon, 1953). Der Hemmmechanismus von Phi auf die Kinetik der Pi-Aufnahme wurde weiter geprüft und mit bekannten Inhibitoren (Arsenat und CCCP) des Pi-Transportes verglichen (Abbildung 3-21). CCCP ist ein Entkoppler der Atmungskette und zerstört pH-Gradienten über die Plasmamembran und in Mitochondrien, wodurch eine unkompetitive Hemmung des Pi-Transportsystems entsteht. Arsenat ist ein Strukturanalogon des Pi-Moleküls und diente als Beispiel für eine kompetitive Hemmung der Pi-Aufnahme.

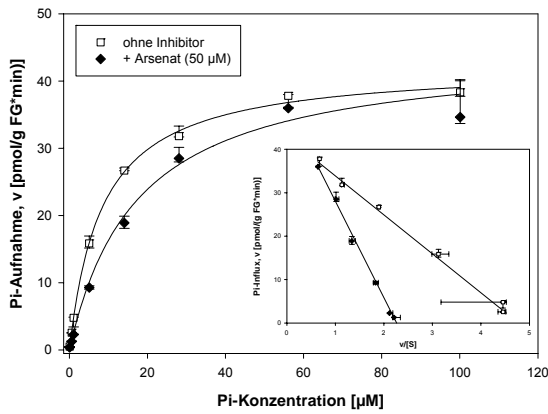
Die Kinetikuntersuchung zeigte, dass Phi die Pi-Aufnahme durch einen kompetitiven Mechanismus inhibierte. Es wurden Inhibitorkonzentrationen nahe der  $K_i$ -Werte benutzt. Im Vergleich zu der Kontrollkurve ohne Inhibitor erhöhten Phi und Arsenat den scheinbaren  $K_m$ -Wert um 40 % bzw. um 52 %. Durch Erhöhung der Pi-Konzentration ließ sich in Gegenwart der kompetitiven Inhibitoren  $V_{max}$  jedoch erreichen. Es wurde auch durch die Eadie-Hofstee-Darstellung deutlich, dass die Phi- bzw. Arsenat-Regressionsgeraden steiler wurden. Dies ist die Charakteristik kompetitiver Inhibitoren. Im Gegensatz dazu senkte CCCP gleichzeitig  $V_{max}$  und  $K_m$ , was für unkompetitive Inhibitoren typisch ist.

**a**



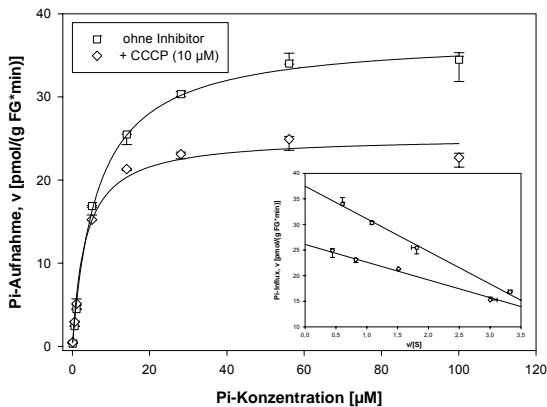
Inhibitor	$V_{max}$ pmol/(g FG*min) ± SE	$K_m$ µM ± SE
ohne Inhibitor	32.4 ± 0.7	6.1 ± 0.6
+ Phi (0.5 mM)	30.4 ± 0.4	10.0 ± 0.5

**b**



Inhibitor	$V_{max}$ pmol/(g FG*min) ± SE	$K_m$ µM ± SE
ohne Inhibitor	42.3 ± 0.4	8.3 ± 0.3
+ Arsenat (50 µM)	44.7 ± 1.4	17.3 ± 1.7

**c**



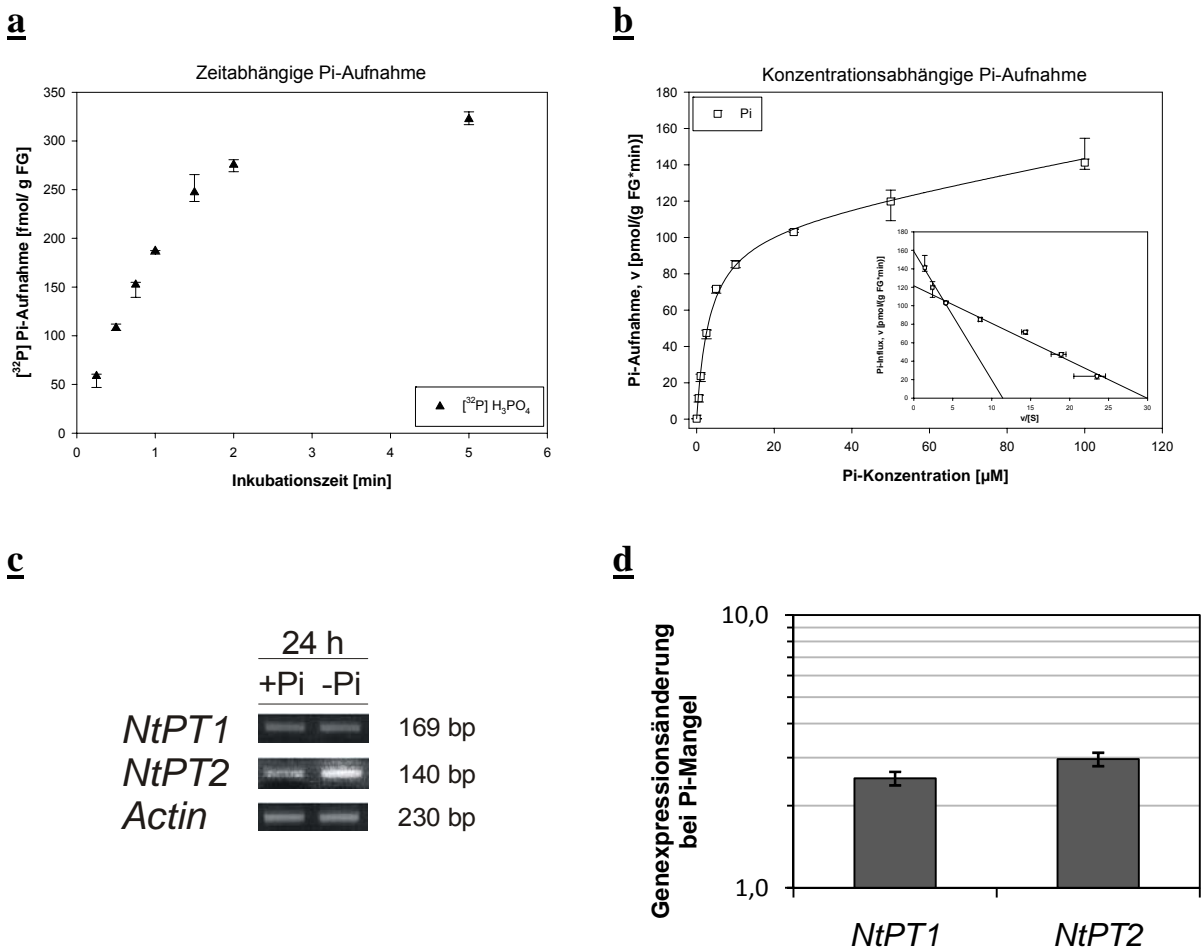
Inhibitor	$V_{max}$ pmol/(g FG*min) ± SE	$K_m$ µM ± SE
ohne Inhibitor	37.2 ± 0.5	6.5 ± 0.4
+ CCCP (10 µM)	25.2 ± 0.4	3.4 ± 0.3

**Abbildung 3-21:** Phi hemmt die Pi-Aufnahme in -Pi-Tomatenzellen durch einen kompetitiven Hemmmechanismus. Pi-Aufnahme in der Gegenwart von (a) Phi, (b) Arsenat und (c) CCCP. Die verwendeten Konzentrationen der Hemmsubstanzen sind in Klammern in der Tabelle angegeben. Phi und Arsenat veränderten den  $K_m$ -Wert, aber nicht den  $V_{max}$ -Wert. Beide Substanzen wirkten als kompetitive Inhibitoren der Pi-Aufnahme. CCCP diente als Beispiel für eine unkompetitive Hemmung und veränderte, wie erwartet,  $K_m$  und  $V_{max}$ . Die nichtlinearen Regressionskurven passen die Medianwerte an die Michaelis-Menten-Gleichung an. Die Einschübe stellen die lineare Regression der Daten im Eadie-Hofstee-Diagramm dar. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen (n=3) in einem repräsentativen Experiment gezeigt. Die Tabellen erfassen die Daten ± SD (n=3), die aus der Eadie-Hofstee-Auftragung ermittelt wurden.

### 3.4.2 Transportstudien mit BY-2 Tabakzellen

#### 3.4.2.1 Charakterisierung des Transportsystems

Das Pi-Aufnahmesystem der -Pi-Tabakzellen wurde ähnlich wie zuerst bei Tomatenzellen charakterisiert. Die zeitabhängige Pi-Aufnahme wies auf einen linearen Bereich von 1 min hin (Abbildung 3-22a). Darum wurde für die weiteren Transportversuche eine Inkubationszeit von 1 min festgelegt.



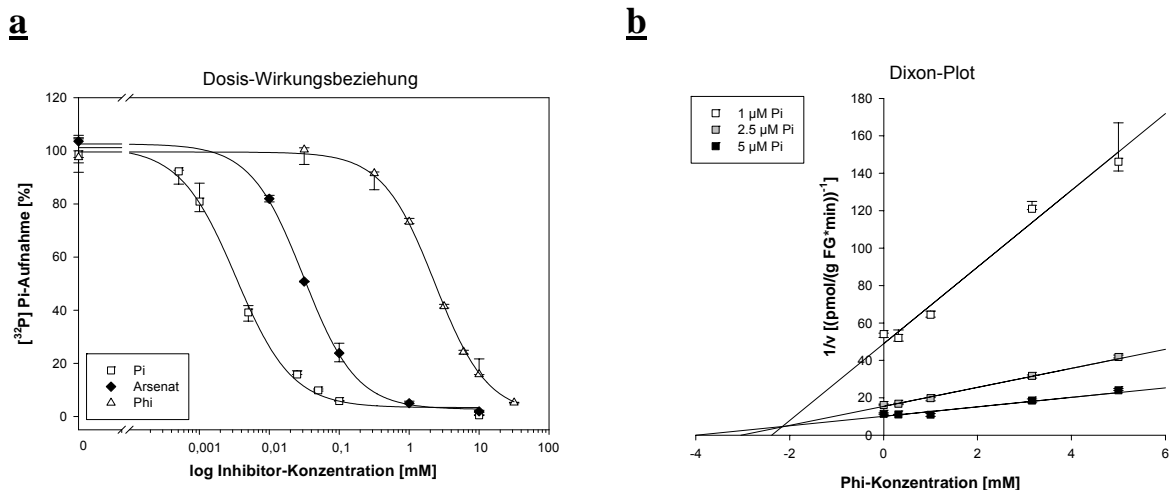
**Abbildung 3-22:** Pi-Aufnahme in -Pi-Tabakzellen. **a:** Zeitabhängige Pi-Aufnahme. Die [<sup>32</sup>P]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Aufnahme blieb innerhalb von 1 min linear. Wie in allen weiteren Experimenten wurden die Aufnahmestudien bei pH 6.0 durchgeführt. Zu den Zellen wurde stets 37 KBq (7.5 nM) radioaktiv markiertes Phosphat ([<sup>32</sup>P] H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) zugegeben. **b:** Konzentrationsabhängige Pi-Aufnahme. Der Einschub stellt die Linearisierung der Daten nach Eadie-Hofstee dar. In den Abbildungen **a** und **b** sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen (n=3) in einem repräsentativen Experiment gezeigt. **c:** Transkriptionsanalyse der hoch-affinen Pi-Transporter *NtPT1* und *NtPT2*. Die cDNA-Fragmente wurden in 30 Zyklen amplifiziert. **d:** qRT-PCR-Analyse der *NtPT1* und *NtPT2*. Das Expressionslevel der Gene wurde nach dem  $\Delta\Delta C_t$ -Berechnungsmodell auf das Expressionslevel in der +Pi-Kontrolle bezogen. Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde *Actin* als Referenzen benutzt. Die Daten stellen den Mittelwert von drei unabhängigen Messungen  $\pm$  SD dar.

Bei der Überprüfung der konzentrationsabhängigen Pi-Aufnahme wurde ein biphasischer Verlauf festgestellt (Abbildung 3-22b). Aus dem Eadie-Hofstee-Diagramm ließen sich zwei

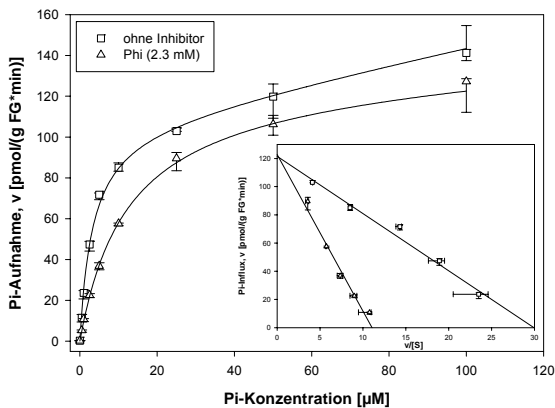
Regressionsgeraden unterschiedlicher Steigung ablesen. Daraus ließ sich schließen, dass das Pi-Transportsystem aus zwei Komponenten, aus einer sättigbaren und einer im untersuchten Konzentrationsbereich nicht-sättigbaren Komponente bestand. Die nicht-sättigbare Komponente zeigte sich erst bei hohen Konzentrationen an externem Pi. Die sättigbare, hoch-affine Komponente agierte bei niedrigen Pi-Konzentrationen und folgte einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik. Die kinetischen Parameter des hoch-affinen Pi-Transportsystems waren  $V_{max}=121.5 \pm 4.3$  pmol/(g FG\*min) und  $K_m=4.1 \pm 0.4$   $\mu$ M. Die zusätzlich durchgeführte Transkriptionsanalyse zeigte die Expression von zwei hoch-affinen Pi-Transportern in -Pi-Tabakzellen, nämlich *NtPT1* und *NtPT2* (Abbildung 3-22c und d). Jedoch konnten in +Pi- und -Pi-Tabakzellen keine Unterschiede im Expressionslevel beider Pi-Transporter nachgewiesen werden.

### 3.4.2.2 Kompetitionsversuche

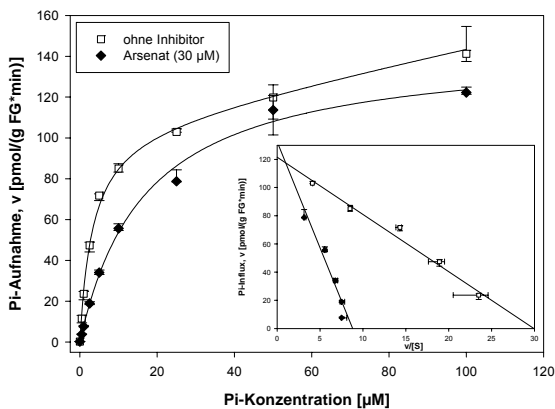
Auch in Tabakzellen wurde die Affinität der hoch-affinen Pi-Transporter zu Phi ermittelt. Die Hemmkurven sind in Abbildung 3-23 dargestellt. Aus der Dosis-Wirkungsbeziehung wurde zunächst der  $IC_{50}$ -Wert bestimmt und daraus ein  $K_i$ -Wert von 2.3 mM berechnet. Einen vergleichbaren Wert ( $K_i=2.2$  mM) erhielt man aus der Auswertung der experimentellen Daten im Dixon-Diagramm.



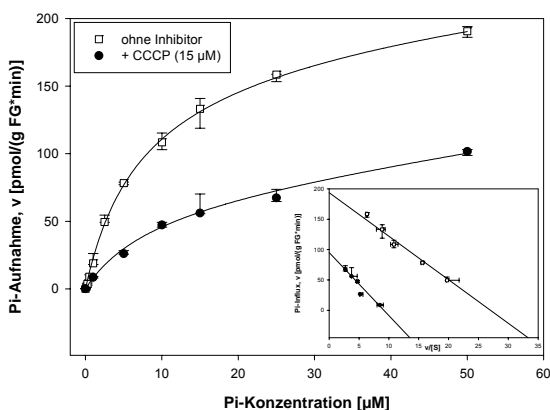
**Abbildung 3-23:** In -Pi-Tabakzellen wurden vergleichbare  $K_i$ -Werte von Phi anhand (a) der Dosis-Wirkungsbeziehung ( $K_i=2.3 \pm 0.1$  mM) und (b) des Dixon-Plots ( $K_i=2.2$  mM) berechnet. a: Die  $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ -Aufnahme wurde in der Anwesenheit steigender Pi- ( $K_i=3.3 \pm 0.3$   $\mu$ M), Arsenat- ( $K_i=30.8 \pm 2.4$   $\mu$ M) und Phi-Konzentrationen gehemmt. Die Pi-Aufnahme ohne Inhibitor wurde als 100 % festgelegt. b: Die Pi-Aufnahme wurde bei drei festgelegten Pi-Konzentrationen (1, 2.5 und 5  $\mu$ M) und in der Gegenwart steigender Phi-Konzentrationen gemessen. Der Schnittpunkt der Regressionskurven stellt den  $K_i$ -Wert dar. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei Messungen ( $n=3$ ) in einem repräsentativen Experiment gezeigt.

**a**

Inhibitor	$V_{max}$ pmol/(g FG*min) ± SE	$K_m$ μM ± SE
ohne Inhibitor	121.5 ± 4.3	4.1 ± 0.4
+ Phi (2.3 mM)	122.7 ± 8.5	11.1 ± 1.4

**b**

Inhibitor	$V_{max}$ pmol/(g FG*min) ± SE	$K_m$ μM ± SE
ohne Inhibitor	121.5 ± 4.3	4.1 ± 0.4
+ Arsenat (30 μM)	132.6 ± 3.3	15.0 ± 1.1

**c**

Inhibitor	$V_{max}$ pmol/(g FG*min) ± SE	$K_m$ μM ± SE
ohne Inhibitor	193.9 ± 58.1	7.2 ± 2.2
+ CCCP (15 μM)	95.0 ± 5.2	10.4 ± 1.6

**Abbildung 3-24:** Phi hemmt die Pi-Aufnahme in  $\gamma$ -Pi-Tabakzellen durch einen kompetitiven Hemmmechanismus. Pi-Aufnahme in der Gegenwart von (a) Phi, (b) Arsenat und (c) CCCP. Die verwendeten Konzentrationen der Hemmsubstanzen sind in Klammern in der Tabelle angegeben. Phi und Arsenat veränderten den  $K_m$ -Wert aber nicht den  $V_{max}$ -Wert. Sie wirkten als kompetitive Inhibitoren der Pi-Aufnahme. CCCP diente als Beispiel für eine unkompetitive Hemmung und veränderte wie erwartet  $K_m$  und  $V_{max}$ . Die Regressionskurven passen die Medianwerte an die Michaelis-Menten-Gleichung an. Die Einschübe stellen die lineare Regression der Daten im Eadie-Hofstee-Diagramm dar. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei Messungen in einem repräsentativen Experiment gezeigt. Die Tabellen erfassen die Daten ± SE, die aus der Eadie-Hofstee-Auftragung ermittelt wurden.



Ähnlich wie in Tomatenzellen ließ sich ein kompetitiver Hemmmechanismus von Phi auf das hoch-affine Pi-Transportsystem der Tabakzellen nachweisen. Abbildung 3-24 stellt die Hemmwirkung von Phi, Arsenat und CCCP auf die Kinetik der Pi-Aufnahme dar. Es wurden Inhibitorkonzentrationen nahe der  $K_i$ -Werte eingesetzt. Die kinetischen Parameter der Kontrollbedingungen ohne Inhibitor und der gehemmten Reaktion sind ebenfalls in Abbildung 3-24 zusammengefasst. Deutlich ist zu sehen, dass sich die Maximalgeschwindigkeit in der Gegenwart von Phi und Arsenat bei höheren Substratkonzentrationen erreichen ließ. Die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante nahm dagegen zu. Phi und Arsenat erhöhten den  $K_m$ -Wert um 63 % bzw. um 73 %. CCCP wirkte als unkompetitiver Inhibitor und veränderte sowohl  $V_{max}$  als auch  $K_m$ .

Die Kompetitionsversuche zeigten, dass Phi in beiden Modellsystemen (Tomate und Tabak) als kompetitiver Inhibitor des Pi-Transportsystems wirkte.

### 3.4.3 Transportstudien mit intakten Vakuolen

Um den Einfluss von Phi auf die Funktion der Vakuolen bezüglich der Pi-Homöostase abzuklären, wurde zunächst die Pi-Aufnahme durch den Tonoplasten intakter Vakuolen aus Tomatenzellen untersucht. Erfolgreiche Transportexperimente setzen dabei mehrere Faktoren voraus. Dazu zählen die Gewinnung einer Vakuolenfraktion mit hoher Ausbeute und hohem Reinheitsgrad, die Funktionsfähigkeit der isolierten Vakuolen und die Etablierung des Transportassays.

#### 3.4.3.1 Ausbeute- und Reinheitscharakterisierung

Intakte Vakuolen wurden nach der im Kapitel 2.10.2 beschriebenen Methode isoliert. Um eine zuverlässige Messung der Transportaktivitäten zu gewährleisten, war die Gewinnung einer vakuolären Fraktion mit hohem Reinheitsgrad entscheidend.

##### 3.4.3.1.1 Analyse mittels Markerenzymaktivitäten

Zur Ausbeuteberechnung und Reinheitscharakterisierung der Vakuolenpräparation wurden zunächst die Aktivitäten von Markerenzymen der verschiedenen Zellkompartimente herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 gezeigt. Die Ausbeute an gereinigten Vakuolen betrug ca. 18-20 % der Gesamtprotoplastenfraktion. Die Kontamination mit intakten Protoplasten und Mitochondrien variierte zwischen 0.5-3.5 %. Die Verunreinigung mit Endoplasmatischem Retikulum (ER) lag bei ca. 17 %.

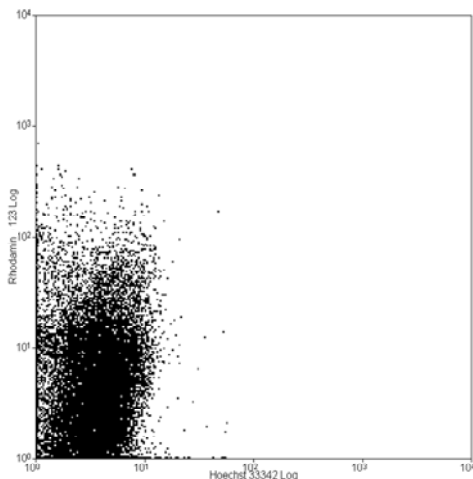
**Tabelle 3-1:** Übersicht zur Vakuolenausbeute und Reinheit an einem repräsentativen Beispiel einer Vakuolenpräparation anhand der Aktivität von Markerenzymen.

Markerenzym	Ausbeute [%]	Reinheit [% Kontamination]
$\alpha$ -Mannosidase (Vakuole)	18-20 %	
Malat-Dehydrogenase (Cytosol und Mitochondrien)		0.5-3.5 %
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Cytosol)		0.3 %
NADH-Cytochrom-c-Reduktase (ER)		17 %

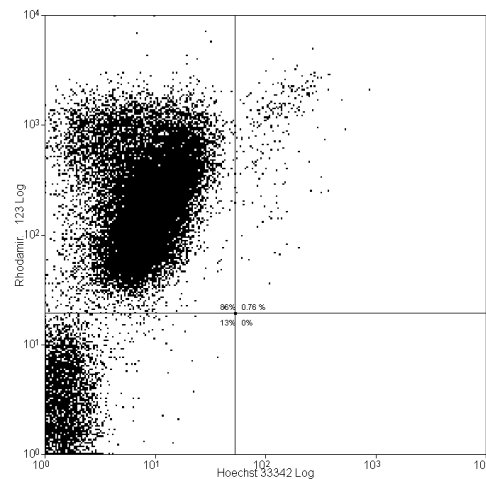
### 3.4.3.1.2 Durchflusscytometrische Analyse von Vakuolenpräparationen

Die Reinheit und Unversehrtheit der Vakuolenpräparation wurde auch durch eine Färbung und anschließende durchflusscytometrische Analyse überprüft. Durch Rhodamin 123 ließen sich alle Organellen mit einer intakten Membran färben. Beschädigte Organellen und Zellbruchstücke wurden nicht durch den Farbstoff angefärbt. Der DNA-Farbstoff Hoechst 33342 wurde eingesetzt, um zusätzlich die Menge der DNA-haltigen Mitochondrien bzw. Plastiden innerhalb der Vakuolenfraktion zu bestimmen. In Abbildung 3-25 ist zu erkennen, dass die allermeisten Vakuolen intakt waren (Rhodamin<sup>+</sup>) und dass die Verunreinigung der Vakuolenpräparation mit DNA-haltigen Organellen (Hoechst<sup>+</sup>) unter 1 % lag.

**a**



**b**



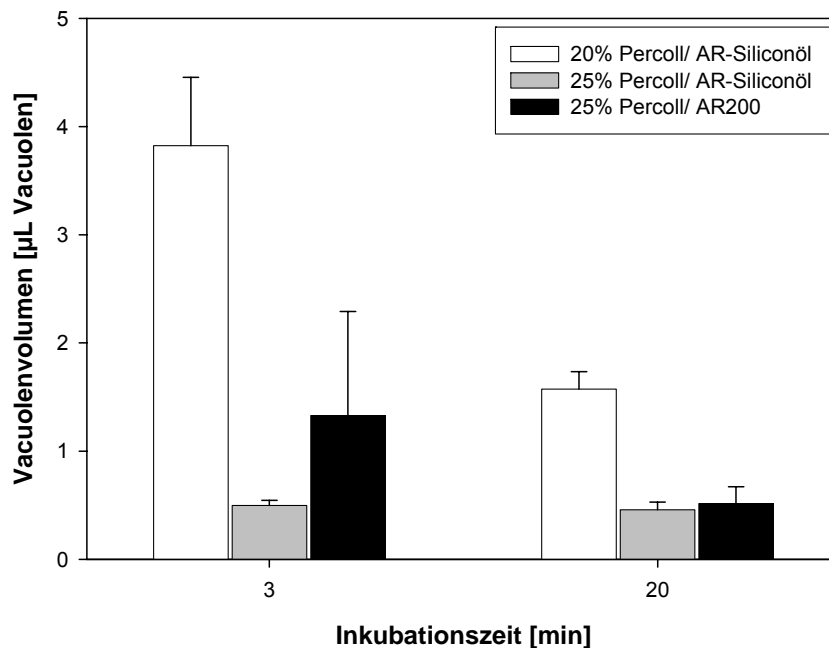
**Abbildung 3-25:** Die FACS-Analyse bestätigte die hohe Reinheit und Unversehrtheit der Vakuolenpräparation. **a:** Ungefärbte Kontrolle. **b:** Vakuolenpräparation nach Färbung mit Rhodamin 123 und Hoechst 33342. Durch eine Färbung mit Rhodamin 123 und Hoechst 33342 konnten zwischen intakten Vakuolen (Rhodamin<sup>+</sup>, 86 %, Quadrant links oben), Mitochondrien/Plastiden (Rhodamin<sup>+</sup>; Hoechst<sup>+</sup>, 0.76 %, Quadrant rechts oben) und beschädigten Organellen und Zellbruch (Rhodamin<sup>-</sup>, 13 %, Quadrant rechts unten) unterschieden werden.

### 3.4.3.2 Siliconöl-Filtrationszentrifugation

Für die hier durchgeführten Transportstudien wurde zunächst die Siliconöl-Filtrationszentrifugation etabliert, die im Institut für Pflanzenbiologie der Universität Zürich unter der Leitung von Dr. Markus Klein und Prof. Enrico Martinoia erlernt werden konnte (Universität Zürich, Institut für Pflanzenbiologie).

Die Methode beruht auf dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurde percollhaltiges Aufnahmemedium mit Siliconöl und danach mit Wasser überschichtet. Jedes Transportexperiment wurde durch die Zentrifugation beendet, bei der die Vakuolen aus dem Aufnahmemedium durch das Siliconöl in die obere wässrige Phase flotierten. Das Siliconöl trennte Aufnahmemedium und Wasser und verhinderte deren Vermischung. Bei dieser Methode spielten zwei Faktoren eine wichtige Rolle: einerseits die richtigen Flotationsbedingungen und andererseits die optimal eingestellten Aufnahmebedingungen im Aufnahmemedium.

Zu den Flotationsbedingungen gehört vor allem die richtige Auswahl der Siliconöldichte und des Percollanteils im Aufnahmemedium. Um eine Flotation der Vakuolen in die Wasserschicht (obere Phase) zu gewährleisten, muss die höchste Dichte der Gradientenlösung, d. h. der Percollanteil im Aufnahmemedium, die höchste Dichte der Vakuolen, aber auf keinen Fall die Dichte des Siliconöls übersteigen. Dies wurde an einem Experiment demonstriert, indem Percoll und Siliconöle in verschiedenen Dichten kombiniert wurden. 20 %-iges (v/v,  $\rho=1.036$  g/mL) bzw. 25 %-iges (v/v,  $\rho=1.093$  g/mL) Percoll wurden zusammen mit AR200 ( $\rho=1.049$  g/mL) und einem Siliconöl mit einer Dichte von 1.054 g/mL (AR-Siliconöl) getestet. Die Dichte des AR-Siliconöls wurde durch das Mischen der Siliconöle AR200 und AR1000 ( $\rho=1.075$  g/mL) im Verhältnis 8:2 (v/v) erreicht. Um die Ausbeute an flotierten Vakuolen auszuwerten, wurde dem Aufnahmemedium 0.1  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O zugesetzt. Das [ $^3\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O verteilt sich sehr schnell zwischen dem extra- und intravakuolären Raum und diente als interner Standard für die Menge der flotierten Vakuolen in jedem einzelnen Experiment. Die Vakuolen wurden bei zwei Inkubationszeiten (3 und 20 min) untersucht. Es wurde die Menge des radioaktiven Tritiums in der wässrigen Phase gemessen und daraus das Vakuolenvolumen berechnet. Zusätzlich wurden Kontrollproben ohne Radioaktivität und ohne Vakuolen, aber mit neutralrot-gefärbtem Aufnahmemedium durchgeführt. Hierdurch wurde die Stabilität des Gradienten geprüft. Die [ $^3\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O-Ausbeute bei den verschiedenen Flotationsbedingungen ist in Abbildung 3-26 dargestellt.



**Abbildung 3-26:** Der Dichtegradient, bestehend aus 25 % Percoll und AR-Siliconöl (AR200:AR1000=8:2), blieb nach der Zentrifugation stabil (graue Balken). Unter diesen Bedingungen war die Vakuolenausbeute bei den zwei Messzeiten gleich gut und reproduzierbar. Die Abbildung stellt die Ausbeute an Vakuolen bei verschiedenen Flotationsgradienten dar. Die Einstellung der Siliconöldichte erfolgte durch Mischen der Siliconöle AR200 und AR1000. Dem Aufnahme-medium wurden 20 % oder 25 % (v/v) Percoll zugesetzt. Jeder Messwert stellt den Mittelwert  $\pm$  SD (n=6) dar.

Es zeigte sich, dass der Gradient aus 20 %-igem Percoll/AR-Siliconöl instabil war (Abbildung 3-26, weiße Balken). Dies lag daran, dass das 20 %-ige Percoll eine niedrigere Dichte als das AR-Siliconöl hatte. Die Unstabilität des Gradienten wurde auch mit den gefärbten Kontrollproben bestätigt.

Bei dem Gradienten aus 25 % Percoll/AR200 schwankten die Ergebnisse trotz stabilem Gradienten sehr stark (Abbildung 3-26, schwarze Balken). Ursache dieser Schwankungen könnte sein, dass die Vakuolen teilweise nicht durch die Siliconölschicht flotieren konnten, was auch in einem Experiment mit neutralrot-gefärbten Vakuolen bestätigt werden konnte. Dies bedeutet, dass die Vakuolen und das Siliconöl ähnliche Dichten hatten. Darum wurde mit diesem Gradienten nicht weiter gearbeitet.

Eine reproduzierbare Ausbeute an  $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ , wurde bei dem Gradienten aus 25 % Percoll und AR-Siliconöl festgestellt (Abbildung 3-26, graue Balken). AR-Siliconöl ist dichter als AR200 und bildet darum einen größeren Dichteunterschied zu den Vakuolen. Dies erleichterte die Flotation der Vakuolen durch die Siliconölschicht. Für die nachstehenden Versuche wurde ein Dichtegradient aus 25 %-igem Percoll/AR-Siliconöl benutzt.

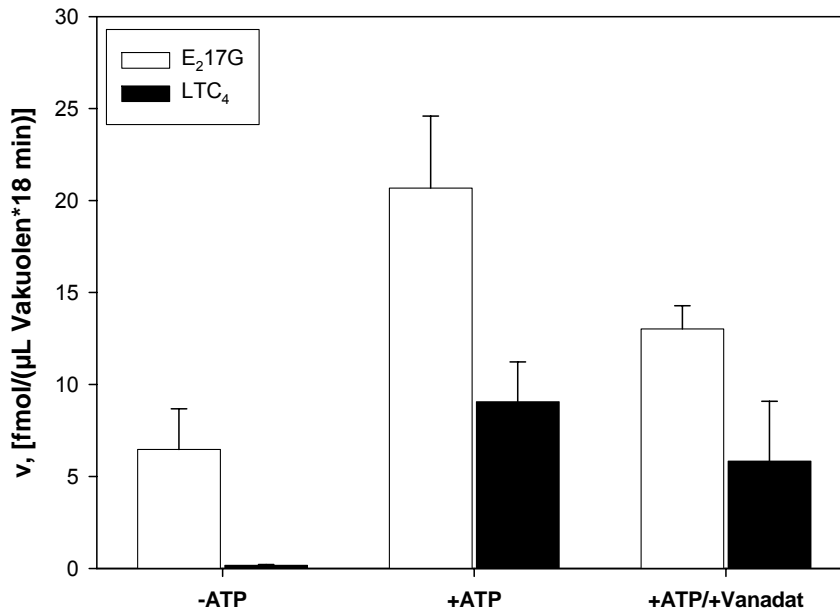
Um die Vakuolenausbeute nach der Flotation zusätzlich zu prüfen, wurde die Aktivität der  $\alpha$ -Mannosidase im Aufnahmemedium und in der wässrigen Phase bei diesen Bedingungen bestimmt. Nach der Flotation wurden in der wässrigen Phase und im Aufnahmemedium  $44 \pm 5.5 \%$  bzw.  $72 \pm 9.9 \%$   $\alpha$ -Mannosidaseaktivität nachgewiesen. Dies bedeutet, dass ein großer Teil der Vakuolen durch die Siliconölphase flotiert war.

### 3.4.3.3 Aufnahmebedingungen

Ein weiterer kritischer Faktor für Transportstudien mit Vakuolen ist die optimale Einstellung der Aufnahmebedingungen, die den intrazellulären Bedingungen möglichst exakt entsprechen sollten. Dabei sind pH-Wert, Energetisierung mit ATP bzw. PPI, Osmolarität und Ionenkonzentrationen, insbesondere Magnesium ( $Mg^{2+}$ ), zu beachten. Ausgehend vom cytosolischen pH-Wert wurde der pH-Wert des Aufnahmemediums auf 7.2 eingestellt. Frühere Studien demonstrierten, dass der Transport von Anionen wie z. B. Malat, Citrat und  $Cl^-$  durch den Tonoplasten isolierter Vakuolen ATP und  $Mg^{2+}$  erfordert (Martinoia *et al.*, 1985). Die Aufnahme dieser Anionen fand bei äquimolaren Konzentrationen an ATP und  $Mg^{2+}$  sehr langsam statt. Der Transport konnte aber bei  $Mg^{2+}$ -Überschuss deutlich angeregt werden. Eine halbmaximale Transportstimulation wurde bei einem Verhältnis von 3.5 mM  $Mg^{2+}$  zu 1 mM ATP erreicht (Dietz *et al.*, 1990). Unter Berücksichtigung dieser Angaben wurden  $MgCl_2$  und ATP- $Na_2$  in Konzentrationen von 6 mM und 1.5 mM zugesetzt. Um die Transporteigenschaften der intakten Vakuolen unter den oben angegebenen Aufnahmebedingungen zu testen, wurde die Aufnahme des abiotischen Glucuronatkonjugates  $\beta$ -Estradiol 17-( $\beta$ -D-Glucuronid) ( $[^3H]E_217G$ ), sowie des Glutathionkonjugates, Cysteinyl-Leukotrien ( $[^3H]LTC_4$ ) gemessen. Die Entgiftung lipophiler Xenobiotika durch Konjugation mit Glucuronaten und Glutathion ist ein bekannter Mechanismus in Säugetierzellen, der aber auch in pflanzlichen Vakuolen demonstriert wurde (Leier *et al.*, 1994, Keppler & Arias, 1997, Klein *et al.*, 1998).

Die Aufnahme beider Konjugat-Substrate,  $[^3H]E_217G$  und  $[^3H]LTC_4$ , ist in Abbildung 3-27 gezeigt. Zur Bestimmung des Volumens an flotierten Vakuolen wurde in diesem Fall  $[^{14}C]$ Glycerol benutzt. Die Aufnahme wurde über 18 min gemessen. Der Transport beider Substanzen war ATP-abhängig und wurde durch Vanadat inhibiert. Die Hemmung des Transportes durch Vanadat bedeutet, dass die Aufnahme beider Konjugat-Substrate durch spezifische ATPasen, die unabhängig von den vakuolären ATPase und PPIase agieren, vermittelt wird (Martinoia *et al.*, 1993, Klein *et al.*, 2000). Die vakuolären ATPase und PPIase

können durch Vanadat nicht gehemmt werden. Die Vorversuche mit E<sub>2</sub>17G und LTC<sub>4</sub> zeigten insgesamt, dass das beschriebene Aufnahmesystem geeignet war, um Transportstudien mit isolierten Vakuolen durchzuführen.



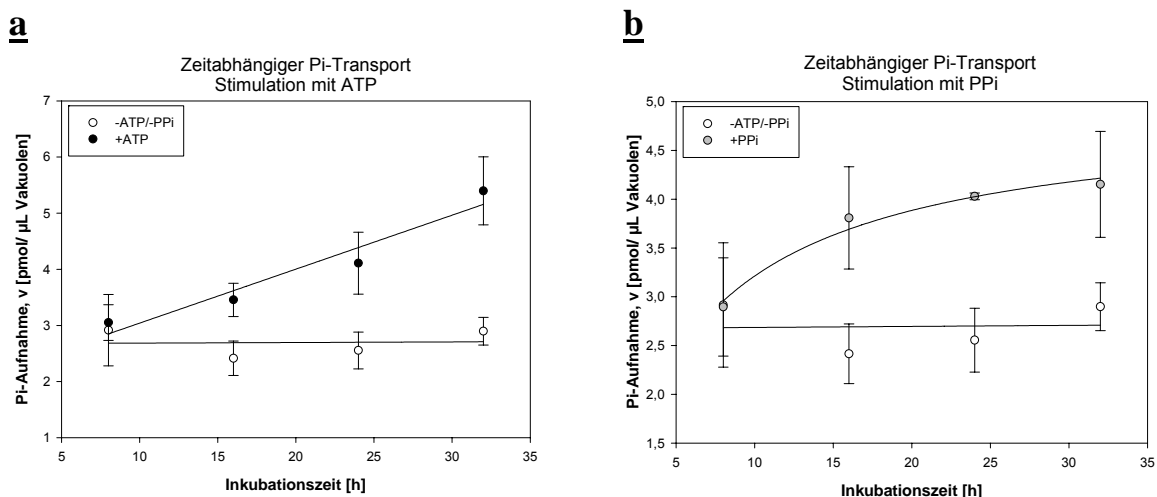
**Abbildung 3-27:** Aufnahme von [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>17G und [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> in intakten Vakuolen aus Tomatenzellen zum funktionellen Nachweis der Transporteigenschaften des Aufnahmesystems. Die Aufnahme wurde unter der Anwendung der Siliconöl-Filtrationszentrifugation nach 18 min Inkubation ohne ATP (-ATP), mit ATP (+ATP) und in der Anwesenheit von ATP und Vanadat (+ATP/+Vanadat) untersucht. Die Konzentration von Vanadat war 1 mM. Die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>17G wurde in der Gegenwart von 10 µM unmarkiertem E<sub>2</sub>17G gemessen. Das Vakuolenvolumen wurde anhand des aufgenommenen [<sup>14</sup>C]Glycerols bestimmt. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert  $n \pm SD$  ( $n=6$ ) dar.

#### 3.4.3.4 Pi-Transportstudien

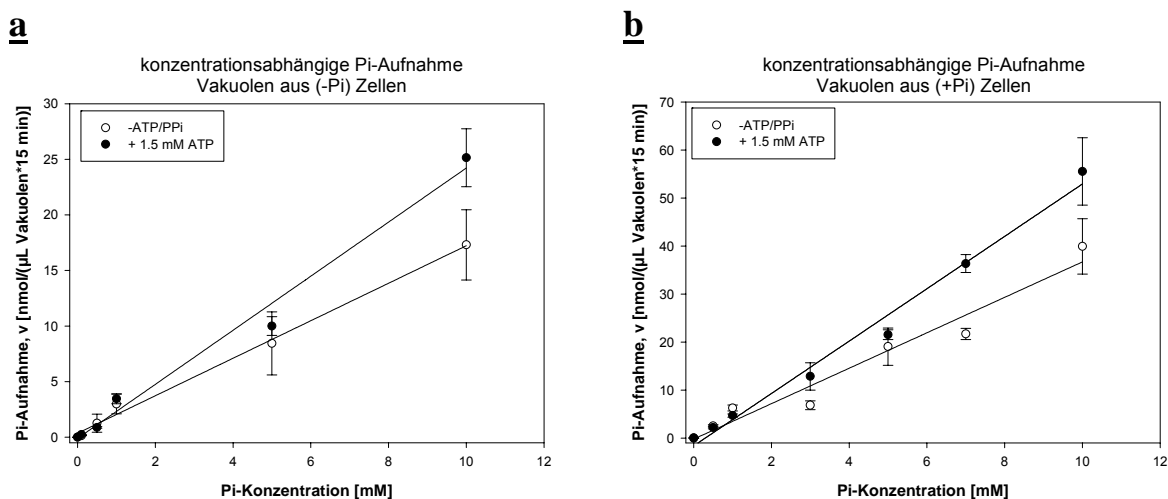
Der Pi-Transport in intakten Vakuolen wurde in Abhängigkeit von der Zeit und der extrazellulären Pi-Konzentration untersucht. Die zeitabhängige Pi-Aufnahme wurde mit Vakuolen aus -Pi-Zellen durchgeführt und ist in Abbildung 3-28 dargestellt.

Die ATP-angeregte Pi-Aufnahme zeigte nach 30 min Inkubation eine 1.7-fach erhöhte Transportgeschwindigkeit und verlief damit sehr langsam (Abbildung 3-28a). Die Pi-Aufnahme blieb in der Gegenwart von ATP für mindestens 30 min linear. Der Pi-Transport verlief in der Anwesenheit von P<sub>i</sub> ebenfalls sehr langsam, wobei eine Sättigung der Kinetik festzustellen war (Abbildung 3-28b). In einem zweiten Experiment wurde die konzentrationsabhängige Pi-Aufnahme betrachtet. Abbildung 3-29 zeigt die Aufnahme in Vakuolen aus -Pi- und +Pi-Tomatenzellen. Als Energetisierungsquelle wurde ATP eingesetzt. Auf der Basis der zeitabhängigen Pi-Aufnahme wurde eine Inkubationszeit von 15 min

gewählt. Innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches blieb die Pi-Kinetik sowohl in Vakuolen aus +Pi-Zellen, als auch in Vakuolen aus -Pi-Zellen linear. Dennoch zeigten die Vakuolen aus +Pi-Zellen eine deutlich höhere Transportgeschwindigkeit. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Pi-Aufnahme durch die Zugabe von Mg-ATP stimuliert wird. Dies weist darauf hin, dass der Übertritt von Pi in die Vakuole durch die V-Typ-ATPase H<sup>+</sup>-Pumpe vermittelt werden könnte.



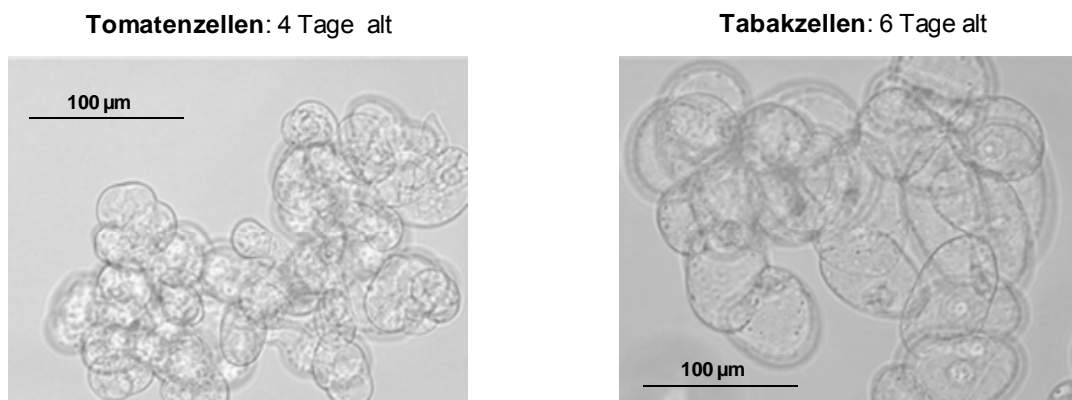
**Abbildung 3-28:** Die zeitabhängige Pi-Aufnahme durch den Tonoplasten intakter Vakuolen aus -Pi-Tomatenzellen war (a) ATP bzw. (b) PPI-abhängig. Trotzdem verlief der Transport sehr langsam. Um unspezifische Bindungen zu vermindern, wurde 100 μM unmarkiertes Pi zugesetzt. Die Vakuolen wurden mit 0.1 μCi (3.7 kBq) [<sup>33</sup>P]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> innerhalb 8, 16, 24 und 32 min inkubiert. Gleichzeitig wurde zur Bestimmung der Menge an flotierten Vakuolen 0.1 μCi (3.7 kBq) [<sup>3</sup>H]H<sub>2</sub>O zum Aufnahme-medium zugegeben. Die Radioaktivität wurde anhand doppelter <sup>3</sup>H-<sup>33</sup>P-Markierung im Szintillationszähler gemessen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert n ± SD (n=6) eines repräsentativen Experiments dar.



**Abbildung 3-29:** Der konzentrationsabhängige Pi-Transport durch den Tonoplasten intakter Vakuolen aus (a) -Pi- und (b) +Pi-Tomatenzellen blieb im untersuchten Konzentrationsbereich linear. Die Aufnahme wurde durch die Zugabe von Mg-ATP stimuliert. Die Vakuolen wurden mit 0.1 μCi (3.7 kBq) [<sup>33</sup>P]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in der Gegenwart steigender Konzentrationen an unmarkiertem Pi inkubiert. Zur Bestimmung der Menge an flotierten Vakuolen wurde gleichzeitig 0.1 μCi (3.7 kBq) [<sup>3</sup>H]H<sub>2</sub>O zum Aufnahme-medium zugegeben. Die Radioaktivität wurde anhand doppelter <sup>3</sup>H-<sup>33</sup>P-Markierung im Szintillationszähler gemessen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert n ± SD (n=6) eines repräsentativen Experiments dar.

### 3.5 *In vivo* $^{31}\text{P}$ -NMR Studien zur Aufnahme und subzellulären Anreicherung von Pi und Phi

Der Transport, die subzelluläre Verteilung, der Metabolismus von Phi, sowie dessen Wechselwirkung mit dem Pi-Stoffwechsel in Pflanzenzellen wurden mittels *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR untersucht. Für die *in vivo* NMR-Studien wurden Tomaten- und Tabaksuspensionszellen verwendet. Abbildung 3-30 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von Tomaten- und Tabakzellen. Die Tomatenzellen erwiesen sich allerdings als ein ungeeignetes Modellsystem für *in vivo* NMR-Messungen. Aufgrund der sehr kleinen Zellgröße (im Durchschnitt 25  $\mu\text{m}$ ) wurden die Zellen im NMR-Röhrchen sehr dicht gepackt. Vermutlich wurde dadurch eine gleichmäßige Verteilung des Mediums zwischen den Zellen verhindert und der Nährstoff- bzw. Sauerstoffmangel führte zum schnellen Absterben der Zellen (vgl. Anhang Kapitel 7.7). Die Tabakzellen hatten dagegen einen durchschnittlichen Durchmesser von 50  $\mu\text{m}$  und waren im verwendeten Perfusionssystem wesentlich stabiler. Für alle *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Experimente wurden darum Tabakzellen verwendet.



**Abbildung 3-30:** Mikroskopische Aufnahmen von Tomaten- und Tabakzellen. Die Bilder zeigen Tomatenzellen aus 4 Tage alter Suspensionskultur und Tabakzellen aus 6 Tage alter Suspensionskultur.

#### 3.5.1 Pi-Stoffwechsel nach Pi-Mangel

Abbildung 3-31 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Experimentes, in dem  $-\text{Pi}$ -Tabakzellen mit Pi behandelt wurden. Zunächst wurden die Zellen in der Versuchsapparatur drei Stunden lang mit Nährmedium ohne Pi perfundiert, sodass ein Gleichgewichtszustand (semi steady-state) erreicht wurde (Abbildung 3-31a, Spektrum A). Nach drei Stunden ( $t=0$ ) wurde 1 mM Pi zum Perfusionsmedium gegeben.

Die große Zellmasse und die hohe Zelldichte ermöglichten die Aufnahme von Spektren mit relativ großem Signal/Rausch-Verhältnis. Das erlaubte eine gute Identifizierung der Pi-haltigen Metaboliten wie z. B. Glukose-6-Phosphat (G6P, 4.98 ppm), UDP-Glukose (UDPG,



-10.53 und -11.97 ppm) und  $\gamma$ -,  $\alpha$ - und  $\beta$ -NTPs (-4.93, -9.98 bzw. -18.71 ppm). Es waren zwei getrennte Signale für Pi zu erkennen. Die chemischen Verschiebungen der Signale entsprachen pH-Werten von 7.6 und 5.6 (vgl. Anhang Kapitel 0). Das wies darauf hin, dass ein Signal von cytoplasmatischem Pi (hoher pH, cyt Pi, 2.98 ppm) und eines von vakuolärem Pi (niedriger pH, vac Pi, 0.94 ppm) kam. Es konnten daher zwei getrennte intrazelluläre Pi-Pools unabhängig voneinander detektiert werden (cyt Pi und vac Pi).

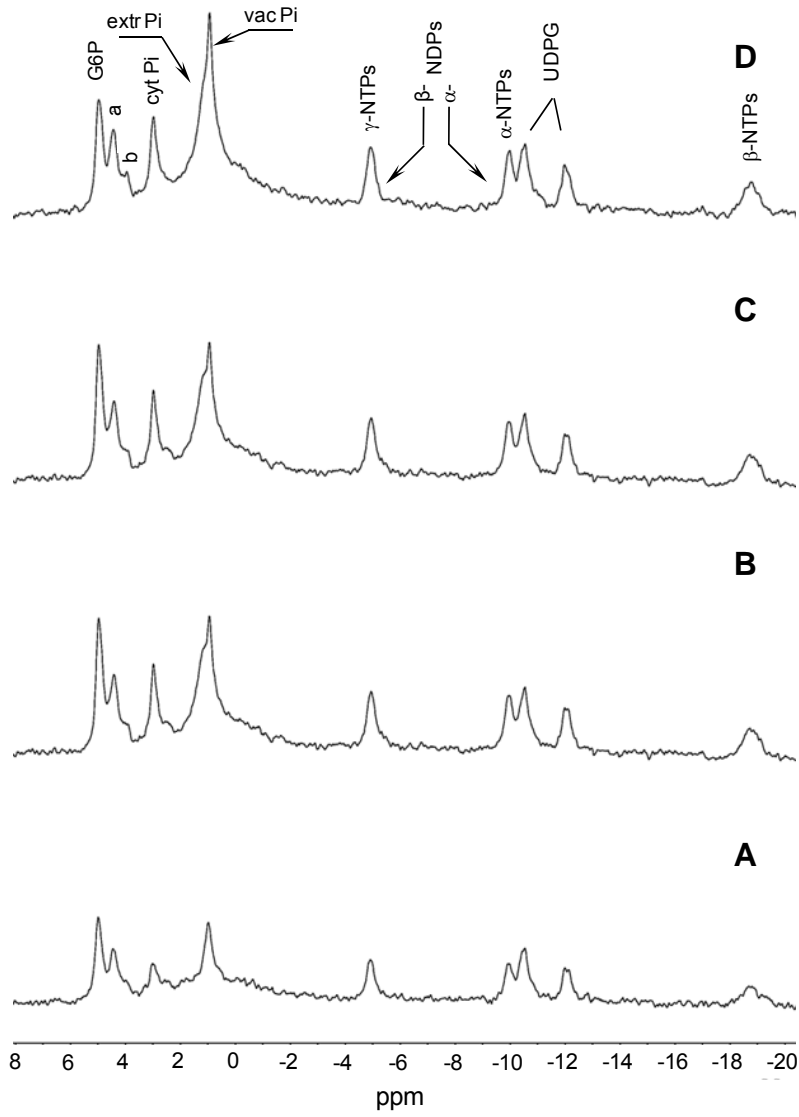
In Abbildung 3-31a, Spektrum D sind Signale („a“ und „b“) zu erkennen, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Signal „a“ (4.2 ppm) könnte auf Phosphomonoester wie z. B. Phosphoethanolamin, Phosphoglycerat, Nukleosidmonophosphate oder auf Zuckerphosphate wie z. B. Fruktose-6-Phosphat oder Ribose-5-Phosphat zurückgeführt werden. Signal „b“ (3.81 ppm) entsprach die Position von NADP(H) und Phosphocholin (Roby *et al.*, 1987b, Gout *et al.*, 1992a).

Die Zugabe von Pi nach drei Stunden führte zu einer Zunahme der Signalintensitäten von G6P,  $\gamma$ -,  $\alpha$ -, und  $\beta$ -NTPs, cyt Pi und vac Pi. Die Intensitäten der NTPs nahmen über acht Stunden stetig zu und blieben bis zum Ende des Experimentes gleichmäßig hoch. Im Gegensatz dazu waren Signale der  $\beta$ - und  $\alpha$ -NDPs nicht zu detektieren. Das hohe NTP/NDP-Verhältnis deutete auf eine hohe Energieladung der Zellen hin. Die hohe Intensität von G6P über das gesamte Experiment wies darauf hin, dass stets ausreichend Nährstoffe und Sauerstoff im Medium zur Verfügung standen. Übereinstimmend damit blieben die Zellen im Perfusionssystem für mehr als 20 h vital.

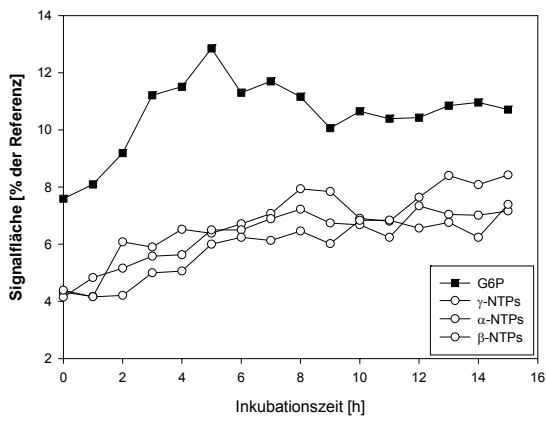
Die Quantifizierung von cyt Pi und vac Pi machte den Verlauf der Pi-Aufnahme und Verteilung in den Zellen deutlich (Abbildung 3-31c). Während der ersten vier Stunden akkumulierte Pi gleichzeitig in Cytoplasma und Vakuolen. Gleichzeitig war auch eine Zunahme von G6P zu beobachten. Danach schien ein Schwellenwert für cyt Pi und G6P erreicht, der von den Zellen annähernd konstant gehalten wurde. Die weitere Pi-Aufnahme der Zellen führte direkt zur Erhöhung von vac Pi. Das hatte aber keinen Einfluss auf cyt Pi und G6P.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Pi-Zugabe zu Pi-verarmten Zellen weitreichende Stoffwechseländerungen zur Folge hatte. Cyt Pi, G6P und NTPs erreichten nach wenigen Stunden einen erhöhten Schwellenwert, der einen aktivierten Stoffwechsel anzeigte. Dieser Stoffwechselzustand zeigte deutliche Unterschiede zum limitierten Stoffwechsel bei Pi-Mangel. Extrazelluläres Pi wurde während des gesamten Versuches kontinuierlich von den Zellen aufgenommen und in den Vakuolen gespeichert.

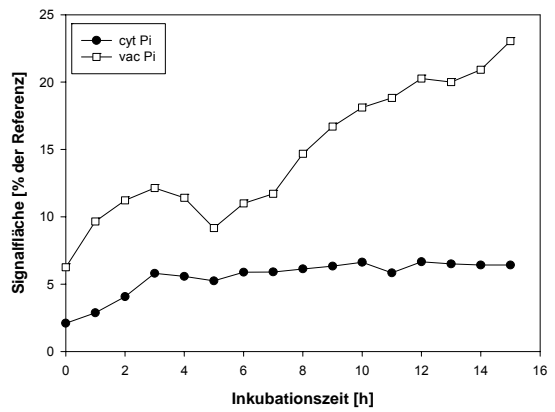
**a**



**b**



**c**



### 3.5.2 Zuordnung von Phi zu Cytoplasma und Vakuolen

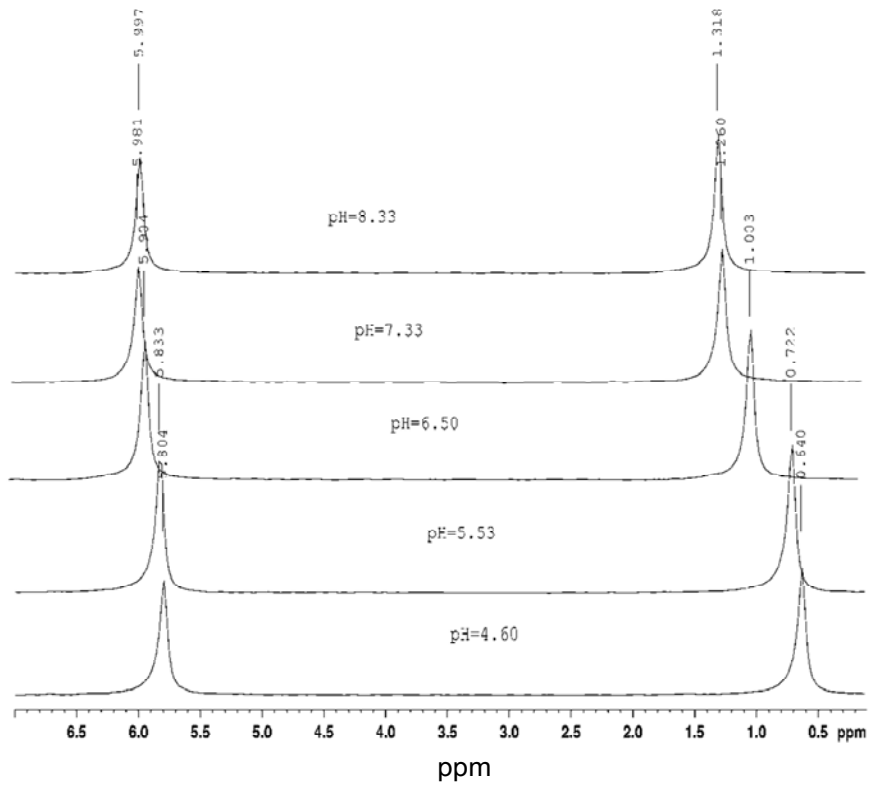
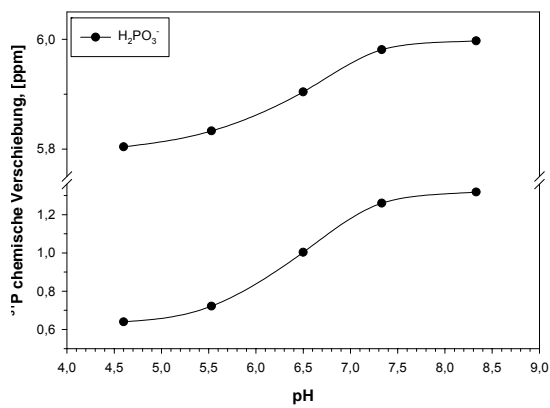
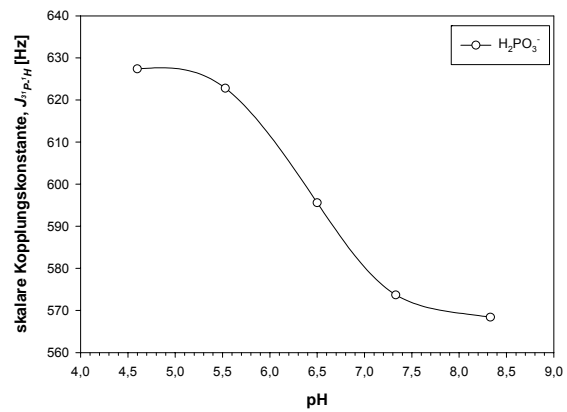
Um die Phi-Signale in den Spektren der Experimente lokalisieren zu können, wurde die chemische Verschiebung von Phi in Abhängigkeit des pH-Wertes untersucht. Dazu wurden  $\text{KH}_2\text{PO}_3$ -Lösungen mit pH 8.33, 7.33, 6.50, 5.53 und 4.60 hergestellt und deren Spektren aufgenommen. Die Spektren sind in Abbildung 3-32 dargestellt.

Phi erschien im NMR-Spektrum als Dublette. Die Aufspaltung der Resonanzlinie von Phi ist durch den skalaren Kopplungseffekt zwischen den Proton- und Phosphorkernen des Phi-Moleküls bedingt (vgl. Abbildung 1-5). Dabei entspricht die skalare Kopplungskonstante ( $J$ ) dem Abstand der Linien in einem Multiplette und wird in Hz angegeben.

Die Titrationskurven zeigten, dass im Bereich von pH 4.5 bis 7.5 sowohl die chemische Verschiebung als auch die skalare Kopplungskonstante sehr sensitiv gegenüber pH-Änderungen waren. Weil Vakuolen gegenüber dem Cytoplasma deutlich saurer sind, war die subzelluläre Lokalisierung der Phi-Signale anhand der pH-abhängigen chemischen Verschiebung möglich.



**Abbildung 3-31:** Die Zugabe von Pi zu Pi-verarmten Zellen führte zu einer Stoffwechselaktivierung. Repräsentative *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von BY-2 Tabakzellen (-Pi-Zellen) nach einer Zugabe von Pi. Die Zellen wurden zunächst mit sauerstoffreichem, Pi-freiem Medium in einen Gleichgewichtszustand (semi steady-state) gebracht. Danach wurde 1 mM Pi zugegeben ( $t=0$  bei Pi-Zugabe). **a:** *In vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren. Spektrum A: steady-state der Zellen; Spektrum B: 5 h Inkubation mit Pi; Spektrum C: 10 h Inkubation mit Pi; Spektrum D: 16 h Inkubation mit Pi. Zuordnung der NMR-Signale: G6P, Glukose-6-Phosphat; Signal „a“, Phosphomonoester und Zuckerphosphate wie z. B. Fruktose-6-Phosphat, Ribose-5-Phosphat; Signal „b“, NADP(H) und Phosphocholin; cyt Pi, cytoplasmatisches Pi; extr Pi, extrazelluläres Pi; vac Pi, vakuoläres Pi;  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -NTPs,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Nukleosidtriphosphate;  $\alpha$ - und  $\beta$ -NDPs,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Nukleosiddiphosphate (nicht nachweisbar); UDPG, Uridin-5'-diphosphat- $\alpha$ -D-Glukose. **b** und **c:** Relative Quantifizierung wichtiger Metabolite des Phosphatstoffwechsels. Die Signalflächen sind als % der Signalfläche der Referenzsubstanz (MDP) angegeben. Dazu wurde die TopSpin Software (Bruker) verwendet. MDP (16.91 ppm) ist nicht in den Spektren gezeigt.

**a****b****c**

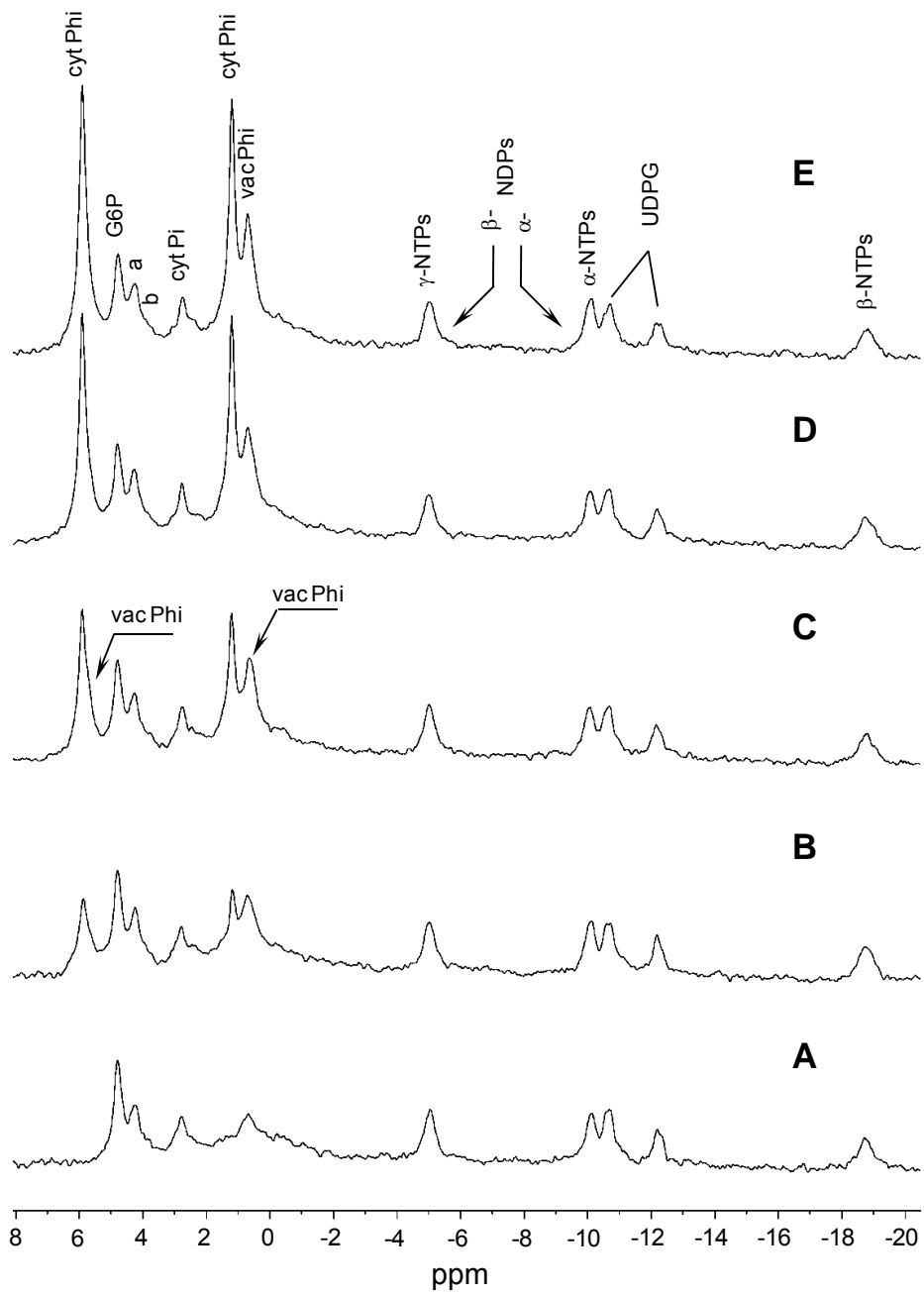
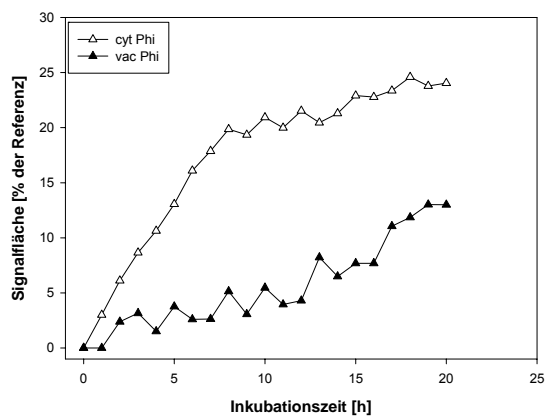
**Abbildung 3-32:**  $^{31}\text{P}$  chemische Verschiebung von Phi in Abhängigkeit des pH-Wertes. **a:** Die Spektren wurden bei Raumtemperatur und bei den im Bild angegebenen pH-Werten aufgenommen. Sowohl die **(b)** chemische Verschiebung als auch die **(c)** skalare Kopplungskonstante zeigten sich sensitiv gegenüber pH-Änderungen. Besonders ausgeprägt war die pH-Abhängigkeit beider Parameter im pH-Bereich von 4.5 bis 7.5. Dies ermöglichte die subzelluläre Lokalisierung der Phi-Signale.

### 3.5.3 Der Einfluss von Phi auf den Pi-Stoffwechsel nach Pi-Mangel

Zu  $\text{-Pi}$ -Zellen im semi steady-state (nach 3 h) wurde statt Pi (vgl. Kapitel 3.5.1) 1 mM Phi gegeben (Abbildung 3-33a). Anhand der NMR-Spektren konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass Phi von BY-2 Zellen aufgenommen wurde und sowohl im Cytoplasma als auch in der Vakuole akkumulierte. Die Phi-Dublette (5.90 und 1.19 ppm) mit der größten Signalintensität entsprach einem pH-Wert von 7.3, was auf eine cytoplasmatische Akkumulation hinwies (Abbildung 3-33a). Die Intensität der Phi-Dublette, welche der chemischen Verschiebung bei einem pH-Wert von 5.5 und damit der vakuolären Lokalisation entsprach, war deutlich kleiner. Durch Subtraktion der Spektren (Abbildung 3-34) wurde noch deutlicher erkennbar, dass nur ein relativ kleiner Teil des Phi auch in die Vakuole transportiert wurde. Die Quantifizierung der Signalintensitäten in Abbildung 3-33b zeigte, dass die cytoplasmatische Phi-Akkumulation nach 8 h einen Schwellenwert erreichte, nach dem sich die weitere Akkumulation von Phi deutlich verlangsamte. Der Transport von Phi in die Vakuole verlief kontinuierlich, aber langsamer als seine cytoplasmatische Akkumulation. Die vakuoläre Phi-Konzentration erreichte innerhalb des betrachteten Zeitraums keine erkennbare Sättigung.

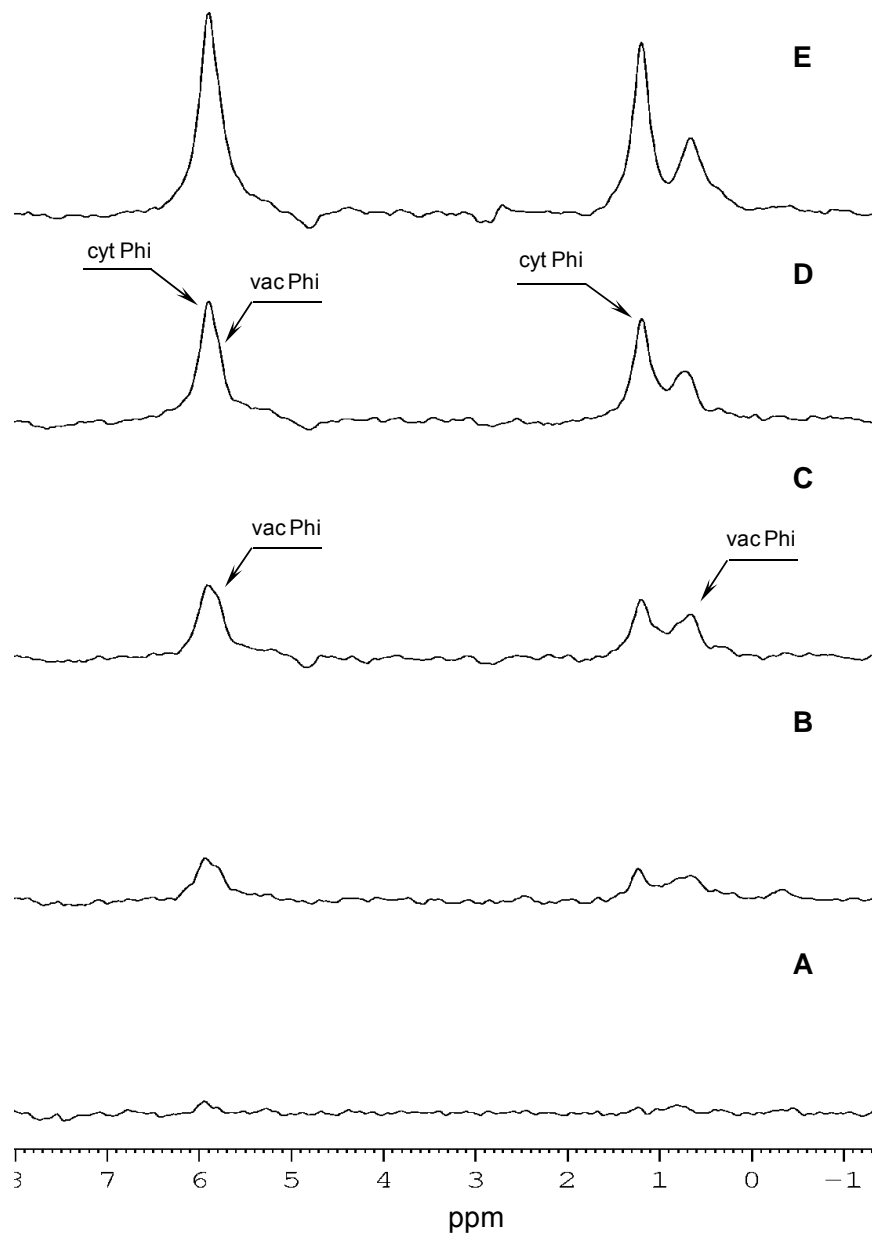
Die Behandlung mit Phi übte keinen erkennbaren Einfluss auf den metabolischen Zustand der Zellen aus. Während der gesamten Versuchsdauer traten keinerlei Signale auf, die auf eine Interaktion oder eine Reaktion von Phi mit zellulären Metaboliten hindeuteten. Ähnlich wie bei der Perfusion mit Pi waren auch hier keine  $\beta$ - und  $\alpha$ -NDPs, sondern nur NTPs zu detektieren, was auf eine ausreichende Energieladung der Zellen hinwies. Die Phi-Behandlung hatte keinen erkennbaren Einfluss auf das NTP/NDP-Verhältnis. Weiterhin war keine Änderung der Signalintensität von G6P festzustellen.

Zusammengefasst wiesen die Ergebnisse auf einen intakten Energiestoffwechsel der BY-2 Zellen auch nach Phi-Zugabe hin, der weitgehend dem semi steady-state bei Pi-Mangel entsprach. Phi zeigte eine überwiegende cytoplasmatische Akkumulation. Anders als Pi (vgl. Abbildung 3-31c), wurde Phi kaum in der Vakuole gespeichert. Es konnten keine Anhaltspunkte für eine zellschädigende Wirkung oder eine Stoffwechselstörung der Zellen durch Phi festgestellt werden.

**a****b**



**Abbildung 3-33:** In der Anwesenheit von Phi blieb der Stoffwechsel der -Pi-Tabakzellen intakt. *In vivo* <sup>31</sup>P-NMR von BY-2 Tabakzellen nach Zugabe von Phi. Die Zellen wurden zunächst mit sauerstoffangereichertem, Pi-freiem Medium zum semi steady-state gebracht. Danach wurde 1 mM Phi zugegeben. Aus den aufgenommenen Spektren ergab sich eine deutliche cytoplasmatische Akkumulation von Phi. Phi wurde aber auch in geringen Mengen in die Vakuolen aufgenommen. Die Zuordnung der Phi-Signale fand durch einen Vergleich mit den in Abbildung 3-32 dargestellten pH-Titrationskurven statt (cyt Phi, cytoplasmatisches Phi; vac Phi, vakuoläres Phi). Die Zuordnung der Signale wurde wie in Abbildung 3-31 vorgenommen. a: *In vivo* <sup>31</sup>P-NMR-Spektren. Spektrum A: semi steady-state der Zellen; Spektrum B: 3 h Inkubation mit Phi; Spektrum C: 6 h Inkubation mit Phi; Spektrum D: 11 h Inkubation mit Phi; Spektrum E: 15 h Inkubation mit Phi. b: Relative Quantifizierung von cyt und vac Phi. Die Signalflächen sind als % der Signalfläche der Referenzsubstanz (MDP) angegeben. Dazu wurde die TopSpin Software (Bruker) verwendet. MDP (16.91 ppm) ist nicht in den Spektren gezeigt.

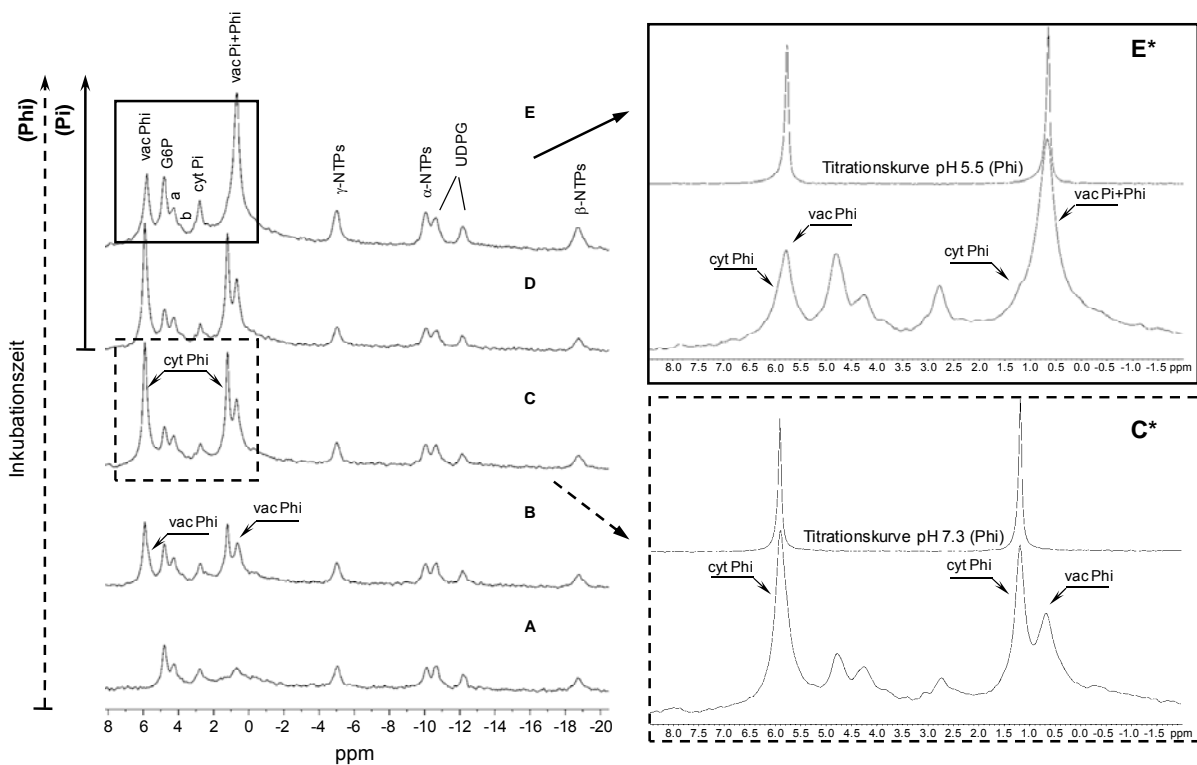


**Abbildung 3-34:** Subtraktion der aufgenommenen Spektren nach Perfusion mit Phi. Die Akkumulation von Phi in Cytoplasma und in den Vakuolen ist in der Subtraktion noch deutlicher zu erkennen. Spektrum A: 20 h (semi steady-state der Phi-Akkumulation) – 19 h; Spektrum B: 20 h – 13 h; Spektrum C: 20 h – 9 h; Spektrum D: 20 h – 6 h; Spektrum E: 20 h – 2 h.

### 3.5.4 Der Einfluss von Pi in Phi-gesättigten Zellen

Die Perfusion der  $-Pi$ -Zellen mit Pi zeigte, dass die Zellen überschüssiges Pi in den Vakuolen akkumulierten. Demgegenüber war der Transport von Phi in die Vakuolen kein favorisierter Prozess. Es stellte sich darum die Frage, ob die Phi-Verteilung in Cytoplasma und Vakuolen durch Pi beeinflusst werden könnte.

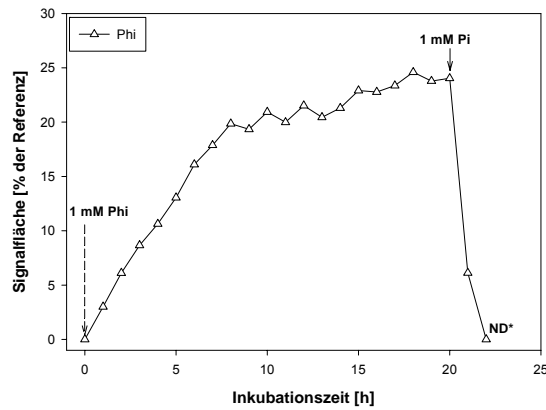
Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden Phi-gesättigte Zellen mit Pi behandelt. Nach 20 h wurde Pi zum Medium zugegeben. Abbildung 3-35 zeigt, dass die Zugabe von Pi einen schnellen Efflux von Phi ins Medium zur Folge hatte. Das cytosolische Phi-Signal verschwand innerhalb von 3 h. Ein kleiner Teil des cytoplasmatischen Phi wurde dabei auch in die Vakuole transportiert (Abbildung 3-37). Ferner führte die Gegenwart von Pi zu einer sofortigen Zunahme der detektierbaren Metabolite (Abbildung 3-36). Das wies auf eine ähnliche Stoffwechselaktivierung, wie zuvor unter Kapitel 3.5.1 beschrieben, hin.



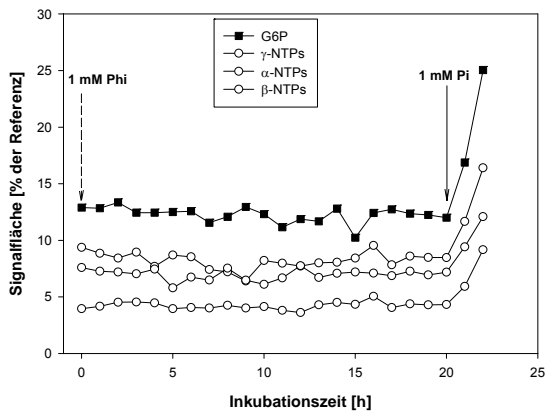
**Abbildung 3-35:** Influx und Efflux von xenobiotischem Phi in Abhängigkeit vom extrazellulären Pi-Status. Die Abbildung stellt die aufgenommenen *in vivo*  $^{31}P$ -NMR-Spektren dar. Unter Pi-Mangelbedingungen wurde Phi überwiegend im Cytosol akkumuliert (pH 7.3, Spektren C, C\*). Die Zugabe von Pi zu den Phi-gesättigten Zellen führte zum Efflux der cytosolischen Phi-Signale (Spektren E, E\*). Spektrum A: semi steady-state der  $-Pi$ -Zellen; Spektrum B: 6 h Inkubation mit Phi; Spektrum C: 20 h Inkubation mit Phi (semi steady state der Phi Akkumulation); Spektrum D: 21 h Inkubation mit Phi und 1 h nach Pi Zugabe; Spektrum E: 22 h Inkubation mit Phi und 2 h nach Pi Zugabe. Die Zuordnung der Signale wurde wie in Abbildung 3-31 vorgenommen. Als externe Referenzsubstanz wurde MDP benutzt. MDP (16.91 ppm) ist nicht in den Spektren gezeigt.



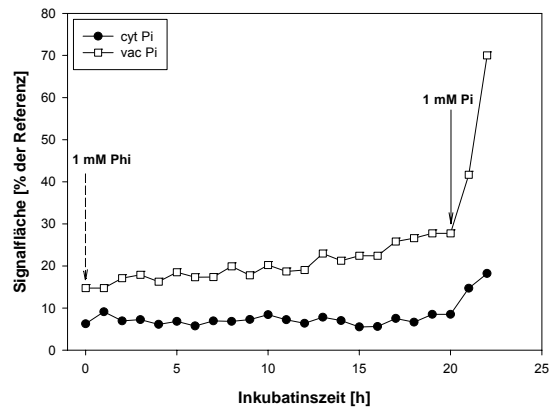
**a**



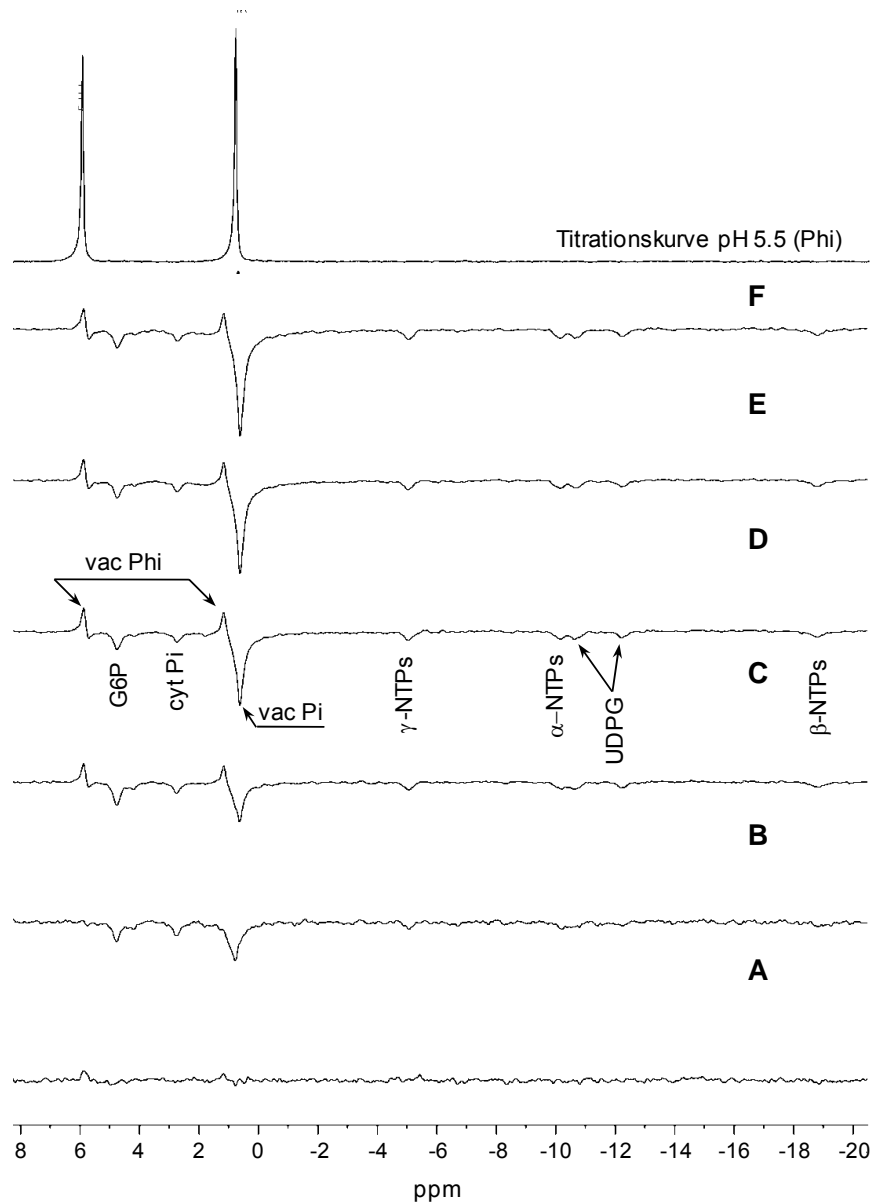
**b**



**c**



**Abbildung 3-36:** Relative Quantifizierung der NMR-Signale vor und nach Pi-Zugabe zu Phi-gesättigten Zellen. **a:** Relative Quantifizierung des cytoplasmatischen Phi-Signals. ND\*: Die Auswertung der Signalintensität war nicht möglich, aber so niedrig, dass sie im Diagramm als „0“ festgelegt wurde. **b** und **c:** Relative Quantifizierung wichtiger Metabolite des Phosphatstoffwechsels. Die Signalfächen sind als % der Signalfäche der Referenzsubstanz (MDP) angegeben. Dazu wurde TopSpin Software (Bruker) verwendet. Die leichte Zunahme der Signalintensität des vakuolären Pi-Signals war auf die vakuoläre Phi-Akkumulation zurückzuführen.

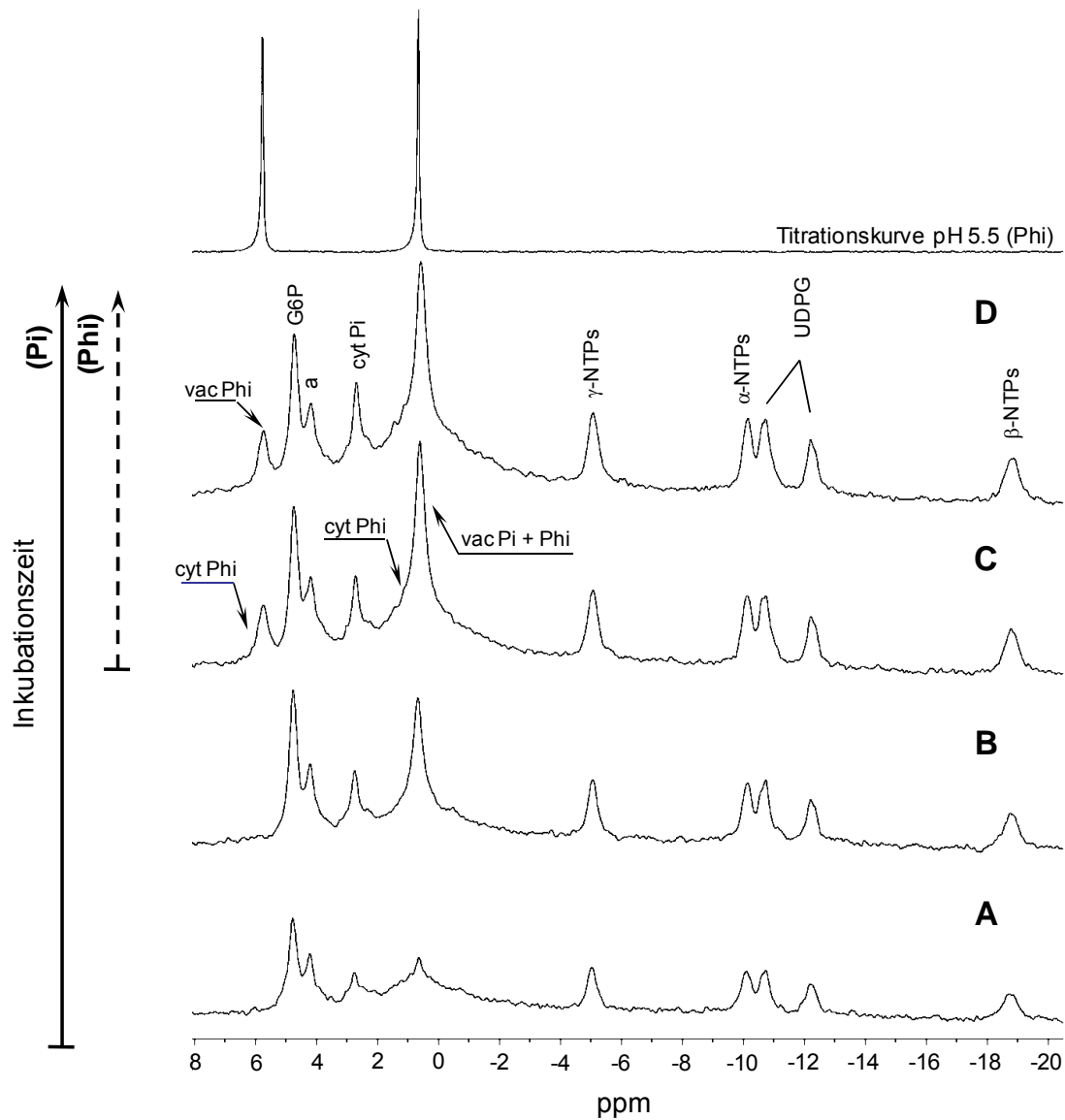


**Abbildung 3-37:** Ein kleiner Teil des cytoplasmatischen Phi wurde in das vakuoläre Kompartiment verschoben. Subtraktion der aufgenommenen Spektren nach Zugabe von Pi zu Phi-gesättigten Zellen. Spektrum A: 20 h (semi steady-state der Phi-Akkumulation) – 21 h; Spektrum B: 20 h – 22 h; Spektrum C: 20 h – 23 h; Spektrum D: 20 h – 24 h; Spektrum E: 20 h – 25 h; Spektrum F: 20 h – 26 h. Die Zuordnung der Signale wurde wie in Abbildung 3-31 vorgenommen.

### 3.5.5 Phi-Anreicherung in Pi-gesättigten Zellen

Zur weiteren Charakterisierung der Phi-Aufnahme und seiner subzellulären Kompartimentierung wurden Pi-gesättigte Zellen mit Phi behandelt. Aus den Spektren in Abbildung 3-38 ist zu erkennen, dass die Zellen vorzugsweise Pi statt Phi akkumulierten. Das stimmte mit den Ergebnissen aus den Transportstudien überein (vgl. Kapitel 3.4). Die Phi Signale waren ausschließlich vakuolär lokalisiert. Im Gegensatz dazu war cytoplasmatisches Phi kaum detektierbar. Dies zeigte klar, dass Zellen, die mit Pi ausreichend versorgt waren,

Phi unmittelbar in der Vakuole akkumulierten. Zellen, die Pi-Mangel erlitten, zeigten diese Transporteigenschaften nicht.

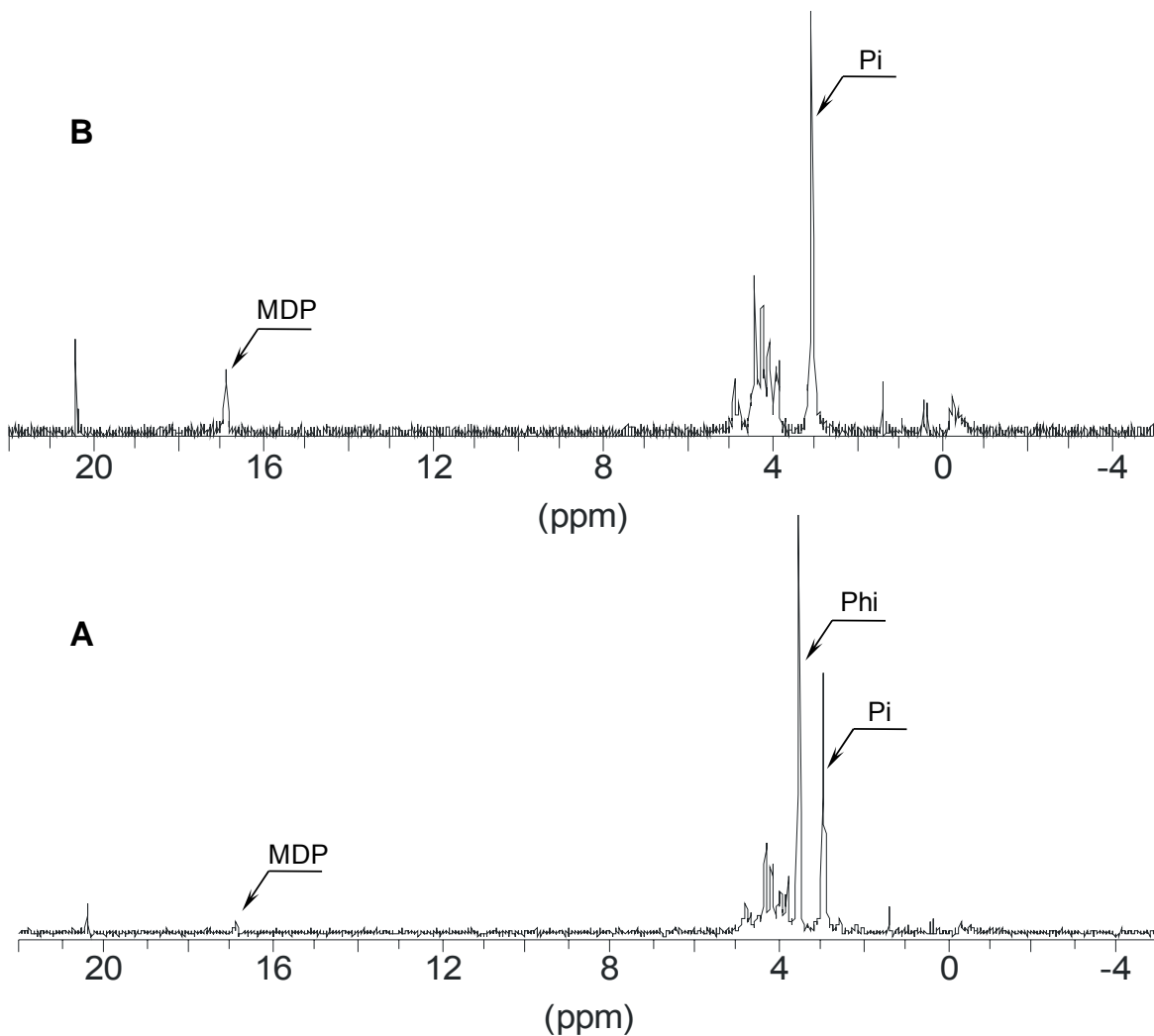


**Abbildung 3-38:** Pi-gesättigte Zellen akkumulierten Phi direkt in den Vakuolen. Die chemische Verschiebung der Phi-Signale entsprach pH 5.5. Spektrum A: semi steady-state der  $-\text{Pi}$ -Zellen; Spektrum B: 4 h Inkubation mit Pi; Spektrum C: 11 h Inkubation mit Pi und 7 h nach Phi-Zugabe; Spektrum D: 17 h Inkubation mit Pi und 13 h nach Phi-Zugabe. Die Zuordnung der Signale wurde wie in Abbildung 3-31 vorgenommen. Als externe Referenzsubstanz wurde MDP benutzt. MDP (16.91 ppm) ist nicht in den Spektren gezeigt.

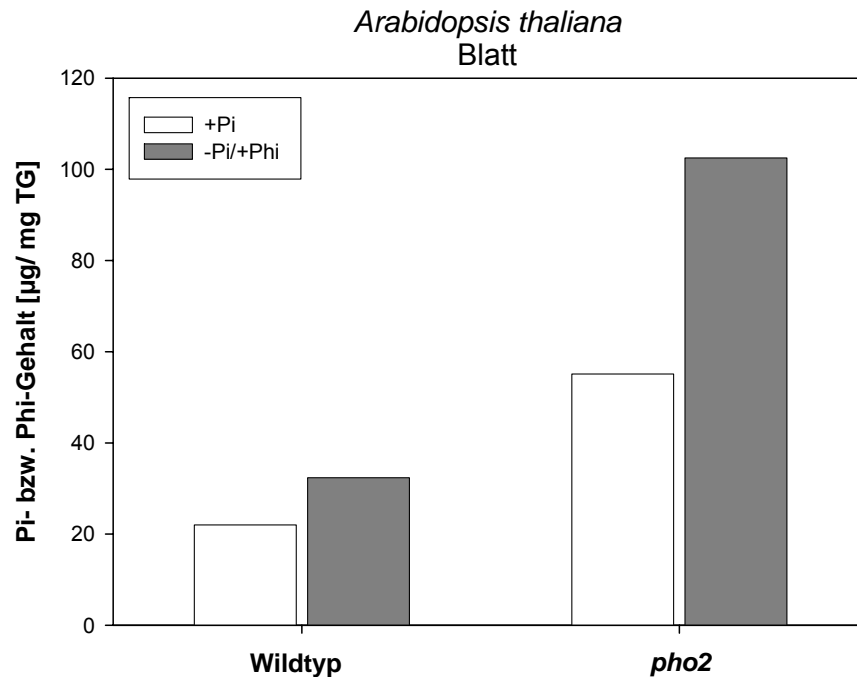
### 3.6 Transportstudien in ganzen Pflanzen mittels *in vitro* $^{31}\text{P}$ -NMR

Auf zellulärer Ebene wurde gezeigt, dass Phi mit der Pi-Aufnahme über das hoch-affine Pi-Transportsystem kompetiert und intrazellulär akkumuliert. Es stellte sich die Frage, ob nach der Wurzel Aufnahme eine nachfolgende Allokation von Phi innerhalb der Pflanzenorgane stattfindet und ob diese Allokation über die gleichen Mechanismen wie für Pi erfolgt. Um

einen Einblick in die Transportprozesse für Pi und Phi zu erhalten, wurde die Verteilung beider Stoffe auf Pflanzenorganebene in Wildtyp-Pflanzen und der *pho2*-Mutante aus *A. thaliana* untersucht. Die Pflanzen wurden unter verschiedenen Bedingungen mit Pi (+Pi) und ohne Pi aber mit Phi (-Pi/+Phi) kultiviert. Pi und Phi wurden jeweils in einer Konzentration von 0.5 mM eingesetzt. Nach einer Woche Inkubation wurde die Pi- und Phi-Verteilung in den einzelnen Pflanzenteilen sowohl der Wildtyp-Pflanze als auch der *pho2*-Mutante untersucht. Die Quantifizierung von Pi und Phi erfolgte durch *in vitro*  $^{31}\text{P}$ -NMR nach einer Extraktion mit Perchlorsäure (Abbildung 3-39). Abbildung 3-40 (weiße Balken) zeigt, dass die *pho2*-Mutante 3-fach mehr Pi in Blättern als die Wildtyp-Pflanze akkumuliert. Gleichzeitig akkumulierte die *pho2*-Mutante 5-fach mehr Phi in Blättern als die Wildtyp-Pflanze (graue Balken). Dies lässt vermuten, dass die gleichen Mechanismen für die Allokation von Pi und Phi innerhalb der Pflanzenorgane verantwortlich sind.



**Abbildung 3-39:** Repräsentative  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren zum Nachweis von Pi und Phi in Blattextrakten der *pho2*-Mutante aus *A. thaliana*. Spektrum A: Blattextrakt nach Wachstum der *pho2*-Mutante auf +Pi-Medium; Spektrum B: Blattextrakt nach Wachstum der *pho2*-Mutante auf -Pi/+Phi-Medium.



**Abbildung 3-40:** In Blättern der *pho2*-Mutante wird sowohl Pi als auch Phi überakkumuliert. Es wurde eine 3- bzw. 5-fach höhere Akkumulation von Pi und Phi als in Blättern der Wildtyp-Pflanzen nachgewiesen. Vermutlich findet die Allokation von Pi und Phi innerhalb der Pflanze über die gleichen Mechanismen statt. Die *Arabidopsis*-Pflanzen wurden für eine Woche als Hydrokultur auf Medium mit und ohne Pi kultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen für eine weitere Woche auf Medium mit Pi (+Pi) bzw. ohne Pi aber mit Phi (-Pi/+Phi) kultiviert. Phi wurde in einer Konzentration von 0.5 mM angewandt. Die Daten stellen den Mittelwert einer Doppelbestimmung in einem repräsentativen Experiment dar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Pi-Aufnahmesysteme von Tomaten- und Tabakzellen

Pflanzen besitzen verschiedene Pi-Transporter, die bei der Aufnahme von Pi und der Aufrechterhaltung der Pi-Homöostase eine wichtige Rolle spielen. Das stark limitierte Angebot an freiem Pi in natürlichen Ökosystemen erfordert meist eine Aufnahme von Pi über das hoch-affine Pi-Transportsystem. Das wissenschaftliche Interesse galt daher stets vor allem hoch-affinen Pi-Transportern, die von zahlreichen Pflanzenarten molekular und nach Struktur und Transportmechanismus charakterisiert wurden (Pao *et al.*, 1998, Bucher, 2007). In dieser Arbeit stellte sich zuerst die Frage, ob Phi über ein Pi-Transportsystem in Pflanzenzellen aufgenommen wird und wie Phi mit der normalen Funktion des Pi-Transportsystems interferiert. Um diese Frage zu bearbeiten, wurde zunächst die Wechselwirkung von Phi mit der Pi-Aufnahme in Suspensionskulturen aus *S. lycopersicum* und *N. tabacum* untersucht.

Zuerst wurden die Pi-Transporteigenschaften beider Modellsysteme in Abwesenheit von Phi charakterisiert. In Tomatenzellen konnten zwei unterschiedliche Aufnahmeverhalten nachgewiesen werden, die sich in ihren kinetischen Eigenschaften voneinander unterschieden. In +Pi-Zellen fand eine sehr geringe Pi-Aufnahme statt, die entweder durch ein niedrig-affines Transportsystem, oder allein durch Diffusion erklärt werden könnte. In -Pi-Zellen agierte ein hoch-affines Transportsystem, dessen Kinetik der Michaelis-Menten-Gleichung folgte. Dieses Pi-Aufnahmesystem war durch einen hohen  $V_{max}$ -Wert (32.4 pmol/(g FG\*min)) und einen niedrigen  $K_m$ -Wert (6.6  $\mu$ M; hohe Affinität) gekennzeichnet. Wenn die Zellen im Pi-haltigen Medium kultiviert wurden, zeigten sich veränderte Transporteigenschaften. Bei ausreichender Pi-Versorgung war die Pi-Aufnahme sehr gering, sodass keine kinetischen Parameter ermittelt werden konnten (Abbildung 3-18, Seite 72). Dies zeigt, dass das hoch-affine Transportsystem bei Zellen, die mit ausreichend Pi kultiviert wurden, nicht aktiv ist. Zum einen könnte dies daran liegen, dass die hoch-affinen Pi-Transporter unter diesen Bedingungen nicht exprimiert werden. Es könnte aber auch sein, dass die Transporter bei ausreichender Pi-Versorgung, zum Beispiel durch eine Phosphorylierung, inaktiviert werden. Durch Transkriptionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Regulation von *LePT2* hier auf der mRNA-Ebene erfolgt. Die Transkription des hoch-affinen Pi-Transporters wurde bei Pi-Mangel aktiviert. Bei ausreichender Pi-Versorgung waren dagegen keine Transkripte des Transporters nachweisbar. Dies wurde sowohl in Zellkulturen als auch in Tomatenpflanzen gezeigt (Abbildung 3-10, Seite 64; Abbildung 3-12, Seite 66).

Die beobachtete Induktion des hoch-affinen Pi-Transporters bei Pi-Mangel bestätigt frühere Studien, die eine vergleichbare Genexpression der hoch-affinen Transporter *LePT1* und *LePT2* aus *S. lycopersicum*, beschrieben (Liu *et al.*, 1998). Durch die Zugabe von Pi wurde in beiden Fällen die Transkription der Pi-Transporter reprimiert. Dies bedeutet, dass die Pflanzen die Verfügbarkeit von Pi wahrnehmen und durch Veränderung ihrer Transportsysteme die Anreicherung toxischer Pi-Konzentrationen verhindern können.

Weitere Pi-Aufnahmeexperimente wurden an Tabakzellkulturen unter Pi-Mangel durchgeführt. Hier konnte ein anderes Pi-Aufnahmeverhalten als in Tomate nachgewiesen werden. Die kinetischen Studien an  $-$ Pi-Tabakzellkulturen zeigten einen biphasischen Charakter der Pi-Aufnahme. Der Pi-Influx bestand aus einer sättigbaren, hoch-affinen Komponente und einer „nicht-sättigbaren Diffusionskomponente“ (Abbildung 3-22b, Seite 76). Die Sättigungskinetik der hoch-affinen Komponente konnte mit einer einfachen Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden. Die Pi-Aufnahme über die „Diffusionskomponente“ zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich einen linearen Anstieg, der keine Sättigung erreichte. Es ist möglich, aber nicht wahrscheinlich, dass die beobachtete Pi-Aufnahmerate bei hohen Pi-Konzentrationen allein durch einfache Diffusion der geladenen Pi-Anionen über die Lipiddoppelschicht der Zellmembran zustande kommt. Vermutlich ist ein bisher nicht beschriebenes Kanalprotein an diesem nicht-sättigbaren Transport beteiligt (erleichterte Diffusion).

In Protoplasten aus *N. glutinosa* besteht das Pi-Aufnahmesystem ebenfalls aus zwei Komponenten (Mettler *et al.*, 1979). Die sättigbare Komponente wurde auf einen aktiven Transport und die lineare auf eine passive Diffusion zurückgeführt. Influxisothermen von Pi mit einem dualen Charakter wurden außerdem in der Süßwasseralge *Chara corallina* und in Mesophyllzellen aus *H. vulgare* gemessen (Mimura *et al.*, 1990, Mimura *et al.*, 1998). Der in dieser Arbeit gezeigte biphasische Verlauf der Pi-Aufnahme steht aber im Gegensatz zu früheren Studien an BY-2 Tabakzellen, welche die Pi-Aufnahme nur durch eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben (Shimogawara *et al.*, 1995). Die hier gezeigte erleichterte Diffusion bei hohen Pi-Konzentrationen wurde in BY-2 Zellen bisher nicht beschrieben. Allerdings schlossen die Autoren die Möglichkeit einer passiven Diffusion nicht aus, da der Pi-Influx bei höheren Pi-Konzentrationen von Shimogawara *et al.* (1995) nicht gemessen wurde (max. 50  $\mu$ M). Der für das hoch-affine System ermittelte  $K_m$ -Wert dieser Arbeit (4.1  $\mu$ M) stimmt vergleichsweise gut mit dem von Shimogawara *et al.* (1995) festgestellten (2.5  $\mu$ M) überein. Weiterhin berichteten Shimogawara *et al.* (1995), dass Pi-Mangel den  $V_{max}$ -Wert in Tabakzellen erhöhte, d.h. die Aufnahmekapazität vergrößerte. Der

$K_m$ -Wert blieb dagegen unverändert. Dies könnte durch eine erhöhte Synthese eines Transportproteins bzw. mehrerer homologer Spezies erklärt werden.

Wie bei Tomatenzellen wurde bei Tabakzellen zusätzlich zu den Transportversuchen eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Sowohl bei Pi-Mangel als auch bei ausreichender Pi-Versorgung konnten in BY-2 Tabakzellen unveränderte Transkriptmengen der zwei hoch-affinen Pi-Transporter *NtPT1* (*Pht1;1*) und *NtPT2* (*Pht1;2*) nachgewiesen werden (Abbildung 3-22c und d, Seite 76). In Pflanzen von *N. tabacum* wurde dagegen gezeigt, dass *NtPT1* zwar konstitutiv in Wurzel- und Blattgewebe exprimiert wird, aber Pi-Mangel die Genexpression zusätzlich erhöht. Die Transkription des *NtPT2*-Transporters wurde ebenfalls durch Pi-Mangel aktiviert (Chen *et al.*, 2007). Diese Unterschiede weisen auf eine veränderte Regulation der Genexpression beider Transporter in BY-2 Zellkulturen und *N. tabacum* hin.

Obwohl eine post-transkriptionelle Regulation bisher wenig beschrieben wurde, schließen viele Autoren diese Möglichkeit nicht aus, da hoch konservierte Phosphorylierungs- und Glykosylierungsstellen in den Aminosäuresequenzen von Pi-Transportern bekannt sind, durch welche diese post-translationell reguliert werden könnten (Chiou *et al.*, 2001, Rausch *et al.*, 2002, Raghothama *et al.*, 2005). Die erhaltenen Ergebnisse aus BY-2 Zellen könnten daher zum Beispiel durch eine Überprüfung der post-translationellen Modifizierungen an *NtPT1* und *NtPT2* erweitert werden, um die Regulation des Pi-Transportsystems in diesem Zellsystem aufzuklären.

## **4.2 Phi inhibiert das hoch-affine Pi-Transportsystem**

Die Interaktion von Phi mit dem Pi-Transport wurde in dieser Arbeit durch Wettbewerbsversuche untersucht. Mittels kinetischer Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Aufnahme von Pi über das hoch-affine Pi-Transportsystem sowohl in Tomaten- als auch in Tabakzellen kompetitiv durch Phi gehemmt wurde. Der kompetitive Hemmmechanismus konnte an der Sättigungskinetik und der Eadie-Hofstee-Auftragung der Pi-Aufnahme gezeigt werden. In beiden Zellsystemen erhöht sich der  $K_m$ -Wert in der Gegenwart von Phi, während sich der  $V_{max}$ -Wert nicht verändert. Dies deutet darauf hin, dass Phi und Pi wegen ihrer ähnlichen Raumstruktur wahrscheinlich um die gleiche Bindungsstelle des Transportsystems konkurrieren. Die Vergleiche von Phi mit dem kompetitiven Inhibitor Arsenat und dem unkompetitiven Inhibitor CCCP unterstützen weiterhin, dass Phi kompetitiv hemmt.

Die  $K_i$ -Werte von Phi wurden einmal anhand der Dosis-Wirkungsbeziehung und außerdem anhand des Dixon-Plots ermittelt. Beide Methoden ergaben für die entsprechenden Modellsysteme übereinstimmende  $K_i$ -Werte. In Tomatenzellen wurde ein  $K_i$ -Wert von



0.32 mM ermittelt. In Tabakzellen war der  $K_i$ -Wert 7-fach höher, nämlich 2.3 mM. Die hoch-affinen Pi-Transporter der beiden Zellkultursysteme aus Tomate und Tabak unterschieden sich also hinsichtlich ihrer Affinität gegenüber Phi. Phylogenetisch sind Tomate und Tabak eng verwandte Pflanzenspezies, die zur Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) gehören. Trotz der hohen Homologie der hoch-affinen Pi-Transporter der *Solanaceae*-Spezies bestehen auf Aminosäureebene gewisse Abweichungen, die für die unterschiedlichen Affinitäten verantwortlich sein könnten. Die Identität zwischen den Aminosäuresequenzen von NtPT1 und LePT1 beträgt 91 %, die zwischen NtPT2 und LePT2 90 % (Chen *et al.*, 2007). Durch Hydropathie-Analysen ließ sich die charakteristische „6+6“ Topologie aller Pht1 Proteine ermitteln, die nicht nur in Transportern höherer Pflanzen sondern auch in Transportern aus Hefe und Pilzen gefunden werden (Pao *et al.*, 1998, Raghothama *et al.*, 2005). Die Raumstrukturen der Bindungsstellen für Pi sind derzeit aber nicht bekannt und es gibt keine Untersuchungen, welche Aminosäuren in der Primärsequenz die Affinität und Spezifität der Pi-Bindung bzw. einer möglichen Phi-Bindung bestimmen (Smith, 2002).

In der Literatur existieren wenige Berichte über den Transport von Phi in Pflanzenzellen. In *Brassica nigra* wurde gefunden, dass Phi sowohl  $V_{max}$  als auch  $K_m$  des Pi-Transportes ändert (Carswell *et al.*, 1997). Dieser Effekt war in Pi-versorgten Zellen deutlich stärker ausgeprägt als in Pi-unterversorgten Zellen und wurde auf eine unterschiedliche Substrataffinität der hoch- bzw. niedrig-affinen Pi-Transporter zurückgeführt. Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungen an Tomate in dieser Arbeit, da in Pi-versorgten Zellen ein zu geringer Pi-Transport beobachtet wurde, um die kinetischen Parameter zu bestimmen. Die Hemmung durch Phi konnte daher nicht näher charakterisiert werden (Abbildung 3-18b, Seite 72 und Abbildung 3-19a, Seite 73). In Pi-versorgten Zellen war das hoch-affine Pi-Transportsystem nicht aktiv. Diese Unterschiede in verschiedenen Pflanzenspezies verdeutlichen, dass eine weitere vergleichende Charakterisierung verschiedener Pi-Transportsysteme notwendig ist.

Der Phi-Transport wurde intensiv in *Phytophthora*-Spezies charakterisiert (Barchietto *et al.*, 1989, Griffith *et al.*, 1989). In *Phytophthora*-Arten wurden zwei Pi-Aufnahmesysteme mit unterschiedlichen kinetischen Parametern nachgewiesen, die sich in Abhängigkeit von der extrazellulären Pi-Konzentration zeigen. Kinetische Studien mit *P. palmivora*, *P. cytophthora* und *P. cryptogea* zeigten, dass Phi sowohl über das niedrig-affine als auch über das hoch-affine Pi-Transportsystem des Pilzes aufgenommen wird. Während der Phi-Transport durch Pi-Konzentrationen in  $\mu\text{M}$ -Bereich gehemmt werden konnte, inhibierte Phi den Pi-Transport erst in mM-Bereich. Diese Studien wurden mit radioaktiv markiertem Phi durchgeführt, das jedoch nicht kommerziell erhältlich ist. Vergleichbare Experimente mit

höheren Pflanzen sind nicht bekannt. McDonald *et al.* (2001b) stellten auch in der Bierhefe *S. cerevisiae* eine Interaktion zwischen Phi und dem hoch-affinen Pi-Transporter Pho84 fest. *Apho84*-Mutanten zeigten eine Beeinträchtigung im Pi-Transport und litten daher permanent unter Pi-Mangel, waren aber auch nicht in der Lage Phi aufzunehmen. In der Folge wies diese Mutante eine konstitutive Genexpression einer sauren Phosphatase (*Pho5*) auf, die auch in Anwesenheit von Phi im extrazellulären Medium nicht reprimiert werden konnte.

Die Frage, ob die pflanzlichen hoch-affinen Pi-Transporter in der Lage sind auch Phi zu transportieren, konnte aber allein anhand der vorgestellten kinetischen Studien und Wettbewerbsversuche nicht beantwortet werden. Auch die Literaturangaben über eine Phi-Aufnahme in Pflanzen waren nicht unstrittig, da die Aufnahme *in vivo* noch nicht gezeigt werden konnte. Bisher wurde lediglich durch den Nachweis von Phi in Zellextrakten mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR auf dessen zelluläre Akkumulation schlussgefolgert (Carswell *et al.*, 1996). Bei dieser Methode kann allerdings nicht zwischen der Aufnahme und der Adsorption von Phi unterschieden werden. In einer anderen Arbeit von Lee *et al.* (1990) wurde beiläufig erwähnt, dass Phi in Mais-Wurzeln detektiert werden konnte. Diese Beobachtung wurde von den Autoren allerdings nicht näher anhand von Experimenten belegt oder beschrieben und ein klarer Nachweis für die Phi-Aufnahme steht nach wie vor aus.

Für die Wirkung von Phi auf die Pi-Homöostase ist es jedenfalls entscheidend, ob und in welcher Menge Phi im Cytoplasma ankommt. Hiervon hängt auch ab, wie Phi als Substrat oder Inhibitor anderer Enzyme wirken und auf diese Weise einen Einfluss auf zelluläre Stoffwechselprozesse nehmen kann. Mit dem Ziel, die intrazelluläre Verteilung von Phi *in vivo* zu ermitteln, wurden daher Stoffwechseluntersuchungen durch  $^{31}\text{P}$ -NMR an BY-2 Tabakzellkulturen vorgenommen.

### **4.3 *In vivo* Nachweis von Phi durch $^{31}\text{P}$ -NMR in Pflanzenzellen**

Die subzelluläre Verteilung von einzelnen Metaboliten kann nur schwer mit den klassischen analytischen Methoden untersucht werden. In der Regel ist es nicht möglich, einzelne Zellkompartimente so schnell zu präparieren, dass der Gehalt an Metaboliten noch der *in vivo* Situation entspricht. Die besten Informationen über die subzelluläre Verteilung von Pi wurden darum bislang aus *in vivo* NMR-Studien gewonnen. Die *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR stellt eine nicht-invasive Messtechnik dar, welche die gleichzeitige Detektion verschiedener Pi-haltiger Metaboliten ermöglicht (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2001b). Außerdem erlaubt die pH-abhängige chemische Verschiebung einiger Signale die subzelluläre

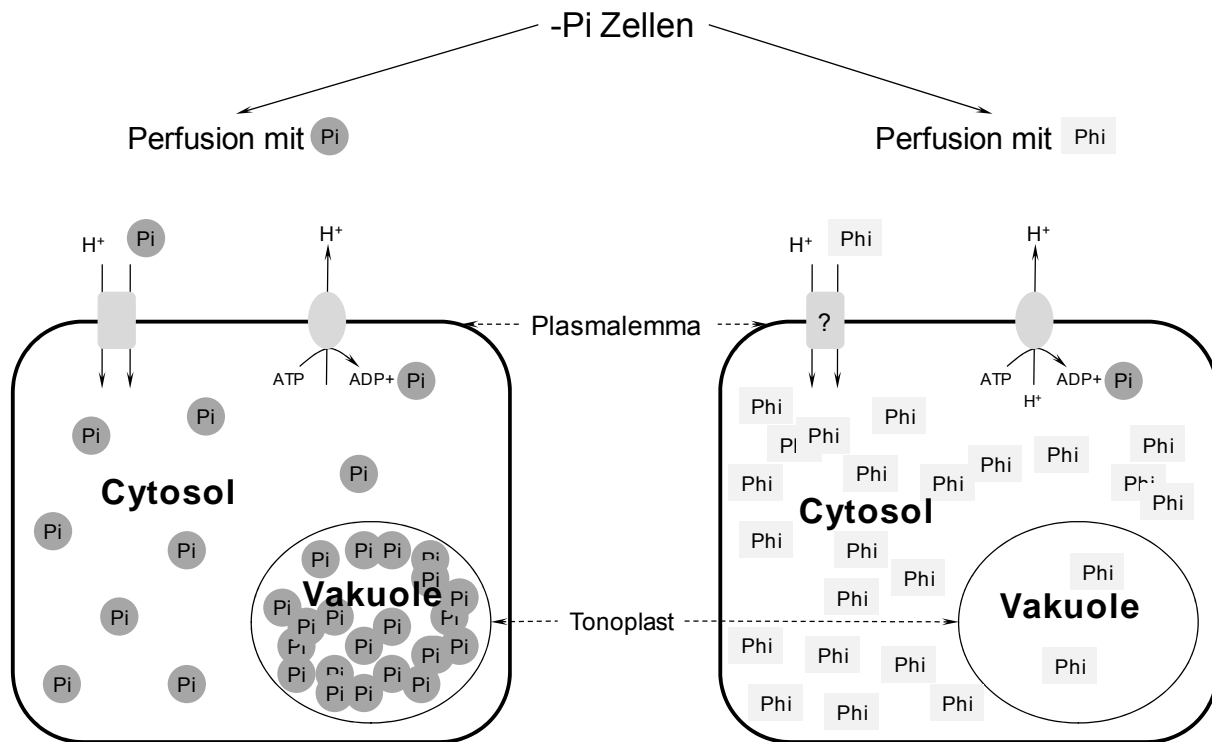
Kompartimentierungsanalyse dieser Metaboliten (Bligny & Douce, 2001). Dies trifft besonders auf die Verteilung von Pi zu, für das zwei gut unterscheidbare subzelluläre Pools detektiert wurden. Weil die chemische Verschiebung des Pi-Anions von seinem Dissoziationszustand und damit vom pH des Kompartimentes abhängig ist, kann zwischen einem cytoplasmatischen und einem vakuolären Pool unterschieden werden. Ein weiterer Vorteil der *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR Messung ist die Analyse des metabolischen Zustands der Zellen in Echtzeit. So kann beispielsweise der Energieladungszustand der Zellen anhand der verschiedenen Nukleosidphosphate abgeschätzt werden. Alle diese Möglichkeiten führten zu einer breiten Anwendung dieser Methode zur Charakterisierung der pflanzlichen Stoffwechselreaktionen gegenüber abiotischen Stressfaktoren wie Nährstoffmangel, Anoxie, Trocken- und Salzstress (Ratcliffe *et al.*, 2001a). Darüber hinaus bewährte sich die *in vivo* NMR als eine nützliche Methode zur Analyse des Metabolismus und der subzellulären Verteilung xenobiotischer Stoffe in Pflanzen (Ratcliffe & Roscher, 1998). Die Wirkungsweise des Herbizides Glyphosat wurde beispielsweise auch anhand von NMR-Analysen aufgeklärt (Gout *et al.*, 1992b). Glyphosat ist eine organische Verbindung der Phosphonsäure und wirkt als ein starker Inhibitor des Biosyntheseweges der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan, die wiederum Bausteine für Proteine und eine große Zahl sekundärer Pflanzenstoffe sind (vgl. Abbildung 1-3, Seite 18). *In vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Suspensionskulturen aus *Acer pseudoplatanus* zeigten die gleichzeitige cytoplasmatische Akkumulation von Glyphosat, Shikimat-3-Phosphat und Aminomethylphosphonat, ein Abbauprodukt von Glyphosat. Auf der Basis dieser Beobachtungen wurde der Schluss gezogen, dass Glyphosat ein Inhibitor der EPSP-Synthase ist.

Im Gegensatz zur umfassenden Information über die Wirkungsweise von Glyphosat gibt es bis jetzt noch keine *in vivo* Stoffwechseluntersuchungen von Phi in pflanzlichen Zellen. Um einen Einblick in das intrazelluläre Verhalten von Phi und eine mögliche Interaktion mit dem pflanzlichen Pi-Stoffwechsel zu gewinnen, wurden *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Studien mit BY-2 Zellkulturen aus *N. tabacum* durchgeführt.

Ausgehend von der bekannten Hemmung des Pi-Transportes durch Phi sollte durch *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR die Wirkung von Phi auf die intrazelluläre Pi-Homöostase untersucht werden. Anhand der pH-abhängigen chemischen Verschiebung des Phi-Signals war es außerdem möglich, auch die Lokalisation von Phi in Vakuole und Cytoplasma zu unterscheiden. Sowohl die hohe Menge und Dichte der BY-2 Zellen als auch die gleichmäßige Zufuhr des Nährmediums ermöglichten die Aufnahme von NMR-Spektren mit einer guten Auflösung. Vorversuche hatten gezeigt, dass die Tabakzellen für mehr als 20 h im Perfusionssystem vital

blieben, was eine langfristige Beobachtung des Stoffwechsels unter verschiedenen Versuchsbedingungen gestattete (Abbildung 3-31, Seite 89).

In den aufgenommenen NMR-Spektren konnten die Signale Pi-haltiger Hauptmetabolite wie G6P, NTPs und UDPG deutlich erkannt werden. In den Spektren konnten der cytoplasmatische und der vakuoläre Pi-Pool klar getrennt werden. Übereinstimmend mit Literaturdaten zeigten Pi-verarmte Zellen stark herabgesetzte Signale der NTP-Pools (Theodorou *et al.*, 1993). Die Zugabe von Pi nach drei Stunden führte zu einer klar erkennbaren Stoffwechselaktivierung der Zellen. Die Signalintensitäten aller detektierbaren, Pi-haltigen Metabolite nahmen rasch zu, wobei überschüssiges Pi in die Vakuole transportiert wurde. Dies bestätigt, dass die Vakuole als Speicherkompartiment der Pflanzenzelle für Pi dient (Ratcliffe, 1994, Vogel *et al.*, 1999).



**Abbildung 4-1:** Schematische Zusammenfassung des subzellulären Anreicherungsmusters von Pi bzw. Phi in Pi-verarmten Zellen. Extrazelluläres Pi wurde von Pi-verarmten Zellen kontinuierlich aufgenommen und in den Vakuolen (pH 5.6) gespeichert. Phi zeigt dagegen eine deutliche cytoplasmatische Anreicherung (pH 7.3). Nur in geringerem Maß wurde Phi in die Vakuolen transportiert.

In einem weiteren Experiment wurde zu Pi-verarmten Zellen Phi gegeben. Diese Zellen nahmen Phi auf und akkumulierten es hauptsächlich im Cytoplasma. Die langsam steigenden Signalintensitäten der cytoplasmatischen Phi-Menge wiesen auf eine langsame Aufnahmekinetik hin. Während die Pi-Aufnahme im Vergleichsexperiment nach 3 h ein Plateau erreichte (Abbildung 3-31c, Seite 89) wurde Phi kontinuierlich über 20 h akkumuliert,

wobei erst nach 8 h ein Zwischenplateau erreicht wurde (Abbildung 3-33b, Seite 93). In geringem Maß wurde Phi auch im vakuolären Zellkompartiment detektiert, was jedoch mit der vorher beschriebenen Akkumulation von Pi in der Vakuole nicht vergleichbar war. Nach Kenntnis der Autorin sind diese Daten der erste direkte Nachweis, dass Phi in Cytoplasma und Vakuole von Pflanzenzellen aufgenommen wird. Eine Zusammenfassung der subzellulären Pi- und Phi-Verteilung ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

In den folgenden drei Abschnitten wird auf einzelne Aspekte der Bedeutung der cytoplasmatischen Phi-Akkumulation näher eingegangen. Im Besonderen wird eine postulierte Verstoffwechslung von Phi durch seine Oxidation zu Pi (Kapitel 4.4), die transkriptionelle Kontrolle der Pi-Mangelantwort und der *PSR*-Gene (Kapitel 4.5) und die Interaktion von Phi mit der Wahrnehmung der intrazellulären Pi-Konzentration (Kapitel 4.6) diskutiert.

Die weiteren Ergebnisse aus den *in vivo* NMR-Studien werden danach in Kapitel 4.7 besprochen.

#### **4.4 Einfluss von Phi auf Stoffwechsel und Energieladung**

In der Vergangenheit lag das landwirtschaftliche Interesse an Phi in seiner Verwertung als Phosphor-Quelle und Düngemittel (McDonald *et al.*, 2001a). Das extrem niedrige Redoxpotenzial des  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{HPO}_3^{2-}$ -Redoxpaares spricht dafür, dass Phi nach Umwandlung zu Pi als Phosphor-Quelle dienen könnte (-690 mV, Schink *et al.*, 2000). Tatsächlich existieren Bakterien, die eine anaerobe Oxidation von Phi zu Pi durchführen können (Schink *et al.*, 2002). Die Oxidation ist in diesem Fall mit der Reduktion entweder von Sulfat oder von Kohlenstoffdioxid verknüpft. In der Literatur existieren ebenfalls Berichte über eine enzymatische Phi-Oxidation in aeroben Bakterien. In *E. coli* wird diese Funktion durch das Enzym BAP vertreten (Yang *et al.*, 2004). Das scheint ein besonderes Merkmal dieses Enzyms von *E. coli* zu sein, weil die Reaktion in *Pseudomonas stutzeri* und *Bacillus subtilis*, die ebenfalls alkalischen Phosphatasen besitzen, bislang nicht nachgewiesen wurde. *P. stutzeri* besitzt dagegen eine Phi-Dehydrogenase, welche Phi zu Pi in einer  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Reaktion oxidiert (Relyea *et al.*, 2005). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Transkription der Phi-Dehydrogenase durch Pi-Mangel aktiviert wird. Dies bestätigt die Rolle des Enzyms bei der Verwertung von Phi als alternativem Phosphor-Donor unter Pi-Stress (White & Metcalf, 2004).

In dieser Arbeit konnte trotz der ausgeprägten cytoplasmatischen Akkumulation von Phi in BY-2 Zellen über mehrere Stunden keine Zunahme der Pi-haltigen Metabolite in den  $^{31}\text{P}$ -

NMR-Spektren festgestellt werden. Dies belegte, dass die pflanzlichen Zellen nicht fähig sind, eine Oxidation von Phi zu Pi durchzuführen und auf diese Weise Phi zu verwerten. Um zu kontrollieren, dass die Zellen über den Versuchszeitraum lebensfähig und stoffwechselaktiv waren, wurde am Ende des Experimentes zusätzlich Pi zugegeben. Die rasche Zunahme der Signalintensitäten der Pi-haltigen Metaboliten bestätigte die Vitalität und zeigte, dass Phi bis zu diesem Zeitpunkt keine Stoffwechselschädigung der Zellen verursacht hatte. In der eingesetzten Konzentration von 1 mM kann eine toxische Wirkung von Phi auf BY-2 Zellen daher ausgeschlossen werden. In Tabakzellen führte die Perfusion mit Phi zu keiner Bildung oder Anreicherung von anti-metabolischen Produkten. In den Spektren der Tabakzellen war keine Akkumulation von P<sub>PPi</sub> zu erkennen. Eine Anreicherung von Polyphosphaten, die generell selten in Pflanzen vorkommen, wurde ebenfalls nicht detektiert (Harold, 1966, Kornberg *et al.*, 1999).

Der Begriff Energieladung erfasst den energetischen Zustand der Zelle und wurde 1968 von Atkinson eingeführt. Vereinfachend spricht man häufig von der Energieladung des Adenylatsystems (adenylate energy charge, AEC), da die Adenosinphosphate die größte Gruppe der Nukleosidphosphate der Zellen darstellen (Atkinson, 1968, Schopfer & Brennicke, 2005)\*. In Zellen aus *Acer pseudoplatanus* besteht der NTP-Pool beispielsweise aus 65 % ATP und 35 % (UTP+CTP). GTP war kaum detektierbar (Roby *et al.*, 1987a). Das streng kontrollierte Gleichgewicht zwischen den ATP- und ADP-Pools hat eine fundamentale Bedeutung für die Kontrolle vieler Enzymreaktionen und daher für die metabolische Aktivität der Zellen. Pflanzenzellen mit aktivem Stoffwechsel und optimaler Nährstoff- und Sauerstoffversorgung haben ein hohes ATP/ADP-Verhältnis. Eine Übersicht der ATP/ADP-Werte verschiedener Pflanzenspezies wurde von Pradet *et al.* (1983) veröffentlicht. Für viele Pflanzen wurde unter optimale Wachstumsbedingungen ein ATP/ADP-Verhältnis zwischen 0.8 und 0.9 beschrieben.

Anhand der Daten dieser Arbeit konnte die AEC nicht quantitativ bestimmt werden. Die aufgenommenen NMR-Spektren lassen jedoch eine qualitative Aussage über den metabolischen Zustand der Tabakzellen zu. So wiesen die Tabakzellen trotz der Anwesenheit von Phi einen intakten Energiestoffwechsel und eine unveränderte Menge an Nukleosidphosphaten auf. Verglichen mit Pi-behandelten Zellen wiesen die Phi-behandelten

---

\* AEC errechnet sich aus der Formel:  $(ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)$  und bezeichnet die halbe mittlere Anzahl von anhydridartig gebundenen Pi-Gruppen pro Adeninmolekül in einer Mischung der drei Adeninnukleotiden.

Tabakzellen etwas geringere NTP-Levels auf, welche aber über die gesamte Versuchsdauer (24 h) konstant blieben. Es wurde keine Abnahme der NTP-Signalintensitäten detektiert. Insbesondere war keine Anreicherung von  $\beta$ - und  $\alpha$ -NDPs in den Spektren festzustellen. Ähnliche Befunde wurden für Zellsuspensionen aus *Brassica napus* berichtet (Carswell *et al.*, 1997). Pi-Mangel führte zu einer Verminderung des Adenosinphosphat-Pools, wobei ein AEC-Wert von 0.77 errechnet wurde. Der Einsatz von Phi führte zu keiner Änderung des ATP- und ADP-Gehaltes und der AEC-Wert blieb unbeeinflusst.

Stoffwechselanalysen in *Phytophthora* ergaben eine verstärkte Anreicherung von Pyro- und Polyphosphaten nach Phi-Behandlung (Niere *et al.*, 1994, Martin *et al.*, 1998). Dieser charakteristische Effekt von Phi in allen *Phytophthora*-Spezies wurde in mehreren Studien beschrieben (Griffith *et al.*, 1990, Niere *et al.*, 1990, Guest *et al.*, 1991, Barchietto *et al.*, 1992, Stehmann *et al.*, 2000). Die Hemmwirkung von Phi wurde auf die Inhibierung der Pyrophosphataseaktivität in *Phytophthora* zurückgeführt (Martin *et al.*, 1998). Da die Spaltung von Pyrophosphat eine Schlüsselreaktion bei der Synthese von Polysacchariden, Nucleinsäuren, Lipiden und Proteinen ist, kann eine herabgesetzte Pyrophosphataseaktivität ein breites Spektrum an Stoffwechselprozessen beeinträchtigen (Niere *et al.*, 1994). In *P. palmivora* wird die Akkumulation von P<sub>PPi</sub> von einer Abnahme der ATP- und NAD-Pools begleitet (Griffith *et al.*, 1990, Niere *et al.*, 1990). Eine signifikante Abnahme von ATP war noch 3 h nach der Phi-Zugabe festzustellen (Griffith *et al.*, 1990). Trotz verminderter ATP-Konzentration bleibt die Energieladung der Zelle unbeeinflusst. Die Autoren verweisen darauf, dass der Effekt von Phi in diesem Fall eher auf die Inhibierung der Adenylatsynthese als auf die Substratphosphorylierung zurückzuführen sei. Sie vermuten weiterhin, dass Phi die Aktivität der 5'-Phospho- $\alpha$ -D-Ribulose-1-Pyrophosphat-Synthase (PRPP-Synthase) inhibiert. Das Enzym synthetisiert aus Ribulose-5'-P und ATP PRPP, ein Grundbaustein der Adenylat- und NAD-Synthesewege. Relativ hohe Konzentrationen an Phi können auch die Aktivitäten mancher Enzyme der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Wegs inhibieren (Stehmann *et al.*, 2000). In *P. citrophthora* kann die Inhibierung der GAPDH-Aktivität durch Phi die Bereitstellung wichtiger Zwischenprodukte der Lipidbiosynthese und der Respiration drosseln, was die beobachtete Wachstumshemmung erklären könnte (Barchietto *et al.*, 1992). Anhand der NMR-Ergebnisse lässt sich zusammengefasst sagen, dass Phi Pi im Stoffwechsel der Pflanzen nicht ersetzen kann. Außerdem unterscheidet sich die Auswirkung von Phi auf den Metabolismus von Pflanzen und *Phytophthora*. Durch die Anreicherung von Poly- und Pyrophosphaten erfasst die Wirkungsweise von Phi mehrere Wirkungsstellen auf metabolischem und regulatorischem Level in *Phytophthora*, welche zur Beeinträchtigung des

Pi-Stoffwechsels führen. In Tabakzellen war keine vergleichbare Auswirkung von Phi auf den Pi-Metabolismus festzustellen.

## **4.5 Phi beeinflusst die Pi-Mangelantwort**

### **4.5.1 Phi unterdrückt die Expression der *PSR*-Gene**

Wie in der Einleitung beschrieben, finden unter Pi-Mangelbedingungen differenzielle Genaktivitätsänderungen statt (Misson *et al.*, 2005). Ein Beispiel ist die Expression von Phosphohydrolasen und hoch-affinen Pi-Transportern. Diese Proteine beteiligen sich an der Beschaffung von Pi aus externen und internen Pi-Quellen wie RNA, DNA und Phospholipiden (Nürnberger *et al.*, 1990, Abel *et al.*, 2000, Nakamura *et al.*, 2005). Um die Wechselwirkung von Phi mit dem Pi-Stoffwechsel weiter zu charakterisieren, wurde untersucht, wie Phi mit den Anpassungen der Pflanzen an Pi-Mangel interferiert und welche Effekte diese Wechselwirkung auf das Pflanzenwachstum ausübt. Für die transkriptionellen und physiologischen Untersuchungen wurden Zellsuspensionskulturen und Pflanzen von *S. lycopersicum* eingesetzt. Die Tomate wurde als Modellsystem verwendet, da die Anpassungen an Pi-Mangel durch Forschungsarbeiten der AG Köck ausführlich dokumentiert waren.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Phi auf die Genexpression von zwei T2-Typ-RNasen (*RNaseLX* und *RNaseLE*), einer intrazellulären Phosphatase (*LePS2*), einem hoch-affinen Pi-Transporter (*LePT2*) untersucht. Diese Gene besitzen die Eigenschaften typischer *PSR*-Gene. Von besonderem Interesse war der Einfluss von Phi auf die Genexpression von *RNaseLE* und *RNaseLX*, da zu diesen Genprodukten noch keine näheren Studien in der Literatur zu finden sind. Dazu wurde auch der Einfluss von Phi auf die Promotoraktivität des *RNaseLX*-Gens mit der GUS-Reporter-Linie 10 untersucht. Diese transgene Linie besitzt gute histochemische Eigenschaften und die organ- und gewebespezifische Promotoraktivität der *RNaseLX* ist bereits gut charakterisiert (Köck *et al.*, 2006). Außerdem zeigt die GUS-Reporter-Linie 10 gegenüber den Wildtyppflanzen keinen veränderten Phänotyp.

Die Transkriptionsanalysen im Northern-Blot zeigten, dass Pi-Mangel in Tomatenzellkulturen zu einer Aktivierung der Transkription aller untersuchten *PSR*-Gene führte (Abbildung 3-10, Seite 64). Die Transkripte der *PSR*-Gene konnten schon 2 h nach der Umsetzung in Pi-freies Medium nachgewiesen werden und nahmen in den nächsten 24 h kontinuierlich zu. Damit konnte die Induzierbarkeit der *PSR*-Gene durch Pi-Mangel aus früheren Untersuchungen



prinzipiell bestätigt werden (Bosse & Köck, 1998, Liu *et al.*, 1998, Stenzel *et al.*, 2003). Das zeitlich koordinierte Induktionsmuster der Transkription aller betrachteten *PSR*-Gene passt zu anderen Literaturstellen und weist auf ein Rettungssystem der Pflanzen hin, welches unter Pi-Mangel mehrere *PSR*-Gene koordiniert aktiviert (Goldstein *et al.*, 1988a, 1988b).

In Tomatenzellkulturen wurde die Hochregulation der *PSR*-Gene in der Anwesenheit von Phi trotz Pi-Mangel stark unterdrückt. Die Transkripte der *PSR*-Gene waren in der Gegenwart von Phi nicht oder nur sehr schwach zu detektieren. Die Transkription von *RNaseLX* und *LePS2* konnte, wie bei den Pi-behandelten Zellen, nicht im Northern-Blot nachgewiesen werden. Phi reprimierte also die koordinierte Aktivierung der *PSR*-Gene, obwohl die Zellen zu dieser Zeit tatsächlich an einem starken Pi-Mangel litten.

Auch die Transkription von *LePT2* wurde durch Phi blockiert. Dieses Ergebnis stimmt mit den charakterisierten Transporteigenschaften von Pi-verarmten und Phi-behandelten Zellen überein. Nach Vorinkubation der Tomatenzellen in Medium mit Phi aber ohne Pi wurde eine verminderte Transportkapazität für Pi festgestellt (Abbildung 3-19, Seite 73). Der unveränderte  $K_m$ -Wert bei einem verringerten  $V_{max}$ -Wert deutete darauf hin, dass Phi nicht die Art, sondern die Menge der hoch-affinen Pi-Transporter (z. B. *LePT2*) verringerte. Vergleichbare Ergebnisse über den Einfluss von Phi auf die Genexpression von *LePT2* wurden auch von Varadarajan *et al.* (2002) berichtet. Allerdings wurde dort die Auswirkung auf die biochemische Funktion des hoch-affinen Pi-Transportsystems nicht geprüft.

Die ausgewählten *PSR*-Gene wurden ebenfalls unter Pi-Mangelbedingungen in ganzen Tomatenpflanzen untersucht, wobei ihre Expressionsmuster organabhängig betrachtet wurden (Abbildung 3-13, Seite 67). Transkripte von *LePS2* wurden in Wurzeln, Hypocotylen und Blättern nachgewiesen. *LePT2* konnte nur in Wurzeln detektiert werden, was in Beziehung zur Funktion von *LePT2* bei der Pi-Aneignung aus der Bodenmatrix steht (vgl. Abbildung 3-18, Seite 72). Auch Liu *et al.* (1998) untersuchten die organ- und gewebespezifische Genexpression von *LePT2* und beschrieben ebenfalls, dass die Transkripte von *LePT2* unter Pi-Mangel ausschließlich in epidermalen Wurzelzellen vorkommen. In Bestätigung früherer Untersuchungen konnte sowohl im Northern-Blot als auch mithilfe der GUS-Reporterlinie 10 veranschaulicht werden, dass Pi-Mangel die Genexpression der *RNaseLX* hauptsächlich im Wurzelbereich aktiviert, obwohl Transkripte auch weniger stark in Hypocotylen und Blättern akkumulierten (Köck *et al.*, 2006). *RNaseLE* wurde nur in Hypocotylen und Wurzeln transkribiert.

Die Zugabe von Phi führte in Tomatenpflanzen, analog wie zuvor in Zellkulturen, zu einer Suppression von *LePT2* und *LePS2*. Die Genexpression der *RNasen LE* und *LX* wurde

ebenfalls stark herabgesetzt. Die histochemische und die fluorometrische Analyse der GUS-Aktivität in *PromLX::uidA*-Linie 10 bestätigten, dass die Promotoraktivität von *RNaseLX* durch Phi gehemmt wurde. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, dass die Genexpression beider *RNasen LE* und *LX* unter Pi-Mangel über die gleichen Signaltransduktionswege wie *LePT2* und *LePS2* reguliert wird.

Bei Pi-Mangel wird das Hauptwurzelswachstum in Tomatenpflanzen beschleunigt (Abbildung 3-3, Seite 56) und die Lateralwurzeln werden verlängert (Abbildung 3-13, Seite 67). Die Expression der *RNaseLE* bzw. der *RNaseLX* korreliert mit diesen Wachstumsereignissen (Groß, 2005, Köck *et al.*, 2006). Studien zur Promotoraktivität von *RNaseLE* ergaben zudem eine durch Pi-Mangel stimulierte, lokale Expression des Gens in Seitenwurzelspitzen. Aufgrund der lokal abgegrenzten Promoteraktivität von *RNaseLX* in der Teilungszone der Haupt- und Lateralwurzelspitzen bei Pi-Mangel schlugen Köck *et al.* (2006) vor, dass *RNaseLX* durch erhöhten Umsatz zellulärer RNA-Pools wichtige Nährstoffe für das Wurzelwachstum freisetzt. Dazu passt auch, dass bei Phi-Behandlung der GUS-Pflanzen nicht nur die Suppression der *RNaseLX*, sondern auch ein stark gehemmtes Haupt- und Lateralwurzelswachstum nachgewiesen wurde (Abbildung 3-13, Seite 67).

Die Suppression der *PSR*-Gene durch Phi zeigte deutlich, dass ein Primäreffekt von Phi auf Pflanzenzellen die Störung der transkriptionellen Kontrolle der Phosphatmangelantwort ist. Phi ist in der Lage, wichtige transkriptionelle Anpassungen zum Umgang mit Pi-Mangel zu unterdrücken, obwohl es von den Pflanzen nicht verwertet werden kann. Ein negativer Effekt von Phi auf die Aktivierung der Pi-Mangelanpassungen wurde auch für *A. thaliana* berichtet (Ticconi *et al.*, 2001). Die Autoren zeigten, dass die Behandlung mit Phi zu einer verringerten Aktivität nukleolytischer Enzyme führte. In der Gegenwart von Phi zeigten diese Enzyme vergleichbar niedrige Aktivität als in Zellen, die mit Pi versorgt wurden. Die Transkriptlevel einer sauren Phosphatase (*AtACP5*), eines hoch-affinen Pi-Transporters (*AtPT2*) und eines bislang unbekanntes Genproduktes (*At4*) wurden in der Gegenwart von Phi ebenfalls vermindert.

Die Transkriptionsstudien haben gezeigt, dass der Effekt von Phi konzentrationsabhängig ist. Insgesamt reagierten die Tomatenpflanzen empfindlicher auf Phi als Tomatenzellkulturen. Der Effekt von Phi in Tomatenzellkulturen war erst bei einer Konzentration von 2.5 mM deutlich ausgeprägt. In Tomatenpflanzen waren bereits 0.5 mM Phi ausreichend, um die *PSR*-Genexpression in Wurzeln stark herabzusetzen. Die unterschiedliche Sensitivität von Pflanzen und Zellkulturen könnte möglicherweise an verschiedenen Aufnahmegeschwindigkeiten von Phi in beiden Systemen liegen. Der Einfluss von Phi auf die Genexpression war auch in

verschiedenen Pflanzenteilen unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies wurde an der Genexpression von *LePS2* deutlich. *LePS2* ist normalerweise fast ubiquitär in allen Pflanzenorganen aktiv. Wenn die Pflanzen mit Phi behandelt werden, findet vermutlich durch hoch-affine Pi-Transporter zuerst eine Anreicherung von Phi im Wurzelsystem statt. Übereinstimmend wurde die stärkste Hemmung der *PSR*-Gene in Wurzeln beobachtet. Von den Wurzeln aus erfolgt danach wahrscheinlich eine Allokation von Phi in die oberen Pflanzenorgane. In Hypocotylen und Blättern wurde allerdings eine geringere Hemmung der Genexpression durch Phi beobachtet. Dies könnte an einer geringeren Allokationseffizienz von Phi in die oberen Pflanzenteile liegen.

Einige Komponenten des Pi-Allokationsmechanismus in *Arabidopsis* sind bereits bekannt, obwohl noch nicht klar ist, wie die genaue Regulation abläuft. *Pho1* wird in den Leitgeweben von Wurzeln, Blättern, Hypocotylen und Blüten exprimiert, was mit seiner Rolle im Pi-Transfer innerhalb der Pflanze im Einklang steht (Hamburger *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2004). In der *pho1*-Mutante leiden die oberirdischen Pflanzenteile dauernd an Pi-Mangel, wobei die Pi-Aufnahme in die Wurzel unbeeinflusst bleibt (Poirier *et al.*, 1991). *Pho2* ist ebenfalls an der Regulation der Pi-Homöostase beteiligt. *Pho2* codiert ein Ubiquitin-konjugierendes E2 Enzym, dessen Transkription über microRNA (miR399) reguliert wird (Fujii *et al.*, 2005, Bari *et al.*, 2006). Die Überexpression von miR399 führte zu einer erhöhten Wurzelaufnahme von Pi, einer erhöhten Translokation von Pi aus den Wurzeln zum Spross und zu einer Überakkumulation von Pi in den Blättern. Der Phänotyp entspricht somit dem der *pho2*-Mutante (Delhaize *et al.*, 1995, Aung *et al.*, 2006, Chiou, 2007). Um ein besseres Verständnis des Phi-Transportes und der Pi-Translokation in den Pflanzenorganen zu gewinnen, können die Pi-Transportmutanten *pho1* und *pho2* einen wichtigen Beitrag leisten. Mittels *in vitro* <sup>31</sup>P-NMR Analyse konnte so im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die *pho2*-Mutante Phi genauso wie Pi in den Blättern überakkumuliert (Abbildung 3-39, Seite 98 und Abbildung 3-40, Seite 99). Dies deutet darauf hin, dass vermutlich die gleichen Allokationsmechanismen Phi und Pi innerhalb der Pflanze verteilen. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Phi-Aufnahme und -Allokation entscheidend für die Wirkung von Phi auf die Phosphatmangelantwort ist.

*RNaseLE* wird nicht nur bei Pi-Mangel, sondern auch durch andere Stresstimuli induziert. Es stellte sich daher die Frage, ob Phi selektiv in die transkriptionelle Regulation der *RNaseLE* bei Pi-Mangel eingreift. Transkripte von *RNaseLE* akkumulieren nach einer mechanischen Verwundung von grünen Blättern (Groß *et al.*, 2004, Köck *et al.*, 2004). Die Rolle der *RNaseLE* wurde in einer Wiederverwertung der Metaboliten, in Wundverschluss und

Wundheilung oder in einer unspezifischen Pathogenabwehr an der Verwundungsstelle diskutiert (Köck *et al.*, 2004, Köck, 2007). Zellwandabbauprozesse aktivieren ebenfalls die Transkription der *RNaseLE*. Diese Stressstimuli regulieren die Genexpression von *RNaseLE* über unterschiedliche Signaltransduktionswege. Es konnte gezeigt werden, dass Phi nicht in der Lage war, die Aktivierung der *RNaseLE* bei Verwundung und beim Zellwandabbau zu reprimieren (Abbildung 3-15, Seite 68; Abbildung 3-16, Seite 69). Der hemmende Effekt von Phi kam also nur dann zum Tragen, wenn *RNaseLE* durch die Signaltransduktionswege der Pi-Mangelantwort aktiviert wurde. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Phi-Effekte nicht durch eine allgemeine Toxizität hervorgerufen werden, sondern dass Phi selektiv in die Aktivierung der *PSR*-Gene eingreift. Diese Schlussfolgerungen werden von Literaturdaten gestützt. Studien mit *Brassica*-Spezies zeigten, dass Phi die Aktivitäten einer APase und der PFP (glykolytische Bypass-Enzyme bei Pi-Mangel) in Pi-verarmten Zellen herabsetzte (Carswell *et al.*, 1997). Interessanterweise blieben demgegenüber die Aktivitäten der PFK und PK unbeeinflusst. Auch in *S. cerevisiae* wurden unveränderte Aktivitäten der PK und der Alkoholdehydrogenase in der Gegenwart von Phi gemessen (McDonald *et al.*, 2001b).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen zusammen mit Literaturangaben darauf hin, dass Phi mit der Pi-Wahrnehmung und der Signaltransduktion unter Pi-Mangel interferiert. Aufgrund der Ähnlichkeit in den Raumstrukturen von Pi und Phi wird Phi vermutlich von vielen Enzymen, Transportern und Transkriptionsfaktoren als Pi erkannt. Dabei werden essenzielle Anpassungsmechanismen an Pi-Mangel auf Transkriptionsebene unterdrückt. Dies kann eine fatale Auswirkung für die Pflanzenzelle haben.

#### 4.5.2 Phi beeinflusst Morphologie und Zellteilung

In Tomatenpflanzen löste Pi-Mangel eine Verlängerung des Hauptwurzelwachstums aus (Abbildung 3-3, Seite 56). Dies, zusammen mit der verstärkten Elongation der Seitenwurzeln, führte zu einem erhöhten Wurzel/Spross-Verhältnis (Abbildung 3-4, Seite 57). Das verstärkte Wurzelwachstum ist eine natürliche Anpassung vieler Pflanzenarten an Pi-Mangel, um die Pi-Aneignung zu verbessern (Lambers *et al.*, 2006). In *A. thaliana* stimuliert Pi-Mangel das Wachstum lateraler Wurzeln (Williamson *et al.*, 2001, Svistoonoff *et al.*, 2007). Die Umgestaltung des Wurzelsystems unter Pi-Mangelbedingungen führte, wie in Tomate, zu einem erhöhten Wurzel/Spross-Verhältnis (Martin *et al.*, 2000).

Bei morphologischen Untersuchungen an Tomatenpflanzen unter dem Einfluss von Phi wurde festgestellt, dass Phi zu einem gehemmten Wachstum führte und die Anpassungen des

Wurzelsystems an Pi-Mangel unterdrückte (Abbildung 3-3, Seite 56; Abbildung 3-4, Seite 57). Bereits 0.5 mM Phi waren ausreichend, um die Pflanzenentwicklung zu hemmen. Dieses Ergebnis korrelierte sehr gut mit den Transkriptionsstudien der *PSR*-Gene (Abbildung 3-12, Seite 66). Hier waren 0.5 mM Phi ausreichend, um die Genexpression zu supprimieren. Bei Pi-versorgten Pflanzen war nur eine geringe, konzentrationsabhängige Hemmwirkung von Phi auf das Wurzelwachstum und das Wurzel/Spross-Verhältnis festzustellen. Dieser Dosis-Wirkungseffekt von Phi in +Pi-Pflanzen könnte mit einem Wettbewerbseffekt von Phi auf der Pi-Aufnahme erklärt werden. Eine durch Phi gehemmte Pi-Aufnahme könnte ausreichen, um das Wachstum der Pflanzen zu verlangsamen. So konnte in Experimenten mit Tomatenzellkulturen eine Verringerung der intrazellulären Pi-Konzentration durch die Behandlung mit Phi festgestellt werden (Abbildung 3-8, Seite 62).

Ähnlich wie in ganzen Pflanzen übte Phi in Zellkulturen aus *S. lycopersicum* eine deutliche Hemmwirkung auf das Zellwachstum aus. Eine stark herabgesetzte Zellteilungsaktivität korrelierte mit der Hemmung der *PSR*-Gene. In diesen Versuchen konnte auch gezeigt werden, dass die Vitalität der Kulturen über viele Stunden hoch war. Erst nach 24 h Inkubation mit Phi zeigte sich eine abnehmende Vitalität der Zellen. Das beobachtete Verhalten der Zellkulturen ist darum vermutlich eher auf die Repression der Pi-Mangelantwort als auf einen direkten toxischen Effekt von Phi zurückzuführen. Die Tatsache, dass Phi sofort nach der Zugabe die Induktion der *PSR*-Gene unterdrückt und dass die Zellen aber in der Gegenwart von Phi mindestens 12 h vital blieben, schließen eine toxische Wirkung von Phi aus. Zum Vergleich zeigten Pi-verarmte Zellen ohne Phi einen leichten Anstieg in Zellwachstum und Zellteilungsrate. Dabei stieg die Expression der *PSR*-Gene kontinuierlich an. Die Vitalität der Zellen blieb über die gesamte Zeit des Experimentes hoch. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Phi nicht generell toxisch auf ganzen Pflanzen wirkt, da die Photosyntheseleistung und die Bildung von Anthocyanen und Chlorophyll nicht durch Phi beeinflusst wurden (Abbildung 3-5, Seite 58, Abbildung 3-6, Seite 59 und Abbildung 3-7, Seite 60).

Die stark verminderte Zellteilungsaktivität könnte eine Folge der Repression der *PSR*-Gene durch Phi sein. Lai *et al.* (2007) zeigten, dass in *A. thaliana* die Zellteilungsaktivität im Wurzelmeristem den Pi-Bedarf erhöht und damit die Induktion der *PSR*-Genexpression auslöst. Durch Hemmung des mitotischen Spindelapparates mit Colchicin und der Arretierung der Zellteilung in Pi-verarmten Zellen wurde der Pi-Bedarf verringert. Dies führte zu einer Suppression der *PSR*-Genexpression. Im Gegensatz dazu wiesen Colchicin-unbehandelte Zellen weiterhin eine erhöhte *PSR*-Genexpression auf. Die Autoren zeigten auch, dass eine

Stimulierung der Zellproliferation in Pi-verarmten Zellen durch Glukose und Saccharose einen erhöhten Pi-Verbrauch provozierte. Dieser war mit einer deutlich erhöhten *PSR*-Genexpression verbunden. Dies bedeutet, dass die Zellteilung wegen eines erhöhten Pi-Bedarfs normalerweise zu einer Aktivierung der *PSR*-Gene führt. Wenn Phi diese Aktivierung hemmt, wird auch die Zellteilung gehemmt.

#### **4.6 Phi interferiert mit der cytoplasmatischen Pi-Wahrnehmung**

Die Umstellungen im pflanzlichen Stoffwechsel, die koordinierte Induktion der *PSR*-Gene (Phosphatasen, Ribonukleasen, Pi-Transporter und Riboregulatoren) sowie die morphologischen Anpassungen der Pflanze an Pi-Mangel verlangen, dass Pflanzen effektive Mechanismen für die Wahrnehmung der Pi-Konzentration (Pi-Sensing) besitzen. Außerdem müssen sie in der Lage sein, bei Pi-Mangel Signaltransduktionswege zu aktivieren, die zur Pi-Mangelantwort führen. Obwohl viele Informationen über die Grundmechanismen der kontrollierten Pi-Mangelantwort bekannt sind, fehlt immer noch ein komplettes Modell ihrer Regulation. Bisher sind regulierende Faktoren in der Pflanze auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene beschrieben worden. Der Transkriptionsfaktor *PHR1* (Phosphate starvation response1, Rubio *et al.*, 2001)) und die post-transkriptionell wirkenden Faktoren *PHO2* (Delhaize *et al.*, 1995), *SIZ1* (Miura *et al.*, 2005), *miR399* (Fujii *et al.*, 2005) und *PHF1* (Gonzalez *et al.*, 2005) sind Teile des Regulationsmechanismus der pflanzlichen Pi-Mangelantwort (Schachtman & Shin, 2007). Die Verbindung zwischen einem vermuteten Pi-Sensing-Mechanismus und den regulierenden Signalwegen konnte bisher nicht identifiziert werden. Darüber hinaus muss auch berücksichtigt werden, dass Pflanzen vielzellige Organismen sind, die nicht nur die Erhaltung der Pi-Homöostase auf zellulärer Ebene, sondern auch in der ganzen Pflanze (long-distance signalling) sicherstellen müssen (Ticconi *et al.*, 2004). Weiterhin ist das Regulationsnetzwerk der Wachstumshormone Auxin, Cytokinin und Äthylen möglicherweise ebenfalls am Pi-Signalling und Pi-Sensing auf der Ebene der ganzen Pflanzen beteiligt (Abel *et al.*, 2002). Es gibt bislang keine definitive Antwort auf die Frage, welche Mechanismen in den Pflanzen die Pi-Verfügbarkeit überwachen und die Fluktuationen welcher Konzentration - der extrazellulären oder der intrazellulären - der eigentliche Auslöser der Pi-Mangelantwort ist.

Auf intrazellulärer Ebene kommen grundsätzlich der cytoplasmatische und der vakuoläre Pi-Pool für die Erhaltung der Pi-Homöostase in Betracht. Die Hauptfunktion des in der Vakuole gespeicherten Pi besteht im Ausgleich der Schwankungen der cytoplasmatischen Pi-Konzentration (Raghothama, 1999, Martinoia *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2005). Eine

Verminderung der cytoplasmatischen oder vakuolären Pi-Konzentration kann Signale auslösen, welche die Genexpression der *PSR*-Gene aktivieren (Raghothama, 1999). Die Mechanismen der Pi-Fluxprozesse über den Tonoplast können darum einen wichtigen regulatorischen Einfluss auf die Aktivierung der zellulären Pi-Mangelanpassungen haben.

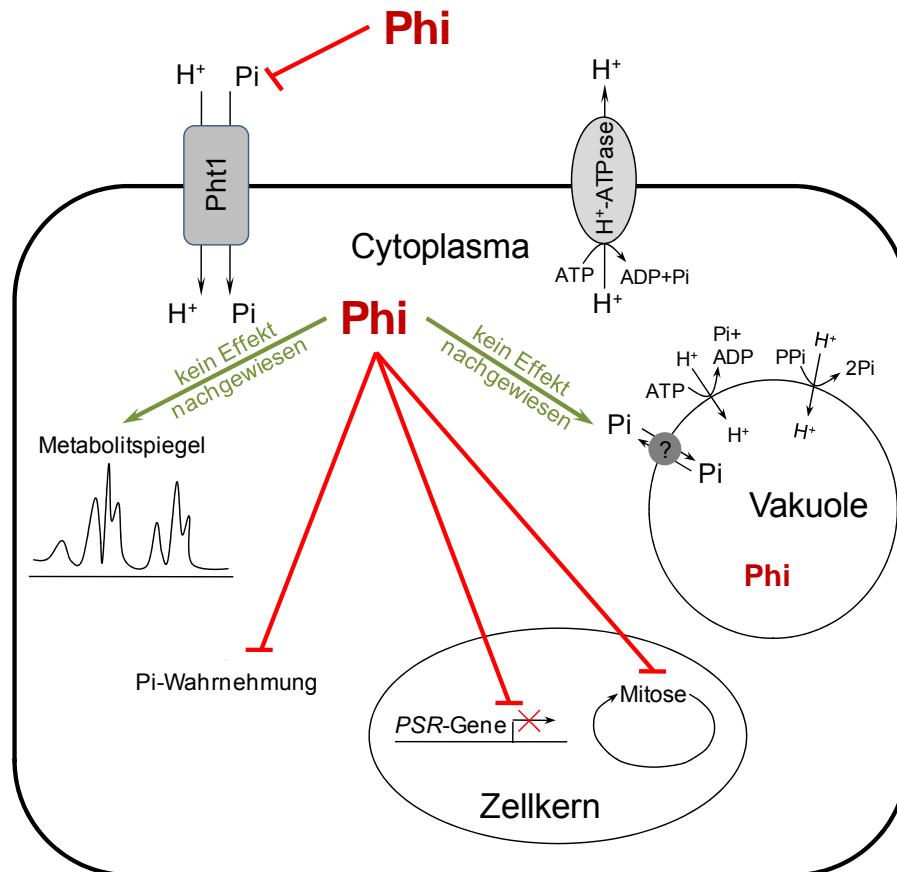
In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Phi im Cytoplasma akkumuliert (Abbildung 3-33, Seite 93). Außerdem wurde nachgewiesen, dass Phi die Aktivierung der *PSR*-Gene unterdrücken konnte (Abbildung 3-10, Seite 64). Die Ergebnisse könnten zusammen darauf hindeuten, dass Phi mit der Wahrnehmung des cytoplasmatischen Pi-Pools interferiert. Ähnlich wie die hoch-affinen Pi-Transporter könnten auch Proteine im Cytoplasma Phi als Substrat binden. Phi könnte so auch den putativen Signaltransduktionsweg des cytoplasmatischen Pi-Mangels stören und aufgrund der Ähnlichkeit der Raumstruktur von Pi und Phi könnte das System blockiert werden, das normalerweise die Pi-Mangelantwort aktiviert. Im Folgenden werden die oben genannten Ergebnisse darum im Zusammenhang mit einem intrazellulären Pi-Sensing-Mechanismus diskutiert.

Der Einfluss des intrazellulären Pi-Pools auf die Induktion der *PSR*-Gene wurde von Köck *et al.* (1998) in Zellkulturen aus *S. lycopersicum* untersucht. Durch die Zugabe von nicht verwertbaren Zuckern wie D-Mannose und 2-Deoxy-D-Glukose konnten die Autoren eine transiente Expression der *PSR*-Gene *RNaseLE*, *RNaseLX* und *LePS2* trotz der Anwesenheit von exogenem Pi nachweisen. Von einer anderen Arbeitsgruppe konnte mittels *in vivo* <sup>31</sup>P-NMR Spektroskopie an Tomaten- und Maisblättern gezeigt werden, dass die Applikation dieser nicht verwertbaren Zucker zu einer vorübergehenden Absenkung des cytoplasmatischen Pi-Pools führte (Loughman *et al.*, 1989). Sie werden in der Zelle von Kinasen (z. B. Hexokinase) phosphoryliert, jedoch nicht weiter metabolisiert. Darum stellten Köck *et al.* (1998) die Hypothese auf, dass ein Pi-Sensing-Mechanismus existiert, der die intrazelluläre Pi-Konzentration überwacht. Die Zugabe der phosphorylierbaren Metaboliten könnte die cytoplasmatische Pi-Konzentration so unter einen physiologischen Schwellenwert senken, der für die Aufrechterhaltung des Pi-Gleichgewichtes der Zelle notwendig ist. Bei einer Störung der cytoplasmatischen Pi-Homöostase würde dieser Mechanismus einen Signalweg aktivieren, der die Pi-Mangelantwort in Gang setzt. Übereinstimmend konnten Lai *et al.* (2007) in *A. thaliana* nachweisen, dass Pflanzen, die in Medium mit hohem Pi-Gehalt vorinkubiert wurden, eine spätere Aktivierung der *PSR*-Gene zeigten als Pflanzen, die in Medium mit einem niedrigen Pi-Gehalt vorinkubiert wurden. Die Autoren interpretierten dies als Hinweis, dass die *PSR*-Genexpression durch zellinterne Signale und nicht durch die extrazelluläre Pi-Konzentration kontrolliert wird. Auch in der vorgelegten Arbeit wurden

klare Hinweise darauf gefunden, dass BY-2 Zellen einen cytoplasmatischen Pi-Schwellenwert regulieren. So wurde bei den *in vivo* NMR-Studien festgestellt, dass die cytoplasmatische Pi-Konzentration nicht über einen bestimmten Wert anstieg, auch wenn ausreichend extrazelluläres Pi vorhanden war. Stattdessen wurde Pi weiter in die Vakuole akkumuliert, während die cytoplasmatische Pi-Konzentration konstant gehalten wurde (Abbildung 3-31c, Seite 89).

Der transiente Charakter der Transkription der *PSR*-Gene wurde im Versuchsansatz von Köck *et al.* (1998) mit einer Wiederherstellung der cytoplasmatischen Pi-Konzentration erklärt, welche auf die Pi-Aufnahme aus dem Medium oder die Freisetzung von vakuolärem Pi zurückzuführen ist. Interessanterweise konnte anhand von *in vivo* NMR-Messungen festgestellt werden, dass Pi sehr langsam aus der Vakuole freigesetzt wurde und darum die kurzfristigen Pi-Fluktuationen im Cytoplasma nicht decken konnte (Roby *et al.*, 1987a, Loughman *et al.*, 1989). So konnten Loughman *et al.* (1989) zeigen, dass 1.5 h nach Mannosezugabe noch keine Änderung im vakuolären Pi-Pool messbar war. Nach Inkubation von Vakuolen aus *Hordeum vulgare* in Pi-freiem Medium wurde ebenfalls ein sehr langsamer Efflux von Pi gemessen (Martinoia *et al.*, 1986). Diese Studien widerlegen die häufige Auffassung, dass die Vakuole auf die Störung der cytoplasmatischen Pi-Konzentration sofort reagieren könnte. In dieser Arbeit und nach Köck *et al.* (1998) konnte außerdem gezeigt werden, dass die Induktion der *PSR*-Gene bereits nach 2 h stattfindet, noch bevor Pi aus der Vakuole freigesetzt wird. Der zeitlich verzögerte Efflux des vakuolären Pi stellt eine Rolle der Vakuole für die Regulation der Pi-Mangelantwort in Frage, da die Genaktivierung offensichtlich früher passiert als die Wiederherstellung der cytoplasmatischen Pi-Homöostase über den vakuolären Pi-Speicher. Im Zusammenhang mit der hier nachgewiesenen intrazellulären Akkumulation und dem Effekt von Phi auf die Genaktivierung ergibt sich hier ein Ansatzpunkt, um den Mechanismus des cytoplasmatischen Pi-Sensing mit Hilfe von Phi weiter aufzuklären. Die Effekte von Phi sind in Abbildung 4-2 zusammengefasst.





**Abbildung 4-2:** Zusammenfassung der Effekte von Phi in Pflanzenzellen. Phi hemmt die Pi-Aufnahme, die *PSR*-Genexpression, das Wachstum (Mitose) und die Pi-Wahrnehmung. Weiterhin wurde durch *in vivo* NMR gezeigt, dass Phi nicht von BY-2 Zellen verstoffwechselt und nur in geringem Umfang in die Vakuolen transportiert wurde.

#### 4.7 Transportmechanismen von Pi und Phi in die Vakuole

Wie bereits unter Kapitel 4.3 diskutiert, wurde durch *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR die intrazelluläre Verteilung von Pi und Phi in Tabakzellkulturen untersucht. Die Verteilung von Phi in Pi-verarmten Zellen zeigte eine ausgeprägte cytoplasmatische Anreicherung von Phi. Gleichzeitig wurde nach den vakuolären Phi-Signalen nur eine geringe Menge Phi weiter in die Vakuole transportiert. Der Transport von Phi in die Vakuole war kein bevorzugter Prozess (Abbildung 3-33, Seite 93). Dies stand in deutlichem Kontrast zum subzellulären Verteilungsmuster von Pi (vgl. Abbildung 4-1, Seite 106). In einem anderen Experiment wurde Pi zu Pi-verarmten Zellen gegeben. Pi wurde hier sehr schnell ins Cytoplasma aufgenommen. Allerdings wurde der Spiegel an cytoplasmatischem Pi von den Zellen streng reguliert. Nach Erreichen eines Pi-Schwellenwertes wurde das überschüssig aufgenommene Pi nicht weiter im Cytoplasma akkumuliert, sondern direkt in die Vakuole transportiert und dort gespeichert (Abbildung 3-31, Seite 89).

Aus den dargestellten Verteilungsmustern von Pi und Phi ergibt sich die Frage, warum beide Stoffe so unterschiedlich in die zellulären Kompartimente aufgenommen werden. Aufgrund der Strukturhomologie beider Stoffe sowie anhand der gezeigten kinetischen Daten hätte man auch eine weitgehend identische Verteilung von Pi und Phi in den Zellkompartimenten erwarten können. Der dennoch beobachtete Unterschied könnte zum Beispiel vom metabolischen Zustand der Zellen abhängen. Es ist auch nicht auszuschließen, dass grundlegend verschiedene Mechanismen für den subzellulären Transport von Pi und Phi verantwortlich sind.

Die genaue Interpretation dieser Daten wird dadurch erschwert, dass die molekularen und biochemischen Mechanismen, welche die Fluxprozesse von Pi über die vakuoläre Membran (Tonoplast) erlauben und regulieren, nur teilweise bekannt sind (Shimaoka *et al.*, 2004). Es ist nicht bekannt, welche Membranproteine für die Translokation von Pi oder Phi vom Cytoplasma in die Vakuole verantwortlich sind. Es wurde versucht durch Proteomics-Analysen aus *A. thaliana* Pi-Transporter des Tonoplasten zu identifizieren. Bisher waren diese Bemühungen aber leider erfolglos (Carter *et al.*, 2004, Shimaoka *et al.*, 2004). Die Beteiligung von Anionen-Kanälen am vakuolären Pi-Transport wurde ebenfalls erörtert (Dunlop & Phung, 1998, Massonneau *et al.*, 2000). Durch Patch-Clamp-Untersuchungen wurde ein Anionen-Kanal identifiziert, der eine hohe Affinität für  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  aufweist (Dunlop *et al.*, 1998). Die Autoren wiesen allerdings darauf hin, dass der Anion-Kanal unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich nicht für Pi permeabel ist. Darüber hinaus konnte die Pi-Aufnahme in intakten Vakuolen trotz Anwendung von Anionen-Kanal-Inhibitoren nicht gehemmt werden (Massonneau *et al.*, 2000). Die tatsächliche Bedeutung von Anionen-Kanälen für den Pi-Transport bleibt deshalb unklar.

Nimmt man an, dass ähnliche Mechanismen den Pi- und Phi-Transport in die Vakuole realisieren, wie sie auch für die Phosphataufnahme über die Plasmamembran verantwortlich sind, würde man erwarten, dass Pi und Phi (i) über die gleichen putativen Transporter aufgenommen werden und (ii) der Transport beider Substanzen abhängig von ATP bzw. P<sub>i</sub> in einem sekundär aktiven Transport stattfindet. In diesem Fall wäre eine ATP-Limitierung bei Pi-Mangel eine plausible Erklärung für die cytoplasmatische Phi-Anreicherung in dieser Situation. Es könnte sein, dass Phi aufgrund eines ATP-Mangels nur sehr langsam in die Vakuole aufgenommen werden konnte, da der vakuoläre Pi-Influx nur bei guter Pi-Versorgung bzw. höhere Konzentrationen an ATP aktiviert wird.

Als Bestätigung für die zweite Annahme konnte die Energieabhängigkeit des vakuolären Pi-Transportes auch in den kinetischen Studien mit intakten Vakuolen aus *S. lycopersicum*

bewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass die Pi-Aufnahme sowohl in Vakuolen aus Pi-gesättigten als auch in Vakuolen aus Pi-verarmten Zellen in der Gegenwart von ATP bzw. PPI stimuliert wurde (Abbildung 3-28, Seite 85). Beide Energielieferanten konnten den Pi-Transport unabhängig voneinander anregen. Dies deutet, vergleichbar mit der Pi-Aufnahme über die Plasmamembran, auf einen sekundär-aktiven Transport hin, welcher auf die Aktivität einer ATP-abhängigen (V-ATPase) bzw. einer PPI-abhängigen Phosphatase (V-PPiase) angewiesen ist. In der Gegenwart von ATP wiesen die Vakuolen aus den Pi-gesättigten Zellen einen höheren Pi-Influx auf als die Vakuolen aus den Pi-verarmten Zellen. (Abbildung 3-29, Seite 85). Dies steht in Übereinstimmung mit den dargestellten NMR-Daten, die belegen, dass in Pi-verarmten Zellen auch Phi sehr langsam in die Vakuole akkumuliert wurde. In den NMR-Spektren war außerdem deutlich zu erkennen, dass Pi-unterversorgte Tabakzellen verminderte NTP-Levels aufwiesen. Dies ließe vermuten, dass die geringe Transportaktivität durch eine generelle Energielimitierung mit verursacht wurde. Erst nach Decken des Pi-Bedarfs im Cytoplasma wurden die Mechanismen aktiviert, um Pi in der Vakuole zu akkumulieren.

Ähnliche Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass der Pi-Transport über den Tonoplasten intakter Vakuolen aus *C. roseus* und *H. vulgare* durch ATP und PPI stimuliert wird. Die Vakuolen aus *C. roseus* wiesen eine Sättigungskinetik der Pi-Aufnahme mit einem  $K_m$ -Wert von 5 mM auf (Massonneau *et al.*, 2000). In der Anwesenheit von ATP blieb der Pi-Transport in Vakuolen aus *H. vulgare* bis zu einer Konzentration von 20 mM linear, was dem höchsten physiologisch gemessenen Wert einer cytoplasmatischen Pi-Konzentration entspricht (Mimura *et al.*, 1990). Dies bedeutet, dass in den Tonoplasten beider Spezies niedrig-affine Aufnahmesysteme, aber keine hoch-affinen Pi-Transporter mit Michaelis-Menten-Konstanten im  $\mu\text{M}$ -Bereich nachgewiesen werden konnten.

Darüber hinaus ist zu bedenken, dass Zellen bei Pi-Mangel die Pi-Speicher in den Vakuolen mobilisieren und Pi dazu exportieren. In dieser Situation wird Pi kontrolliert aus den Vakuolen freigesetzt und Phi würde vermutlich sehr schlecht, entgegengesetzt zu diesem Export, in der Vakuole akkumulieren. Auch diese Interpretation stimmt mit den Daten der *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR überein, die eine geringe Phi-Konzentration in Vakuolen von Pi-verarmten Zellen zeigten.

Eine weitere Erklärung für die geringe Aufnahme von Phi in die Vakuole könnte in einer erhöhten Aktivität oder Proteinmenge der V-PPiase, die PPI als Energiedonor benutzt, gefunden werden. Die Aktivierung PPI-verbrauchender Reaktionen ist ein Mechanismus vieler Pflanzen zum Umgang mit ATP-limitierten Bedingungen, da die Hydrolyse von PPI

einerseits Energie für den Ablauf der Reaktionen und gleichzeitig freies Pi liefert (Plaxton *et al.*, 2006). Palma *et al.* (2000) berichteten, dass Pi-Mangel zu einer Erhöhung der hydrolytischen Aktivität der vakuolären H<sup>+</sup>-PPiase in *B. nigra* führte. Durch Western-Blot-Studien wurde eine Korrelation zwischen Aktivität und Proteinmenge festgestellt. Die Aktivität und die Proteinmenge der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase blieben dagegen unverändert. Eine erhöhte H<sup>+</sup>-PPiase-Aktivität wurde auch in Vakuolen aus Pi-verarmten *C. roseus*-Zellen gefunden (Ohnishi *et al.*, 2007). Parallel dazu wurde hier aber auch eine erhöhte Aktivität der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse berichteten Kasai *et al.* (1998) nach der Kultivierung von Zellen in einer verdünnten Nährlösung (allgemeiner Nährstoffmangel).

Weitere Untersuchungen sollten darauf gerichtet werden, den Gehalt und die Aktivität der vakuolären H<sup>+</sup>-PPiase in Pi-verarmten Tabakzellen zu untersuchen. So könnte eingeschätzt werden, ob der geringe Phi-Transport in die Vakuole mit H<sup>+</sup>-PPiasen in Zusammenhang steht. Es wäre hier ebenfalls interessant, welchen Einfluss Phi auf eine Erhöhung der Aktivität der vakuolären H<sup>+</sup>-PPiase unter Pi-Mangel ausübt.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Transport von Pi und Phi am Tonoplasten ganz anders geregelt wird als der Import beider Stoffe über das Plasmalemma. Die Zugabe von Pi zu Phi-behandelten Tabakzellen führte zu einer Erhöhung der NTP-Signalintensitäten. Falls tatsächlich der niedrige ATP-Level der limitierende Faktor für den vakuolären Phi-Transport war, sollte nun Phi in die Vakuole transportiert werden. In diesem Fall akkumulierte Phi jedoch nur sehr geringfügig in die Vakuole und wurde dagegen in das Medium ausgeschieden (Abbildung 3-35, Seite 94). Allein Pi wurde in die Vakuole transportiert. Übereinstimmend akkumulierten Pi-gesättigte Zellen Phi ebenfalls nur in geringem Maß in der Vakuole und fast gar nicht im Cytoplasma (Abbildung 3-38, Seite 97).

Ohnishi *et al.* (2007) beschrieben für *C. roseus*, dass Vakuolen aus Pi-verarmten Zellen einen höheren Pi-Influx als Vakuolen aus Pi-gesättigten Zellen zeigten. Die Autoren erklären diese Ergebnisse teilweise mit den elektrochemischen Gradienten durch den Tonoplasten. Nimmt man an, dass die Vakuolen unabhängig von ihrem Pi-Status den gleichen Unterschied im Membranpotenzial aufweisen, dann würde der Konzentrationsgradient die einzige Triebkraft des Pi-Transportes sein. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass Vakuolen aus Pi-unterversorgten Zellen höhere Pi-Aufnahmegeschwindigkeiten aufweisen. Falls der Pi-Influx-Mechanismus tatsächlich so zu erklären wäre, stellt sich die Frage, warum Phi im Cytoplasma akkumuliert und nicht in die Vakuole transportiert wird. Die hier gezeigten NMR-Ergebnisse

für Phi widersprechen also einem Transportmechanismus aufgrund eines reinen Konzentrationsgefälles.

Die NMR-Ergebnisse dieser Arbeit wären dann gut zu erklären, wenn doch unterschiedliche Transportsysteme für Pi und Phi verantwortlich wären. So könnte der Transport von Phi in die Vakuole zum Beispiel eine Entgiftungsreaktion sein. Ein bekannter Mechanismus zur Detoxifizierung von Giftstoffen (z. B. Schwermetalle, Herbizide) ist die Sequestrierung ihrer Glutathionkonjugate (GS-Konjugate) in die Vakuole (Kreuz *et al.*, 1996, Cobbett & Goldsbrough, 2002). Die vakuoläre „Verklappung“ der GS-Konjugate ist ein aktiver Transportprozess, der über eine ATP-abhängige Glutathionpumpe am Tonoplasten vermittelt wird (Martinoia *et al.*, 1993). Ein solcher Entgiftungsmechanismus wurde in *S. cerevisiae* für Arsenit, ein Struktur-Analogon von Phi, nachgewiesen. Zur Entgiftung von cytosolischem Arsenit in Hefe gibt es zwei Wege (Ghosh *et al.*, 1999). Der erste Weg ist die Ausscheidung von Arsenit ins Medium durch einen Plasmamembran-lokalisierten Transporter. Der zweite Weg ist eine vakuoläre Sequestrierung über ein Arsenit-GS-Konjugat. Die bei BY-2 Zellen beobachtete Ausscheidung von Phi direkt nach der Pi-Zugabe könnte möglicherweise analog zu diesem Ausscheidungsweg von Arsenit erfolgen. Eine Entgiftung von Phi über GS-Konjugate würde die verschiedenen Transportwege und das unterschiedliche Verteilungsmuster von Pi und Phi erklären. Die Bildung eines Arsenit-GS-Konjugates konnte durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden (Delnomdedieu *et al.*, 1994). Die Autoren konnten zeigen, dass Glutathionkonjugate mit Arsenit, aber nicht mit Arsenat bildet. Der Transport des Arsenit-GS-Konjugates wird in die Vakuole über den ATP-binding cassette (ABC)-Transporter YCF1 (yeast cadmium factor 1) vermittelt. YCF1 verleiht den Hefezellen eigentlich  $\text{Cd}^{2+}$ -Toleranz durch Transport von Bis(glutathionato)cadmium-Komplexen. Das Protein zeigt eine Homologie mit dem menschlichen MRP1 (multi-drug resistance-associated protein 1) und agiert als eine GS-Konjugatpumpe mit einem breiten Substratspektrum (Szczypka *et al.*, 1994). Die  $\Delta ycf1$ -Mutante aus *S. cerevisiae* weist eine Hypersensitivität nicht nur gegenüber  $\text{Cd}^{2+}$  sondern auch gegenüber Arsenit auf. Die Existenz eines analogen Entgiftungsmechanismus für Phi, der für die Sequestrierung von Phi in der Vakuole verantwortlich sein könnte, sollte überprüft werden. Eine Bestätigung dieses Mechanismus können sowohl Aufnahmestudien von Phi in  $\Delta ycf1$ -Mutanten als auch Kompetitionsstudien mit dem Transport bekannter GS-Konjugate liefern. Im zweiten Fall würden die  $K_i$ -Werte verglichen, wobei gleiche  $K_i$ -Werte auf den gleichen Carrier hindeuten. Phi-GS-Komplexe könnten durch Strukturanalyse mit Hilfe von NMR-Spektroskopie wie bei Arsenit nachgewiesen werden.

## 5 Zusammenfassung

Phosphit ( $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ , Phi), die reduzierte Form von Phosphat ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , Pi), findet als Wirkstoff von Fungiziden eine breite Anwendung im Pflanzenbau. Phi wirkt gegen Oomyceten, besonders gegen *Phytophthora*-Spezies, die eine Reihe von Pflanzenkrankheiten verursachen. Unter Pi-defizienten Bedingungen kann Phi jedoch auch die Pi-Homöostase von Pflanzen stören und damit ernsthafte Folgen für die Pflanzenentwicklung und das Ökosystem haben. Um den Einfluss von Phi auf Pflanzen besser zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die stoffwechselphysiologische Wirkung von Phi bei Pi-Mangel genauer untersucht.

Zur Aufklärung der Wirkungsweise von Phi in Pflanzenzellen wurden Experimente mit Zellsuspensionskulturen aus *Solanum lycopersicum* und *Nicotiana tabacum* sowie mit Pflanzen aus *S. lycopersicum* und *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Die Wirkung von Phi unter Pi-reichen und Pi-armen Wachstumsbedingungen wurde anhand physiologischer Parameter wie Frischgewicht, Wurzelwachstum, Wurzel/Sproß-Verhältnis, Anthocyanbildung (Stressmarker), Chlorophyllgehalt und Effizienz des Photosystems II (Vitalitätsmarker) konzentrationsabhängig bestimmt. Transkriptionsanalysen durch Northern-Blots und qRT-PCR wurden eingesetzt, um die Expression von *PSR*-Genen in Abhängigkeit von Phi in Zellkulturen und ganzen Pflanzen zu verfolgen. Mittels kinetischer Studien wurde die Hemmwirkung von Phi auf das hoch-affine Pi-Transportsystem von Tomaten- und Tabakzellen bei Pi-Mangel charakterisiert. Mit Hilfe von *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR wurden Metabolitprofile von BY-2 Tabakzellen aufgenommen, um die subzelluläre Verteilung von Phi genauer zu beschreiben und den Stoffwechseleinfluss von Phi *in vivo* zu charakterisieren.

Es konnte gezeigt werden, dass Phi die Pi-Aufnahme in Pi-verarmten Zellen in einem kompetitiven Mechanismus hemmt. Eine intrazelluläre Akkumulation von Phi konnte mittels *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR bestätigt werden. Die Interaktion von Phi mit dem Pi-Transport und seine intrazelluläre Akkumulation lassen vermuten, dass Phi über das hoch-affine Pi-Transportsystem in die Pflanzenzelle gelangt.

Durch ihre pH-abhängige chemische Verschiebung im NMR-Spektrum konnten Pi und Phi unabhängig voneinander jeweils in Cytoplasma und Vakuole nachgewiesen werden. Pi-verarmte Zellen nahmen Pi bis zum Erreichen eines physiologischen Schwellenwertes ins Cytoplasma auf und speicherten extrazelluläres Pi danach kontinuierlich in der Vakuole.

Das Anreicherungsmuster von Phi war dagegen vom metabolischen Status der Zellen abhängig. In Pi-verarmten Zellen mit vergleichsweise geringer Stoffwechselaktivität akkumulierte Phi vorwiegend im Cytoplasma und kaum in der Vakuole. Wurden diese Phi-gesättigten Zellen dann mit Pi versorgt, erhöhte sich die Stoffwechselaktivität und es konnte ein schneller Efflux (3 h) von Phi ins extrazelluläre Medium bzw. in geringerem Maß eine Translokation von Phi in die Vakuole beobachtet werden. Pi-versorgte Zellen mit bereits erhöhter Stoffwechselaktivität akkumulierten Phi ebenfalls nicht im Cytoplasma, sondern direkt in der Vakuole. Zusammengefasst scheinen BY-2 Zellen unterschiedliche Transportmechanismen für Pi und Phi zu besitzen, die bei guter Stoffwechselaktivität zu einem Export von Phi aus dem Cytoplasma führen.

Die Anwendung von *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR ermöglichte weiterhin, einen Einfluss von Phi auf den Primärstoffwechsel der Pflanzenzellen über 20 h zu verfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass Phi trotz ausgeprägter cytoplasmatischer Anreicherung bei Pi-Mangel Pi im Pflanzenstoffwechsel nicht ersetzen konnte. Es wurde keine messbare Einwirkung von Phi auf den Pflanzenstoffwechsel detektiert. Der metabolische Zustand und die Energieladung der Zellen blieben unverändert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Phi-gesättigte Zellen noch nach mehreren Stunden auf die Zugabe von Pi mit einer raschen Stoffwechselaktivierung reagierten. Damit konnte eine Stoffwechselschädigung durch Phi ausgeschlossen werden.

Phi führte in Pi-unterversorgten Zellkulturen und Pflanzen zu einer starken Repression der Pi-Mangelantwort. Morphologische Analysen von Tomatenpflanzen zeigten ein vermindertes Haupt- und Lateralwurzelwachstum und ein stark reduziertes Wurzel/Spross-Verhältnis bei Phi-Behandlung. Dies sind typische Eigenschaften Pi-versorgter Tomatenpflanzen, die keine Pi-Mangelantwort ausbilden. Zusätzlich wurden auch in Zellkulturen ein gehemmtes Wachstum und außerdem eine stark gehemmte Zellteilung festgestellt.

Mit Hilfe von Northern-Hybridisierungen und qRT-PCR wurde eine detaillierte Untersuchung der Aktivierung der PSR-Gene (*Phosphate Starvation Responsive-Gene*) *RNaseLX*, *RNaseLE*, *LePS2* und *LePT2* in der Gegenwart von Phi durchgeführt. Phi reprimierte die Induktion der PSR-Gene bei Pi-Mangelbedingungen. In Zusammenhang mit der cytoplasmatischen Phi-Anreicherung in Pi-verarmten Zellen wies dies auf eine Interaktion mit der Wahrnehmung (Pi-Sensing) der cytoplasmatischen Pi-Konzentration hin.

Es wurden deutliche Hinweise gefunden, dass Phi selektiv an der Aktivierung der Pi-Mangelantwort angreift. So konnte Phi die Induktion der *RNaseLE* in anderen physiologischen Prozessen wie Verwundung und Zellwandabbau nicht reprimieren. Nur wenn *RNaseLE* durch einen Pi-Mangel aktiviert wurde, konnte Phi in den Signalweg eingreifen.

Außerdem konnte Phi die Bildung sekundärer Pflanzenstoffe, die Chlorophyll-Synthese und die Photosyntheseleistung nicht hemmen, was eine generelle Toxizität von Phi ausschließt.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Phi die Pi-Mangelantwort von Pflanzen und Pflanzenzellkulturen selektiv hemmt. Außerdem wurde bewiesen, dass Phi in Cytoplasma und Vakuole aufgenommen wird, aber abhängig vom Stoffwechsellzustand der Zellen anders in diese subzellulären Kompartimente verteilt wird als Pi.



## 6 Literaturverzeichnis

- Abel S., Nurnberger T., Ahnert V., Krauss G.J. & Glund K. (2000) Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of cultured tomato cells. *Plant Physiology*, **122**, 543-552.
- Abel S., Ticconi C.A. & Delatorre C.A. (2002) Phosphate sensing in higher plants. *Physiologia Plantarum*, **115**, 1-8.
- Al-Ghazi Y., Muller B., Pinloche S., Tranbarger T.J., Nacry P., Rossignol M., Tardieu F. & Doumas P. (2003) Temporal responses of *Arabidopsis* root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant Cell and Environment*, **26**, 1053-1066.
- Arnon D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, **24**, 1-15.
- Ashihara H., Li X.N. & Ukaji T. (1988) Metabolic regulation in plant cell culture .25. Effect of inorganic phosphate on the biosynthesis of purine and pyrimidine nucleotides in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Annals of Botany*, **61**, 225-232.
- Atkinson D.E. (1968) Energy charge of adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, **7**, 4030-&.
- Aubert S., Gout E., Bligny R., Marty-Mazars D., Barrieu F., Alabouvette J., Marty F. & Douce R. (1996) Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: Control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *Journal of Cell Biology*, **133**, 1251-1263.
- Aung K., Lin S.I., Wu C.C., Huang Y.T., Su C.L. & Chiou T.J. (2006) *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a MicroRNA399 target gene. *Plant Physiology*, **141**, 1000-1011.
- Baldwin J.C., Karthikeyan A.S. & Raghothama K.G. (2001) LEPS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiology*, **125**, 728-737.
- Barchietto T., Saindrenan P. & Bompeix G. (1989) Characterization of phosphonate uptake in two *Phytophthora* spp. and its inhibition by phosphate. *Archives of Microbiology*, **151**, 54-58.
- Barchietto T., Saindrenan P. & Bompeix G. (1992) Physiological responses of *Phytophthora Citrophthora* to a subinhibitory concentration of phosphonate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **42**, 151-166.
- Bari R., Pant B.D., Stitt M. & Scheible W.R. (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology*, **141**, 988-999.
- Bariola P.A., Howard C.J., Taylor C.B., Verburg M.T., Jaglan V.D. & Green P.J. (1994) The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant Journal*, **6**, 673-685.
- Bates T.R. & Lynch J.P. (1996) Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell and Environment*, **19**, 529-538.
- Bates T.R. & Lynch J.P. (2000) Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, **87**, 958-963.
- Baykov A.A., Evtushenko O.A. & Avaeva S.M. (1988) A Malachite Green Procedure for Ortho-Phosphate Determination and Its Use in Alkaline Phosphatase-Based Enzyme-Immunoassay. *Analytical Biochemistry*, **171**, 266-270.
- Bergmeyer H.U. (1974) *Methods of enzymatic analysis* (vol. 1). Verlag Chemie, Weinheim.
- Bergmeyer H.U. & Bergmeyer J. (1984) *Methods of enzymatic analysis* (vol. 4). Verlag Chemie, Weinheim.

- Bieleski R.L. (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **24**, 225-252.
- Bileski R. & Ferguson I. (1983) *Physiology and metabolism of phosphate and its compounds* (vol. 15A). Springer, Berlin.
- Bligny R. & Douce R. (2001) NMR and plant metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 191-196.
- Blume B. & Grierson D. (1997) Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana glauca* regulated by developmental and environmental stimuli. *Plant Journal*, **12**, 731-746.
- Boller T. & Kende H. (1979) Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiology*, **63**, 1123-1132.
- Bosse D. & Köck M. (1998) Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. *Plant Cell and Environment*, **21**, 325-332.
- Bozzo G.G., Dunn E.L. & Plaxton W.C. (2006) Differential synthesis of phosphate-starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. *Plant Cell and Environment*, **29**, 303-313.
- Bozzo G.G., Raghothama K.G. & Plaxton W.C. (2002) Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 6278-6286.
- Bradford M.M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Bryce J.H., Azconbieto J., Wiskich J.T. & Day D.A. (1990) Adenylate control of respiration in plants: the contribution of rotenone-insensitive electron-transport to ADP-limited oxygen consumption by soybean mitochondria. *Physiologia Plantarum*, **78**, 105-111.
- Bucher M. (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist*, **173**, 11-26.
- Carnal N.W. & Black C.C. (1979) Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase, a new glycolytic enzyme in pineapple leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **86**, 20-26.
- Carswell C., Grant B.R., Theodorou M.E., Harris L., Niere J.O. & Plaxton W.C. (1996) The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiology*, **110**, 105-110.
- Carswell M.C., Grant B.R. & Plaxton W.C. (1997) Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta*, **203**, 67-74.
- Carter C., Pan S.Q., Jan Z.H., Avila E.L., Girke T. & Raikhel N.V. (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell*, **16**, 3285-3303.
- Carystinos G.D., MacDonald H.R., Monroy A.F., Dhindsa R.S. & Poole R.J. (1995) Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiology*, **108**, 641-649.
- Chen A.Q., Hu J., Sun S.B. & Xu G.H. (2007) Conservation and divergence of both phosphate- and mycorrhiza-regulated physiological responses and expression patterns of phosphate transporters in *Solanaceous* species. *New Phytologist*, **173**, 817-831.
- Chen D.L., Delatorre C.A., Bakker A. & Abel S. (2000) Conditional identification of phosphate-starvation-response mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **211**, 13-22.
- Cheng Y. & Prusoff W.H. (1973) Relationship between inhibition constant ( $K_I$ ) and concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction\*. *Biochemical Pharmacology*, **22**, 3099-3108.

- Chiou T.J. (2007) The role of microRNAs in sensing nutrient stress. *Plant Cell and Environment*, **30**, 323-332.
- Chiou T.J., Liu H. & Harrison M.J. (2001) The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPT1) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. *Plant Journal*, **25**, 281-293.
- Ciereszko I., Gniazdowska A., Mikulska M. & Rychter A.M. (1996) Assimilate translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *Journal of Plant Physiology*, **149**, 343-348.
- Cobbett C. & Goldsbrough P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, **53**, 159-182.
- Cruz-Ramirez A., Oropeza-Aburto A., Razo-Hernandez F., Ramirez-Chavez E. & Herrera-Estrella L. (2006) Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 6765-6770.
- Dakora F.D. & Phillips D.A. (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*, **245**, 35-47.
- Dancer J., Veith R., Feil R., Komor E. & Stitt M. (1990) Independent changes of inorganic pyrophosphate and the ATP/ADP or UTP/UDP ratios in plant cell suspension cultures. *Plant Science*, **66**, 59-63.
- Daram P., Brunner S., Persson B.L., Amrhein N. & Bucher M. (1998) Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta*, **206**, 225-233.
- Daram P., Brunner S., Rausch C., Steiner C., Amrhein N. & Bucher M. (1999) *Pht2;1* encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **11**, 2153-2166.
- Davies J.M., Poole R.J. & Sanders D. (1993) The computed free-energy change of hydrolysis of inorganic pyrophosphate and ATP: Apparent significance for inorganic pyrophosphate-driven reactions of intermediary metabolism. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1141**, 29-36.
- Day D.A. & Wiskich J.T. (1995) Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **27**, 379-385.
- Delhaize E. & Randall P.J. (1995) Characterization of a phosphate accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, **107**, 207-213.
- Delnomdedieu M., Basti M.M., Otvos J.D. & Thomas D.J. (1994) Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione: a magnetic resonance study. *Chemico-Biological Interactions*, **90**, 139-155.
- Dietz K.J., Lang M., Schonrock M. & Zink C. (1990) ATP Dependence of Anion Uptake by Isolated Vacuoles: Requirement for Excess  $Mg^{2+}$ . *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1024**, 318-322.
- Dinkelaker B., Hengeler C. & Marschner H. (1995) Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Botanica Acta*, **108**, 183-200.
- Dixon M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochemical Journal*, **55**, 170-171.
- Dodds P.N., Clarke A.E. & Newbiggin E. (1996) Molecular characterisation of an S-like RNase of *Nicotiana glauca* that is induced by phosphate starvation. *Plant Molecular Biology*, **31**, 227-238.
- Duff S.M.G., Lefebvre D.D. & Plaxton W.C. (1989a) Purification and characterization of a phosphoenolpyruvate phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiology*, **90**, 734-741.
- Duff S.M.G., Lefebvre D.D. & Plaxton W.C. (1991a) Purification, characterization and subcellular localization of an acid phosphatase from black mustard cell-suspension

- cultures: comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **286**, 226-232.
- Duff S.M.G., Moorhead G.B.G., Lefebvre D.D. & Plaxton W.C. (1989b) Phosphate starvation inducible bypasses of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiology*, **90**, 1275-1278.
- Duff S.M.G., Plaxton W.C. & Lefebvre D.D. (1991b) Phosphate starvation response in plant cells: *De novo* synthesis and degradation of acid phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 9538-9542.
- Duff S.M.G., Sarath G. & Plaxton W.C. (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum*, **90**, 791-800.
- Dunlop J. & Phung T. (1998) Phosphate and slow vacuolar channels in *Beta vulgaris*. *Australian Journal of Plant Physiology*, **25**, 709-718.
- Fenn M.E. & Coffey M.D. (1984) Studies on the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of Fosetyl-Al and phosphorus acid. *Phytopathology*, **74**, 606-611.
- Fenn M.E. & Coffey M.D. (1989) Quantification of phosphonate and ethyl phosphonate in tobacco and tomato tissues and significance for the mode of action of two phosphonate fungicides. *Phytopathology*, **79**, 76-82.
- Fernie A.R., Carrari F. & Sweetlove L.J. (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 254-261.
- Föhse D., Claassen N. & Jungk A. (1991) Phosphorus efficiency of plants .II. Significance of root radius, root hairs and cation-anion balance for phosphorus influx in 7 plant species. *Plant and Soil*, **132**, 261-272.
- Frearson E.M., Power J.B. & Cocking E.C. (1973) Isolation, culture and regeneration of petunia leaf protoplasts. *Developmental Biology*, **33**, 130-137.
- Fredeen A.L., Raab T.K., Rao I.M. & Terry N. (1990) Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in *Glycine Max* (L.) Merr. *Planta*, **181**, 399-405.
- Fujii H., Chiou T.J., Lin S.I., Aung K. & Zhu J.K. (2005) A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis. *Current Biology*, **15**, 2038-2043.
- Furihata T., Suzuki M. & Sakurai H. (1992) Kinetic characterization of two phosphate-uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. *Plant and Cell Physiology*, **33**, 1151-1157.
- Gahoonia T.S. & Nielsen N.E. (1998) Direct evidence on participation of root hairs in phosphorus (<sup>32</sup>P) uptake from soil. *Plant and Soil*, **198**, 147-152.
- Ghosh M., Shen J. & Rosen B.P. (1999) Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 5001-5006.
- Gilbert G.A., Knight J.D., Vance C.P. & Allan D.L. (1999) Acid phosphatase activity in phosphorus-deficient white lupin roots. *Plant Cell and Environment*, **22**, 801-810.
- Gilbert G.A., Knight J.D., Vance C.P. & Allan D.L. (2000) Proteoid root development of phosphorus deficient lupin is mimicked by auxin and phosphonate. *Annals of Botany*, **85**, 921-928.
- Glund K., Tewes A., Abel S., Leinhos V., Walther R. & Reinbothe H. (1984) Vacuoles from cell Suspension cultures of tomato (*Lycopersicon Esculentum*): Isolation and characterization. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, **113**, 151-161.
- Goldstein A.H., Baertlein D.A. & McDaniel R.G. (1988a) Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*: 1. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension-cultured cells. *Plant Physiology*, **87**, 711-715.
- Goldstein A.H., Danon A., Baertlein D.A. & McDaniel R.G. (1988b) Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*: 2. Characterization of the

- phosphate starvation inducible excreted acid phosphatase. *Plant Physiology*, **87**, 716-720.
- Gonzalez E., Solano R., Rubio V., Leyva A. & Paz-Ares J. (2005) PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**, 3500-3512.
- Gout E., Bligny R. & Douce R. (1992a) Regulation of Intracellular pH Values in Higher Plant Cells - C-13 and P-31 Nuclear Magnetic Resonance Studies. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 13903-13909.
- Gout E., Bligny R., Genix P., Tissut M. & Douce R. (1992b) Effect of glyphosate on plant cell metabolism: <sup>31</sup>P and <sup>13</sup>C NMR studies. *Biochimie*, **74**, 875-882.
- Griffith J.M., Akins L.A. & Grant B.R. (1989) Properties of the phosphate and phosphite transport systems of *Phytophthora palmivora*. *Archives of Microbiology*, **152**, 430-436.
- Griffith J.M., Smillie R.H. & Grant B.R. (1990) Alterations in nucleotide and pyrophosphate levels in *Phytophthora palmivora* following exposure to the antifungal agent potassium phosphonate (Phosphite). *Journal of General Microbiology*, **136**, 1285-1291.
- Groß N. (2005) Die sekretorische RibonukleaseLE in *Lycopersicum esculentum*: Charakterisierung von Regulation und Funktion. *Dissertation*.
- Groß N., Wasternack C. & Köck M. (2004) Wound-induced *RNaseLE* expression is jasmonate and systemin independent and occurs only locally in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). *Phytochemistry*, **65**, 1343-1350.
- Guest D. & Grant B. (1991) The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **66**, 159-187.
- Hamburger D., Rezzonico E., Petetot J.M.C., Somerville C. & Poirier Y. (2002) Identification and characterization of the *Arabidopsis PHO1* gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell*, **14**, 889-902.
- Hammond J.P. & White P.J. (2008) Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 93-109.
- Haran S., Logendra S., Seskar M., Bratanova M. & Raskin I. (2000) Characterization of Arabidopsis acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiology*, **124**, 615-626.
- Hardy G.E.S., Barrett S. & Shearer B.L. (2001) The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology*, **30**, 133-139.
- Harold F.M. (1966) Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism and function. *Bacteriological Reviews*, **30**, 772-&.
- Harrison M.J., Dewbre G.R. & Liu J.Y. (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*, **14**, 2413-2429.
- Harrison M.J. & van Buuren M.L. (1995) A Phosphate Transporter from the Mycorrhizal Fungus *Glomus Versiforme*. *Nature*, **378**, 626-629.
- Härtel H., Dörmann P. & Benning C. (2000) DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 10649-10654.
- Hayes J.E., Richardson A.E. & Simpson R.J. (1999) Phytase and acid phosphatase activities in extracts from roots of temperate pasture grass and legume seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology*, **26**, 801-809.
- Herrmann K.M. & Weaver L.M. (1999) The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 473-503.

- Heslop-Harrison J. & Heslop-Harrison Y. (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: Intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology*, **45**, 115-&.
- Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., Engler J.D., Inze D. & Beeckman T. (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*, **14**, 2339-2351.
- Hinsinger P. (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, **237**, 173-195.
- Hoefnagel M.H.N., Millar A.H., Wiskich J.T. & Day D.A. (1995) Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **318**, 394-400.
- Hoefnagel M.H.N., Vaniren F. & Libbenga K.R. (1993) In suspension cultures of *Catharanthus roseus* the cyanide-resistant pathway is engaged in respiration by excess sugar in combination with phosphate or nitrogen starvation. *Physiologia Plantarum*, **87**, 297-304.
- Hoffland E., Vandenboogaard R., Nelemans J. & Findenegg G. (1992) Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. *New Phytologist*, **122**, 675-680.
- Holford I.C.R. (1997) Soil phosphorus: Its measurement, and its uptake by plants. *Australian Journal of Soil Research*, **35**, 227-239.
- Hörtensteiner S., Martinoia E. & Amrhein N. (1992) Reappearance of hydrolytic activities and tonoplast proteins in the regenerated vacuole of evacuated protoplasts. *Planta*, **187**, 113-121.
- Howard K., Dell B. & Hardy G.E. (2000) Phosphite and mycorrhizal formation in seedlings of three Australian Myrtaceae. *Australian Journal of Botany*, **48**, 725-729.
- Humbeck K. & Krupinska K. (1996) Does the Clp protease play a role during senescence-associated protein degradation in barley leaves? *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, **36**, 321-326.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. & Bevan M.W. (1987) GUS Fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo Journal*, **6**, 3901-3907.
- Jeschke W.D., Kirkby E.A., Peuke A.D., Pate J.S. & Hartung W. (1997) Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L). *Journal of Experimental Botany*, **48**, 75-91.
- Johnson J.F., Allan D.L. & Vance C.P. (1994) Phosphorus stress-induced proteoid roots show altered metabolism in *Lupinus albus*. *Plant Physiology*, **104**, 657-665.
- Johnson J.F., Allan D.L., Vance C.P. & Weiblen G. (1996) Root carbon dioxide fixation by phosphorus-deficient *Lupinus albus*: Contribution to organic acid exudation by proteoid roots. *Plant Physiology*, **112**, 19-30.
- Jones D.L. (1998) Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil*, **205**, 25-44.
- Jouhet J., Marechal E., Baldan B., Bligny R., Joyard J. & Block M.A. (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *Journal of Cell Biology*, **167**, 863-874.
- Jouhet J., Marechal E., Bligny R., Joyard J. & Block M.A. (2003) Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *Febs Letters*, **544**, 63-68.
- Jungk A. (2001) Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, **164**, 121-129.

- Juszczuk I.M., Wiktorowska A., Malusa E. & Rychter A.M. (2004) Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*, **267**, 41-49.
- Karandashov V. & Bucher M. (2005) Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Plant Science*, **10**, 22-29.
- Karthikeyan A.S., Varadarajan D.K., Mukatira U.T., D'Urzo M.P., Damsz B. & Raghothama K.G. (2002) Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiology*, **130**, 221-233.
- Kasai M., Nakamura T., Kudo N., Sato H., Maeshima M. & Sawada S. (1998) The activity of the root vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in rye plants grown under conditions deficient in mineral nutrients. *Plant and Cell Physiology*, **39**, 890-894.
- Keppler D. & Arias I.M. (1997) Introduction: Transport across the hepatocyte canalicular membrane. *Faseb Journal*, **11**, 15-18.
- Kime M.J., Ratcliffe R.G. & Loughman B.C. (1982) The application of <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance to higher plant tissue: 2. Detection of intracellular changes. *Journal of Experimental Botany*, **33**, 670-681.
- Klein M., Martinoia E., Hoffmann-Thoma G. & Weissenböck G. (2000) A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates. *Plant Journal*, **21**, 289-304.
- Klein M., Martinoia E. & Weissenböck G. (1998) Directly energized uptake of  $\beta$ -estradiol 17-( $\beta$ -D-glucuronide) in plant vacuoles is strongly stimulated by glutathione conjugates. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 262-270.
- Köck M. (2007) Die Rolle sekretorischer T2-Typ Ribonukleasen in Pflanzen: Lokalisation, Expression, Regulation. *Habilitationsschrift*.
- Köck M., Groß N., Stenzel I. & Hause G. (2004) Phloem-specific expression of the wound-inducible ribonuclease LE from tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). *Planta*, **219**, 233-242.
- Köck M., Löffler A., Abel S. & Glund K. (1995) cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant Molecular Biology*, **27**, 477-485.
- Köck M., Stenzel I. & Zimmer A. (2006) Tissue-specific expression of tomato Ribonuclease LX during phosphate starvation-induced root growth. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 3717-3726.
- Köck M., Theierl K., Stenzel I. & Glund K. (1998) Extracellular administration of phosphate-sequestering metabolites induces ribonucleases in cultured tomato cells. *Planta*, **204**, 404-407.
- Kollmeier M., Dietrich P., Bauer C.S., Horst W.J. & Hedrich R. (2001) Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiology*, **126**, 397-410.
- Kondracka A. & Rychter A.M. (1997) The role of Pi recycling processes during photosynthesis in phosphate-deficient bean plants. *Journal of Experimental Botany*, **48**, 1461-1468.
- Kornberg A., Rao N.N. & Ault-Riche D. (1999) Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry*, **68**, 89-125.
- Kreuz K., Tommasini R. & Martinoia E. (1996) Old enzymes for a new job: Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiology*, **111**, 349-353.
- Lai F., Thacker J., Li Y.Y. & Doerner P. (2007) Cell division activity determines the magnitude of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **50**, 545-556.

- Laloi M. (1999) Plant mitochondrial carriers: an overview. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **56**, 918-944.
- Lambers H., Shane M.W., Cramer M.D., Pearse S.J. & Veneklaas E.J. (2006) Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: Matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany*, **98**, 693-713.
- Lee R.B. & Ratcliffe R.G. (1993) Subcellular distribution of inorganic phosphate, and levels of nucleoside triphosphate, in mature maize roots at low external phosphate concentrations: Measurements with  $^{31}\text{P}$ -NMR. *Journal of Experimental Botany*, **44**, 587-598.
- Lee R.B., Ratcliffe R.G. & Southon T.E. (1990)  $^{31}\text{P}$ -NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots: Relationships with phosphorus status and phosphate fluxes. *Journal of Experimental Botany*, **41**, 1063-1078.
- Lee T.M., Tsai P.F., Shyu Y.T. & Sheu F. (2005) The effects of phosphite on phosphate starvation responses of *Ulva lactuca* (Ulvales, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, **41**, 975-982.
- Leggewie G., Willmitzer L. & Riesmeier J.W. (1997) Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: Identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell*, **9**, 381-392.
- Lehmann K., Hause B., Altmann D. & Kock M. (2001) Tomato ribonuclease LX with the functional endoplasmic reticulum retention motif HDEF is expressed during programmed cell death processes, including xylem differentiation, germination, and senescence. *Plant Physiology*, **127**, 436-449.
- Leier I., Jedlitschky G., Buchholz U., Cole S.P.C., Deeley R.G. & Keppler D. (1994) The MRP Gene Encodes an ATP-Dependent Export Pump for Leukotriene C<sub>4</sub> and Structurally Related Conjugates. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 27807-27810.
- Li M.G., Osaki M., Rao I.M. & Tadano T. (1997) Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions. *Plant and Soil*, **195**, 161-169.
- Li M.G. & Tadano T. (1996) Comparison of characteristics of acid phosphatases secreted from roots of lupin and tomato. *Soil Science and Plant Nutrition*, **42**, 753-763.
- Li M.Y., Welti R. & Wang X.M. (2006) Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of Phospholipases D $\zeta$ 1 and D $\zeta$ 2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. *Plant Physiology*, **142**, 750-761.
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, **148**, 350-382.
- Liu C.M., Muchhal U.S., Uthappa M., Kononowicz A.K. & Raghothama K.G. (1998) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiology*, **116**, 91-99.
- Lolkema J.S., Speelmans G. & Konings W.N. (1994) Na<sup>+</sup>-coupled versus H<sup>+</sup>-coupled energy transduction in bacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1187**, 211-215.
- Lopez-Bucio J., Cruz-Ramirez A. & Herrera-Estrella L. (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 280-287.
- Lopez-Bucio J., Hernandez-Abreu E., Sanchez-Calderon L., Nieto-Jacobo M.F., Simpson J. & Herrera-Estrella L. (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology*, **129**, 244-256.
- Lopez-Bucio J., Nieto-Jacobo M.F., Ramirez-Rodriguez V. & Herrera-Estrella L. (2000) Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, **160**, 1-13.



- Loughman B.C., Ratcliffe R.G. & Southon T.E. (1989) Observations on the cytoplasmic and vacuolar ortho-phosphate pools in leaf tissues using *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy. *Febs Letters*, **242**, 279-284.
- Lynch J. (1995) Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology*, **109**, 7-13.
- Lynch J. & Brown K.M. (1997) Ethylene and plant responses to nutritional stress. *Physiologia Plantarum*, **100**, 613-619.
- Lynch J.P. & Brown K.M. (2001) Topsoil foraging - an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil*, **237**, 225-237.
- Ma Z., Bielenberg D.G., Brown K.M. & Lynch J.P. (2001) Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment*, **24**, 459-467.
- Maldonado-Mendoza I.E., Dewbre G.R. & Harrison M.J. (2001) A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**, 1140-1148.
- Malusa E. & Tosi L. (2005) Phosphorous acid residues in apples after foliar fertilization: Results of field trials. *Food Additives and Contaminants*, **22**, 541-548.
- Marschner H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London.
- Martin A.C., del Pozo J.C., Iglesias J., Rubio V., Solano R., de la Pena A., Leyva A. & Paz-Ares J. (2000) Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **24**, 559-567.
- Martin H., Grant B.R. & Stehmann C. (1998) Inhibition of inorganic pyrophosphatase by phosphonate - A site of action in *Phytophthora* spp.? *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **61**, 65-77.
- Martinez P. & Persson B.L. (1998) Identification, cloning and characterization of a derepressible  $\text{Na}^+$ -coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, **258**, 628-638.
- Martinoia E., Flügge U.I., Kaiser G., Heber U. & Heldt H.W. (1985) Energy-dependent uptake of malate into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **806**, 311-319.
- Martinoia E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K. & Amrhein N. (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature*, **364**, 247-249.
- Martinoia E., Massonneau A. & Frangne N. (2000) Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant and Cell Physiology*, **41**, 1175-1186.
- Martinoia E., Schramm M.J., Kaiser G., Kaiser W.M. & Heber U. (1986) Transport of anions in isolated barley vacuoles: 1. Permeability to anions and evidence for a  $\text{Cl}^-$  uptake system. *Plant Physiology*, **80**, 895-901.
- Massonneau A., Langlade N., Leon S., Smutny J., Vogt E., Neumann G. & Martinoia E. (2001) Metabolic changes associated with cluster root development in white lupin (*Lupinus albus* L.): relationship between organic acid excretion, sucrose metabolism and energy status. *Planta*, **213**, 534-542.
- Massonneau A., Martinoia E., Dietz K.J. & Mimura T. (2000) Phosphate uptake across the tonoplast of intact vacuoles isolated from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Planta*, **211**, 390-395.
- McDonald A.E., Grant B.R. & Plaxton W.C. (2001a) Phosphite (phosphorous acid): Its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *Journal of Plant Nutrition*, **24**, 1505-1519.
- McDonald A.E., Niere J.O. & Plaxton W.C. (2001b) Phosphite disrupts the acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to phosphate starvation. *Canadian Journal of Microbiology*, **47**, 969-978.

- Mettler I.J. & Leonard R.T. (1979) Ion transport in isolated protoplasts from tobacco suspension cells: 2. Selectivity and kinetics. *Plant Physiology*, **63**, 191-194.
- Millar A.H., Wiskich J.T., Whelan J. & Day D.A. (1993) Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *Febs Letters*, **329**, 259-262.
- Miller S.S., Liu J.Q., Allan D.L., Menzhuber C.J., Fedorova M. & Vance C.P. (2001) Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin. *Plant Physiology*, **127**, 594-606.
- Mimura T. (1995) Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant and Cell Physiology*, **36**, 1-7.
- Mimura T. (1999) Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, **191**, 149-200.
- Mimura T., Dietz K.J., Kaiser W., Schramm M.J., Kaiser G. & Heber U. (1990) Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. *Planta*, **180**, 139-146.
- Mimura T., Reid R.J. & Smith F.A. (1998) Control of phosphate transport across the plasma membrane of *Chara corallina*. *Journal of Experimental Botany*, **49**, 13-19.
- Mimura T., Sakano K. & Shimmen T. (1996) Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. *Plant Cell and Environment*, **19**, 311-320.
- Mimura T., Yin Z.H., Wirth E. & Dietz K.J. (1992) Phosphate transport and apoplastic phosphate homeostasis in barley leaves. *Plant and Cell Physiology*, **33**, 563-568.
- Misson J., Raghothama K.G., Jain A., Jouhet J., Block M.A., Bligny R., Ortet P., Creff A., Somerville S., Rolland N., Doumas P., Nacry P., Herrerra-Estrella L., Nussaume L. & Thibaud M.C. (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 11934-11939.
- Mitsukawa N., Okumura S., Shirano Y., Sato S., Kato T., Harashima S. & Shibata D. (1997) Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 7098-7102.
- Miura K., Rus A., Sharkhuu A., Yokoi S., Karthikeyan A.S., Raghothama K.G., Baek D., Koo Y.D., Jin J.B., Bressan R.A., Yun D.J. & Hasegawa P.M. (2005) The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 7760-7765.
- Moraes T.F. & Plaxton W.C. (2000) Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brassica napus* (rapeseed) suspension cell cultures - Implications for phosphoenolpyruvate carboxylase regulation during phosphate starvation, and the integration of glycolysis with nitrogen assimilation. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 4465-4476.
- Morgan J.A.W., Bending G.D. & White P.J. (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 1729-1739.
- Muchhal U.S., Pardo J.M. & Raghothama K.G. (1996) Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 10519-10523.
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-&.
- Murley V.R., Theodorou M.E. & Plaxton W.C. (1998) Phosphate starvation-inducible pyrophosphate-dependent phosphofructokinase occurs in plants whose roots do not

- form symbiotic associations with mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*, **103**, 405-414.
- Nagano M., Hachiya A. & Ashihara H. (1994) Phosphate starvation and a glycolytic bypass catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase in suspension cultured *Catharanthus Roseus* cells. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, **49**, 742-750.
- Nagata T., Nemoto Y. & Hasezawa S. (1992) Tobacco BY-2 Cell-Line as the HeLa-Cell in the Cell Biology of Higher-Plants. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology*, **132**, 1-30.
- Nagy R., Karandashov V., Chague W., Kalinkevich K., Tamasloukht M., Xu G.H., Jakobsen I., Levy A.A., Amrhein N. & Bucher M. (2005) The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant Journal*, **42**, 236-250.
- Nakamori K., Takabatake R., Umehara Y., Kouchi H., Izui K. & Hata S. (2002) Cloning, functional expression, and mutational analysis of a cDNA for *Lotus japonicus* mitochondrial phosphate transporter. *Plant and Cell Physiology*, **43**, 1250-1253.
- Nakamura Y., Awai K., Masuda T., Yoshioka Y., Takamiya K. & Ohta H. (2005) A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 7469-7476.
- Nandi S.K., Pant R.C. & Nissen P. (1987) Multiphasic uptake of phosphate by corn roots. *Plant Cell and Environment*, **10**, 463-474.
- Neumann G. & Martinoia E. (2002) Cluster roots - an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends in Plant Science*, **7**, 162-167.
- Neumann G., Massonneau A., Martinoia E. & Romheld V. (1999a) Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta*, **208**, 373-382.
- Neumann G. & Romheld V. (1999b) Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil*, **211**, 121-130.
- Niere J.O., Deangelis G. & Grant B.R. (1994) The effect of phosphonate on the acid soluble phosphorus components in the genus *Phytophthora*. *Microbiology*, **140**, 1661-1670.
- Niere J.O., Griffith J.M. & Grant B.R. (1990) <sup>31</sup>P NMR-studies on the effect of phosphite on *Phytophthora palmivora*. *Journal of General Microbiology*, **136**, 147-156.
- Nürnberg T., Abel S., Jost W. & Glund K. (1990) Induction of an extracellular ribonuclease in cultured tomato cells upon phosphate starvation. *Plant Physiology*, **92**, 970-976.
- Ohnishi M., Mimura T., Tsujimura T., Mitsunashi N., Washitani-Nemoto S., Maeshima M. & Martinoia E. (2007) Inorganic phosphate uptake in intact vacuoles isolated from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don under varying Pi status. *Planta*, **225**, 711-718.
- Ohtake H., Wu H., Imazu K., Anbe Y., Kato J. & Kuroda A. (1996) Bacterial phosphonate degradation, phosphite oxidation and polyphosphate accumulation. *Resources Conservation and Recycling*, **18**, 125-134.
- Palma D.A., Blumwald E. & Plaxton W.C. (2000) Upregulation of vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase by phosphate starvation of *Brassica napus* (rapeseed) suspension cell cultures. *Febs Letters*, **486**, 155-158.
- Pao S.S., Paulsen I.T. & Saier M.H. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 1-+.
- Parsons H.L., Yip J.Y.H. & Vanlerberge G.C. (1999) Increased respiratory restriction during phosphate-limited growth in transgenic tobacco cells lacking alternative oxidase. *Plant Physiology*, **121**, 1309-1320.

- Paul M.J. & Stitt M. (1993) Effects of nitrogen and phosphorus deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. *Plant Cell and Environment*, **16**, 1047-1057.
- Pineros M.A. & Kochian L.V. (2001) A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al<sup>3+</sup>-induced anion channels. *Plant Physiology*, **125**, 292-305.
- Plaxton W.C. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**, 185-214.
- Plaxton W.C. & Carswell C. (1999) Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plants. In: *Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization*. (ed H.R. Lerner). Marcel Dekker, Inc., New York.
- Plaxton W.C. & Podesta F.E. (2006) The functional organization and control of plant respiration. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **25**, 159-198.
- Poirier Y., Thoma S., Somerville C. & Schiefelbein J. (1991) A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiology*, **97**, 1087-1093.
- Pradet A. & Raymond P. (1983) Adenine nucleotide ratios and adenylate energy charge in energy metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **34**, 199-224.
- Rae A.L., Cybinski D.H., Jarmey J.M. & Smith F.W. (2003) Characterization of two phosphate transporters from barley; evidence for diverse function and kinetic properties among members of the Pht1 family. *Plant Molecular Biology*, **53**, 27-36.
- Raghothama K.G. (1999) Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 665-693.
- Raghothama K.G. & Karthikeyan A.S. (2005) Phosphate acquisition. *Plant and Soil*, **274**, 37-49.
- Rasmusson A.G. & Moller I.M. (1991) Nad(P)H dehydrogenases on the inner surface of the inner mitochondrial membrane studied using inside-out submitochondrial particles. *Physiologia Plantarum*, **83**, 357-365.
- Ratcliffe R.G. (1994) *In vivo* NMR studies of higher plants and algae. In: *Advances in Botanical Research, Vol 20*, pp. 43-123.
- Ratcliffe R.G. & Roscher A. (1998) Prospects for *in vivo* NMR methods in xenobiotic research in plants. *Biodegradation*, **9**, 411-422.
- Ratcliffe R.G., Roscher A. & Shachar-Hill Y. (2001a) Plant NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **39**, 267-300.
- Ratcliffe R.G. & Shachar-Hill Y. (2001b) Probing plant metabolism with NMR. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**, 499-526.
- Rausch C. & Bucher M. (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, **216**, 23-37.
- Rebeille F., Bligny R. & Douce R. (1982) Regulation of Pi Uptake by *Acer Pseudoplatanus* Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **219**, 371-378.
- Reid R.J., Mimura T., Ohsumi Y., Walker N.A. & Smith F.A. (2000) Phosphate uptake in *Chara*: membrane transport via Na/Pi cotransport. *Plant Cell and Environment*, **23**, 223-228.
- Relyea H.A. & van der Donk W.A. (2005) Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase. *Bioorganic Chemistry*, **33**, 171-189.
- Rentsch D. & Martinoia E. (1991) Citrate transport into barley mesophyll vacuoles - comparison with malate-uptake activity. *Planta*, **184**, 532-537.
- Rickard D.A. (2000) Review of phosphorus acid and its salts as fertilizer materials. *Journal of Plant Nutrition*, **23**, 161-180.
- Riviere-Rolland H., Contard P. & Betsche T. (1996) Adaptation of pea to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>: Rubisco, phosphoenolpyruvate carboxylase and chloroplast

- phosphate translocator at different levels of nitrogen and phosphorus nutrition. *Plant Cell and Environment*, **19**, 109-117.
- Roberts J.K.M. & Jardetzky O. (1981) Monitoring of cellular metabolism by NMR. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **639**, 53-76.
- Roby C., Martin J.B., Bligny R. & Douce R. (1987a) Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells: <sup>31</sup>P Nuclear Magnetic Resonance studies. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 5000-5007.
- Roby C., Martin J.B., Bligny R. & Douce R. (1987b) Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells: Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Studies. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 5000-5007.
- Roelofs R.F.R., Rengel Z., Cawthray G.R., Dixon K.W. & Lambers H. (2001) Exudation of carboxylates in Australian Proteaceae: chemical composition. *Plant Cell and Environment*, **24**, 891-903.
- Rubio V., Linhares F., Solano R., Martin A.C., Iglesias J., Leyva A. & Paz-Ares J. (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & Development*, **15**, 2122-2133.
- Ruiz-Pavon L., Mirsha A., Lundh F., Thuswaldner S. & Persson B. (2007) *Arabidopsis* ANTR1 is a thylakoid Na<sup>+</sup>-dependent phosphate transporter: Functional characterization in *Escherichia coli*. *Photosynthesis Research*, **91**, 214-214.
- Ryan P.R., Delhaize E. & Jones D.L. (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**, 527-560.
- Rychter A.M., Chauveau M., Bomsel J.L. & Lance C. (1992) The effect of phosphate deficiency on mitochondrial activity and adenylate levels in bean roots. *Physiologia Plantarum*, **84**, 80-86.
- Rychter A.M. & Mikulska M. (1990) The relationship between phosphate status and cyanide-resistant respiration in bean roots. *Physiologia Plantarum*, **79**, 663-667.
- Rychter A.M. & Randall D.D. (1994) The effect of phosphate deficiency on carbohydrate metabolism in bean roots. *Physiologia Plantarum*, **91**, 383-388.
- Sakano K. (1990) Proton/Phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Physiology*, **93**, 479-483.
- Sakano K., Yazaki Y. & Mimura T. (1992) Cytoplasmic acidification induced by inorganic phosphate uptake in suspension cultured *Catharanthus roseus* cells: Measurement with fluorescent pH indicator and <sup>31</sup>P-Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiology*, **99**, 672-680.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. (2<sup>nd</sup> ed.). Gold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schachtman D.P., Reid R.J. & Ayling S.M. (1998) Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiology*, **116**, 447-453.
- Schachtman D.P. & Shin R. (2007) Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annual Review of Plant Biology*, **58**, 47-69.
- Schink B. & Friedrich M. (2000) Bacterial metabolism: Phosphite oxidation by sulphate reduction. *Nature*, **406**, 37-37.
- Schink B., Thiemann V., Laue H. & Friedrich M.W. (2002) *Desulfotignum phosphitoxidans* sp. nov., a new marine sulfate reducer that oxidizes phosphite to phosphate. *Archives of Microbiology*, **177**, 381-391.
- Schopfer P. & Brennicke A. (2005) *Pflanzenphysiologie*. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Schünmann P.H.D., Richardson A.E., Smith F.W. & Delhaize E. (2004a) Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*, **55**, 855-865.

- Schünmann P.H.D., Richardson A.E., Vickers C.E. & Delhaize E. (2004b) Promoter analysis of the barley *Pht1;1* phosphate transporter gene identifies regions controlling root expression and responsiveness to phosphate deprivation. *Plant Physiology*, **136**, 4205-4214.
- Seymour N.P., Thompson J.P. & Fiske M.L. (1994) Phytotoxicity of Fosetyl-Al and phosphonic acid to maize during production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum. *Plant Disease*, **78**, 441-446.
- Shimaoka T., Ohnishi M., Sazuka T., Mitsunashi N., Hara-Nishimura I., Shimazaki K.I., Maeshima M., Yokota A., Tomizawa K.I. & Mimura T. (2004) Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 672-683.
- Shimogawara K. & Usuda H. (1995) Uptake of inorganic phosphate by suspension cultured tobacco cells: Kinetics and regulation by Pi starvation. *Plant and Cell Physiology*, **36**, 341-351.
- Shin H., Shin H.S., Dewbre G.R. & Harrison M.J. (2004) Phosphate transport in *Arabidopsis*: *Pht1;1* and *Pht1;4* play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant Journal*, **39**, 629-642.
- Sivak M.N. & Walker D.A. (1986) Photosynthesis in vivo can be limited by phosphate supply. *New Phytologist*, **102**, 499-512.
- Smith F.W. (2001) Sulphur and phosphorus transport systems in plants. *Plant and Soil*, **232**, 109-118.
- Smith F.W. (2002) The phosphate uptake mechanism. *Plant and Soil*, **245**, 105-114.
- Stehmann C. & Grant B.R. (2000) Inhibition of enzymes of the glycolytic pathway and hexose monophosphate bypass by phosphonate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **67**, 13-24.
- Stenzel I., Ziethe K., Schurath J., Hertel S.C., Bosse D. & Köck M. (2003) Differential expression of the LePS2 phosphatase gene family in response to phosphate availability, pathogen infection and during development. *Physiologia Plantarum*, **118**, 138-146.
- Stitt M. (1989) Product Inhibition of potato tuber pyrophosphate-fructose-6-phosphate phosphotransferase by phosphate and pyrophosphate. *Plant Physiology*, **89**, 628-633.
- Stitt M. (1990) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **41**, 153-185.
- Ström L. (1997) Root exudation of organic acids: importance to nutrient availability and the calcifuge and calcicole behaviour of plants. *Oikos*, **80**, 459-466.
- Sukarno N., Smith F.A., Scott E.S., Jones G.P. & Smith S.E. (1998) The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis III. The influence of VA mycorrhiza on phytotoxic effects following-application of fosetyl-Al and phosphonate. *New Phytologist*, **139**, 321-330.
- Svistoonoff S., Creff A., Reymond M., Sigoillot-Claude C., Ricaud L., Blanchet A., Nussaume L. & Desnos T. (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics*, **39**, 792-796.
- Szczyпка M.S., Wemmie J.A., Moyerowley W.S. & Thiele D.J. (1994) A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 22853-22857.
- Tadano T. & Sakai H. (1991) Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, **37**, 129-140.

- Takabatake R., Hata S., Taniguchi M., Kouchi H., Sugiyama T. & Izui K. (1999) Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial phosphate transporters in soybean, maize, rice and *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, **40**, 479-486.
- Tanimoto M., Roberts K. & Dolan L. (1995) Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **8**, 943-948.
- Tena G., Asai T., Chiu W.L. & Sheen J. (2001) Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 392-400.
- Tewes A., Glund K., Walther R. & Reinbothe H. (1984) High-yield isolation and rapid recovery of protoplasts from suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie*, **113**, 141-150.
- Theodorou M.E., Cornel F.A., Duff S.M.G. & Plaxton W.C. (1992) Phosphate starvation-inducible synthesis of the  $\alpha$ -subunit of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in black mustard suspension cells. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 21901-21905.
- Theodorou M.E., Elrifi I.R., Turpin D.H. & Plaxton W.C. (1991) Effects of phosphorus limitation on respiratory metabolism in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology*, **95**, 1089-1095.
- Theodorou M.E. & Plaxton W.C. (1993) Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology*, **101**, 339-344.
- Theodorou M.E. & Plaxton W.C. (1994) Induction of PPI-dependent phosphofructokinase by phosphate starvation in seedlings of *Brassica Nigra*. *Plant Cell and Environment*, **17**, 287-294.
- Theodorou M.E. & Plaxton W.C. (1995) *Adaptations of plant respiratory metabolism to nutritional phosphate deprivation*. Oxford: Bios Scientific Publishers, London.
- Ticconi C.A. & Abel S. (2004) Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trends in Plant Science*, **9**, 548-555.
- Ticconi C.A., Delatorre C.A. & Abel S. (2001) Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **127**, 963-972.
- Tolbert N.E. (1974) *Methods in enzymology* (vol. 31). Academic Press, New York.
- Tomscha J.L., Trull M.C., Deikman J., Lynch J.P. & Guiltinan M.J. (2004) Phosphatase under-producer mutants have altered phosphorus relations. *Plant Physiology*, **135**, 334-345.
- Uhde-Stone C., Zinn K.E., Ramirez-Yanez M., Li A.G., Vance C.P. & Allan D.L. (2003) Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Physiology*, **131**, 1064-1079.
- Ullrich-Eberius C.I., Novacky A., Fischer E. & Lüttge U. (1981) Relationship between energy-dependent phosphate uptake and the electrical membrane potential in *Lemna gibba* G1. *Plant Physiology*, **67**, 797-801.
- Ullrich-Eberius C.I., Novacky A. & Vanbel A.J.E. (1984) Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: Energetics and Kinetics. *Planta*, **161**, 46-52.
- Ullrich C.I. & Novacky A.J. (1990) Extracellular and intracellular pH and membrane potential changes induced by  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $H_2PO_4^-$ , and  $NO_3^-$  uptake and fusicoccin in root hairs of *Limnobium stoloniferum*. *Plant Physiology*, **94**, 1561-1567.
- Vance C.P., Uhde-Stone C. & Allan D.L. (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, **157**, 423-447.
- Varadarajan D.K., Karthikeyan A.S., Matilda P.D. & Raghothama K.G. (2002) Phosphite, an analog of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation. *Plant Physiology*, **129**, 1232-1240.

- Versaw W.K. & Harrison M.J. (2002) A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell*, **14**, 1751-1766.
- Vogel H.J., Lundberg P. & Bagh K. (1999) Noninvasive NMR studies of metabolism in cultured *Catharanthus roseus* cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **35**, 144-151.
- Wang Y., Ribot C., Rezzonico E. & Poirier Y. (2004) Structure and expression profile of the Arabidopsis *PHO1* gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis. *Plant Physiology*, **135**, 400-411.
- Wasaki J., Ando M., Ozawa K., Omura M., Osaki M., Ito H., Matsui H. & Tadano T. (1997) Properties of secretory acid phosphatase from lupin roots under phosphorus-deficient conditions (Reprinted from Plant nutrition for sustainable food production and environment, 1997). *Soil Science and Plant Nutrition*, **43**, 981-986.
- Watt M. & Evans J.R. (1999) Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiology*, **121**, 317-323.
- Weber A.P.M., Schwacke R. & Flügge U.I. (2005) Solute transporters of the plastid envelope membrane. *Annual Review of Plant Biology*, **56**, 133-164.
- Weiner H., Stitt M. & Heldt H.W. (1987) Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **893**, 13-21.
- White A.K. & Metcalf W.W. (2004) The *htx* and *ptx* operons of *Pseudomonas stutzeri* WM88 are new members of the Pho regulon. *Journal of Bacteriology*, **186**, 5876-5882.
- Williamson L.C., Ribrioux S., Fitter A.H. & Leyser H.M.O. (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**, 875-882.
- Yang K.C. & Metcalf W.W. (2004) A new activity for an old enzyme: *Escherichia coli* bacterial alkaline phosphatase is a phosphite-dependent hydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 7919-7924.



## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Mechanismen zur Pi-Mobilisierung aus der Rhizosphäre (modifiziert nach Neumann <i>et al.</i> (2002) und Abel <i>et al.</i> (2000)). Durch Ausscheidung von $H^+$ , $OA^-$ und wurzelsekretorische Phosphohydrolasen (vgl. Kapitel 1.4.2) wird Pi aus anorganischen und organischen Komplexen im Boden freigesetzt. ....	8
Abbildung 1-2: Mechanismus des Pi-Transportes durch die Plasmamembran (modifiziert nach Bucher, 2007). Eine $H^+$ -ATPase scheidet $H^+$ unter Verbrauch von ATP (primär-aktiver Transport) aus. Dies führt zur Ausbildung eines Membranpotenzials. Die Pi-Aufnahme findet über einen $H^+$ /Pi-Symport statt, der durch den elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) getrieben wird (sekundär-aktiver Transport).....	13
Abbildung 1-3: Schematische Zusammenfassung von Stoffwechselfprozessen, die unter Pi-Mangel modifiziert werden (in der Abbildung gestrichelt - - -). Die Abbildung ist nach Plaxton <i>et al.</i> (1999) verändert. Die Bypass-Reaktionen der im Cytosol ablaufenden Glykolyse sind nicht ATP- und Pi-abhängig und erleichtern somit den glykolytischen Stofffluss unter Pi-Mangel. Die $H^+$ -PPiase kann die Energie der Anhydridverbindung von PPi verwerten, um Protonen durch den Tonoplast in die Vakuole zu transportieren. Die Synthese von Sekundärstoffen (Anthocyane, Flavonoide) über den Shikimatweg liefert in vielen Reaktionsschritten Pi (vgl. Kapitel 1.6.4). PPi: Pyrophosphat; PEP: Phosphoenolpyruvat; DHAP: Dihydroxyacetonphosphat; EPSP: Enoether-5'-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat; TCA-Zyklus: Trikarbonsäurezyklus; DAHP-Synthase: 3-Deoxy-D-Arabinoseheptulosonat-7-Phosphat; Pi-Phosphat. ....	18
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Komplexe der Atmungskette in der mitochondrialen Innenmembran. Beim Cytochrom-Weg wird durch den Elektronentransport ein Protonengradient erzeugt. Pflanzliche Mitochondrien besitzen zusätzlich eine alternative NADH-Dehydrogenase und eine alternative Oxidase. Die Reduktion/Oxidation von Ubichinon findet ohne die Bildung von Protonengradienten statt. Auf diese Weise kann bei einer suboptimalen Pi-Versorgung die ATP-Bildung gedrosselt werden. UQH2: Ubihydrochinon.....	20
Abbildung 1-5: Struktur von Pi und Phi aus McDonald <i>et al.</i> (2001a). ....	21
Abbildung 2-1: Anzuchtssystem für Keimlinge von <i>Arabidopsis thaliana</i> . Die desinfizierten Samen wurden auf Siebgewebe auf Agar-haltigem Nährmedium ausgesät. ....	31
Abbildung 2-2: Kalibriergerade zur Pi-Bestimmung nach der Malachitgrün-Methode. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 5 bis 40 $\mu M$ $KH_2PO_4$ gemessen. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei Messungen gezeigt. Die Regressionsgerade ist dem Median angepasst. ....	32
Abbildung 2-3: Kalibriergerade zur Pi-Bestimmung nach der Ammoniumvanadat/Molybdat-Methode. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 0.05 bis 3.5 mM $KH_2PO_4$ gemessen. Die Regressionsgerade ist dem Mittelwert einer Doppelbestimmung angepasst. ....	33
Abbildung 2-4: Darstellung der Interphase und der einzelnen Teilungsphasen der Mitose. ....	38
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des Perfusionssystems für <i>in vivo</i> $^{31}P$ -NMR Messungen. Der Umlauf des Mediums ermöglichte eine gleichmäßige Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der gepackten Zellen. Gleichzeitig erlaubten die große Zellmasse und die hohe Zelldichte eine gute Identifikation der detektierbaren Metaboliten.....	47
Abbildung 2-6: Diskontinuierlicher Dichtegradient zur Protoplastenreinigung.....	50
Abbildung 2-7: Isolierung und Reinigung von Vakuolen aus Tomatenzellkultur. a: Diskontinuierlicher Dichtegradient zur Vakuolenisolierung. b: Vakuolensuspension nach der Flotation in Dichtegradienten. ....	50
Abbildung 2-8: Dichtegradienten zu Transportstudien mit intakten Vakuolen. Das Transportexperiment wurde durch Zentrifugation des Reaktionsgefäßes beendet. Die Zentrifugation fand in einer Beckman-Zentrifuge mit horizontalem Rotor statt. ....	51
Abbildung 3-1: In der Abwesenheit von Pi bewirkte Phi eine deutliche Reduzierung des Zellwachstums. Tomatenzellen wurden in +Pi-, -Pi-, +Pi/+Phi- und -Pi/+Phi-Kulturmedien kultiviert. Die Ausgangsdichte ( $OD_{600}$ ) der Zellsuspension entsprach 0.35 für alle Kultivierungsbedingungen. In der Gegenwart von Pi wurde das Zellwachstum erst nach 48 h gehemmt. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen ( $n=3$ ) in einem repräsentativen Experiment gezeigt. ....	54
Abbildung 3-2: Phi bewirkt eine Reduzierung des Frischgewichtes von Tomatenpflanzen sowohl bei ausreichender als auch bei defizienter Pi-Versorgung. Tomatenpflanzen wurden als Hydrokultur in Medien mit und ohne Pi und mit den angegebenen Phi-Konzentrationen kultiviert. Nach 7 Tagen Wachstum wurde das Frischgewicht bestimmt. Es sind Median, Maximum und Minimum von zehn parallelen Messungen ( $n=10$ ) in einem repräsentativen Experiment dargestellt. Zur statistischen Bewertung durch t-Test wurden alle Versuche mit Phi ( $\pm$ Pi) jeweils mit der Kontrollbedingung ohne Phi verglichen. Außerdem wurden die Phi-freien Experimente mit und ohne Pi verglichen. Alle Unterschiede unter Pi-freien Bedingungen sind signifikant mit	

p<0.001. Bei den vollernährten Pflanzen bewirkt Phi eine signifikante Wachstumsreduzierung erst ab 1.0 mM (p<0.05). .....	55
Abbildung 3-3: Phi hemmt das Wachstum der Hauptwurzel in Tomatenpflanzen. Die Hauptwurzellänge wurde an hydroponisch kultivierten Tomatenpflanzen nach 7 Tagen Wachstum bei ausreichender und limitierter Pi-Versorgung und bei den angegebenen Phi-Konzentrationen gemessen. Es sind Median, Maximum und Minimum von vierzig parallelen Messungen (n=40) in einem repräsentativen Experiment dargestellt. Zur statistischen Bewertung durch t-Test wurden alle Versuche mit Phi ( $\pm$ Pi) jeweils mit der Kontrollbedingung ohne Phi verglichen. Außerdem wurden die Phi-freien Experimente mit und ohne Pi verglichen. Alle Unterschiede sind signifikant mit p<0.001.....	56
Abbildung 3-4: Phi führte zu einer starken Reduktion des Wurzel/Spross-Verhältnisses in Tomatenpflanzen. Das Wurzel/Spross-Verhältnis wurde nach 7 Tagen Wachstum unter ausreichender und limitierter Pi-Versorgung und unter den angegebenen Phi-Konzentrationen analysiert. Es sind Median, Maximum und Minimum von zehn parallelen Messungen (n=10) in einem repräsentativen Experiment dargestellt. Zur statistischen Bewertung durch t-Test wurden alle Versuche mit Phi ( $\pm$ Pi) jeweils mit der Kontrollbedingung ohne Phi verglichen. Außerdem wurden die Phi-freien Experimente mit und ohne Pi verglichen. Alle Unterschiede unter Pi-freien Bedingungen sind signifikant mit p<0.001. Bei den vollernährten Pflanzen bewirkt Phi eine signifikante Wachstumsreduzierung erst ab 1.0 mM (p<0.05).....	57
Abbildung 3-5: Die Anthocyanakkumulation wurde in Pi-verarmten Tomatenpflanzen durch Phi nicht beeinflusst. Die Tomatenpflanzen wurden für eine Woche als Hydrokultur auf Medium mit und ohne Pi kultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen für eine weitere Woche auf Medium mit und ohne Pi mit den angegebenen Phi-Konzentrationen kultiviert. Der Anthocyangehalt wurde wie unter Kapitel 2.5.2.2 beschrieben analysiert. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen (n=3) in einem repräsentativen Experiment gezeigt.....	58
Abbildung 3-6: Auswirkung verschiedener Phi-Konzentrationen auf den Chlorophyll- und Carotinoidgehalt in Tomatenblättern. Die Tomatenpflanzen wurden für eine Woche als Hydrokultur auf Medium mit bzw. ohne Pi kultiviert. Danach wurden die Pflanzen für eine weitere Woche in Medium mit Phi umgesetzt. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen (n=3) in einem repräsentativen Experiment gezeigt. a: Bestimmung des Gehaltes an Chlorophyll a; b: Bestimmung des Gehaltes an Chlorophyll b; c: Bestimmung des Chlorophyll a/b-Verhältnisses; d: Bestimmung des Gehaltes an Carotinoiden. ....	59
Abbildung 3-7: Phi hat keine Auswirkung auf die PSII-Effizienz ( $F_v/F_m$ ) in Tomaten. Die Tomatenpflanzen wurden als Hydrokultur für 7 Tage unter +Pi- und -Pi-Bedingungen und unter der Applikation der angegebenen Phi-Konzentrationen behandelt. Es sind Median, Maximum und Minimum von fünf parallelen Messungen (n=5) in einem repräsentativen Experiment gezeigt. a: Pflanzen gewachsen auf +Pi-Medium; b: Pflanzen gewachsen auf -Pi-Medium. ....	60
Abbildung 3-8: Phi hemmt die Zellteilungsrate und führt zu einer starken Verringerung des prozentualen Anteils an vitalen Zellen in Pi-freiem Medium. Tomatenzellen wurden mit +Pi-, -Pi-, +Pi/+Phi- und -Pi/+Phi-Medien behandelt. Pi-Verbrauch, Mitose-Index, intrazelluläres, freies Pi und Vitalität der Zellen wurden zu den angegebenen Inkubationszeiten bestimmt. a: Verbrauch an extrazellulärem Pi; b: Bestimmung des Mitose-Index mittels DAPI-Färbung der Zellkerne; c: Konzentration des intrazellulären, freien Pi; d: Vitalitätstest. In den Abbildungen a und c sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Phosphatbestimmungen (n=3) in einem repräsentativen Experiment dargestellt. In den Abbildungen b und c sind Mitose-Index bzw. Vitalität als prozentualer Anteil aus jeweils 1000 ausgewerteten Zellen in einem repräsentativen Experiment dargestellt.....	62
Abbildung 3-9: Phi führt zu einem stark herabgesetzten Mitose-Index in Tomatenzellen, die aus der exponentiellen Wachstumsphase der Vorkultur entnommen und in Medien mit +Pi, +Pi/+Phi, -Pi- bzw. -Pi/+Phi überführt wurden. Jeder Messwert stellt den prozentualen Anteil der mitotischen Zellen in insgesamt 1000 ausgewerteten Zellen dar.....	63
Abbildung 3-10: Phi unterdrückte die Transkription aller analysierten <i>PSR</i> -Gene ( <i>RNaseLE</i> , <i>RNaseLX</i> , <i>LePS2</i> und <i>LePT2</i> ) trotz Pi-Mangel (vierte Spalte). Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Transkriptakkumulation der <i>PSR</i> -Gene in Tomatenzellkulturen in Abhängigkeit der extrazellulären Pi- bzw. Phi-Versorgung. In Abwesenheit von Pi und Phi wurde die Transkription der <i>PSR</i> -Gene aktiviert (dritte Spalte). Die Transkriptionsanalyse wurde durch Northern-Blot durchgeführt. Phi bzw. Pi wurden in einer Konzentration von 2.5 mM zugesetzt. <i>EF1<math>\alpha</math></i> diente als konstitutiv exprimierte interne Kontrolle. ....	64
Abbildung 3-11: Die Genexpression der <i>PSR</i> -Gene ( <i>RNaseLE</i> , <i>RNaseLX</i> , <i>LePS2</i> und <i>LePT2</i> ) wurde konzentrationsabhängig durch Phi unterdrückt. Auf dem Bild ist die Transkription der <i>PSR</i> -Gene bei Anwesenheit von Pi (+Pi), unter Pi-Mangel (-Pi) und unter Pi-Mangel mit 1, 2.5 und 5 mM Phi (-Pi/+Phi) 12 h nach Mediumwechsel gezeigt. <i>EF1<math>\alpha</math></i> diente als konstitutiv exprimierte interne Kontrolle. ....	65
Abbildung 3-12: Die Zugabe von Phi unterdrückt die Transkription der analysierten <i>PSR</i> -Gene ( <i>RNaseLE</i> , <i>RNaseLX</i> , <i>LePS2</i> und <i>LePT2</i> ) in Tomatenpflanzen trotz Pi-Mangel. Der Effekt war konzentrationsabhängig. Tomatenpflanzen wurden als Hydrokultur in Medien mit Pi und ohne Pi und mit den angegebenen Phi-Konzentrationen kultiviert. Die Transkription der <i>PSR</i> -Gene wurde unter Pi-freien und Pi-gesättigten Bedingungen nach 7 Tagen Wachstum in Blättern, Hypocotylen und Wurzeln durch Northern-Blot untersucht. <i>EF1<math>\alpha</math></i> diente als konstitutiv exprimierte interne Kontrolle. ....	66

- Abbildung 3-13: Phi führte zur Repression der *RNaseLX*-Promotoraktivität. Die Abbildung zeigt die histochemische Analyse von der transgenen Linie 10 mit dem *RNaseLX*-Promotor-GUS-Konstrukt *PromLX::uidA*. Die transgenen Tomatenpflanzen wurden als Hydrokultur angezogen und nach 10 Tagen Wachstum auf +Pi-Medium (1A, 1B, 1C), +Pi/+Phi-Medium (2A, 2B, 2C), -Pi-Medium (3A, 3B, 3C) und -Pi/+Phi-Medium (4A, 4B, 4C) analysiert. Durch eine X-Gluc-Färbung der Pflanzen konnte die Aktivität des *RNaseLX*-Promotors hauptsächlich in Wurzeln und weniger stark in Hypocotyl unter Pi-Mangel nachgewiesen werden..... 67
- Abbildung 3-14: Phi unterdrückt die Aktivität des *RNaseLX*-Promotors bei Pi-Mangel. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der fluorometrischen GUS-Analyse von der transgenen Linie 10 mit dem *RNaseLX*-Promotor-GUS-Konstrukt *PromLX::uidA*. Bei Pi-freien Bedingungen war die GUS-Aktivität in Wurzeln und Hypocotylen erhöht. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei Messungen (n=3) gezeigt..... 67
- Abbildung 3-15: Phi beeinflusste die wundinduzierte Genexpression von *RNaseLE* und *PIN2* nicht. Logarithmische Darstellung des Expressionslevels von *RNaseLE*, *PIN2* und *RNaseLX* in isolierten Blättern von 4 Wochen alten Tomatenpflanzen nach Verwundung, bestimmt durch qRT-PCR. mRNA wurde aus Proben von unverwundeten und verwundeten Blättern isoliert. Das Expressionslevel der Gene wurde nach dem  $\Delta\Delta C_t$ -Berechnungsmodell auf das Expressionslevel in unverwundeten Blättern bezogen. Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde *Ubi* als Referenzgen benutzt..... 68
- Abbildung 3-16: Phi konnte die durch den Zellwandabbau induzierte *RNaseLE*-Genexpression nicht reprimieren (24 h Inkubation). Die Genexpression von *RNaseLX* wurde ebenfalls induziert, aber nicht durch Phi reprimiert. Tomatenzellen wurden unter Kontrollbedingungen (+Pi), mit Cellulase-Lösung (+Pi/+Cellulase) und in der gleichzeitigen Anwesenheit von Cellulase und Phi inkubiert (+Pi/+Cellulase/+Phi). mRNA wurde aus Proben vom Zeitpunkt t=0 h (Kontrolle) und aus 24 h inkubierten Proben isoliert. Das Expressionslevel der Gene wurde nach dem  $\Delta\Delta C_t$ -Berechnungsmodell auf das Expressionslevel in der 0 h-Kontrolle bezogen. Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde *Ubi* als Referenzgen benutzt..... 69
- Abbildung 3-17: Zeitabhängigkeit der Pi-Aufnahme in Pi-verarmten Tomatenzellen. Wie in allen weiteren Experimenten, wurden die Aufnahmestudien bei pH 6.0 durchgeführt. Zu den Zellen wurde stets 37 KBq (7.5 nM) radioaktiv markiertes Phosphat ( $[^{32}\text{P}] \text{H}_3\text{PO}_4$ ) zugegeben. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen in einem repräsentativen Experiment gezeigt..... 71
- Abbildung 3-18: -Pi- und +Pi-Zellen zeigten unterschiedliche Pi-Aufnahmekinetiken. Die konzentrationsabhängige Pi-Aufnahme ist in (a) -Pi- und (b) +Pi-Tomatenzellen dargestellt. Die Pi-Aufnahme in -Pi-Zellen folgte einer typischen Michaelis-Menten-Kinetik. Im Gegensatz dazu war der Pi-Transport in +Pi-Zellen sehr gering. Eine sichtbare Sättigung des Transportsystems wurde im untersuchten Konzentrationsbereich nicht erreicht. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen (n=3) in einem repräsentativen Experiment gezeigt..... 72
- Abbildung 3-19: Die -Pi/+Phi-Zellen zeigten nach 24 h Inkubation mit 2.5 mM Phi ein deutlich reduziertes  $V_{max}$ . Die Phi-Behandlung veränderte den  $K_m$ -Wert nicht. a: Pi-Aufnahme in -Pi-, +Pi-, +Pi/+Phi- und -Pi/+Phi-Tomatenzellen in Abhängigkeit von der extrazellulären Pi-Konzentration. b: Auftragung der Daten nach Eadie-Hofstee aus -Pi- und -Pi/+Phi-Zellen. c: Zusammenfassung der kinetischen Parameter. Die Tabelle erfasst die Daten  $\pm$  SE, die aus der Eadie-Hofstee-Auftragung ermittelt wurden. In den Abbildungen a und b sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen (n=3) in einem repräsentativen Experiment gezeigt..... 73
- Abbildung 3-20: In Pi-verarmten Tomatenzellen wurden vergleichbare  $K_i$ -Werte von Phi anhand (a) der Dosis-Wirkungsbeziehung ( $K_i=320 \pm 19.6 \mu\text{M}$ ) und (b) des Dixon-Plots ( $K_i=397 \mu\text{M}$ ) berechnet. a: Die Pi-Aufnahme wurde in der Anwesenheit steigender Pi- ( $K_i=3.15 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ), Arsenat- ( $K_i=37.1 \pm 2.8 \mu\text{M}$ ) und Phi-Konzentrationen gehemmt. Die Pi-Aufnahme ohne Inhibitor wurde als 100 % festgelegt. b: Die Pi-Aufnahme wurde bei zwei festgelegten Pi-Konzentrationen (1 und 10  $\mu\text{M}$ ) und bei steigenden Phi-Konzentrationen gemessen. Der Schnittpunkt beider Kurven stellt den  $K_i$ -Wert dar. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei Messungen (n=3) in einem repräsentativen Experiment gezeigt..... 74
- Abbildung 3-21: Phi hemmt die Pi-Aufnahme in -Pi-Tomatenzellen durch einen kompetitiven Hemmmechanismus. Pi-Aufnahme in der Gegenwart von (a) Phi, (b) Arsenat und (c) CCCP. Die verwendeten Konzentrationen der Hemmsubstanzen sind in Klammern in der Tabelle angegeben. Phi und Arsenat veränderten den  $K_m$ -Wert, aber nicht den  $V_{max}$ -Wert. Beide Substanzen wirkten als kompetitive Inhibitoren der Pi-Aufnahme. CCCP diente als Beispiel für eine unkompetitive Hemmung und veränderte, wie erwartet,  $K_m$  und  $V_{max}$ . Die nichtlinearen Regressionskurven passen die Medianwerte an die Michaelis-Menten-Gleichung an. Die Einschübe stellen die lineare Regression der Daten im Eadie-Hofstee-Diagramm dar. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen (n=3) in einem repräsentativen Experiment gezeigt. Die Tabellen erfassen die Daten  $\pm$  SD (n=3), die aus der Eadie-Hofstee-Auftragung ermittelt wurden..... 75
- Abbildung 3-22: Pi-Aufnahme in -Pi-Tabakzellen. a: Zeitabhängige Pi-Aufnahme. Die  $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ -Aufnahme blieb innerhalb von 1 min linear. Wie in allen weiteren Experimenten wurden die Aufnahmestudien bei pH 6.0 durchgeführt. Zu den Zellen wurde stets 37 KBq (7.5 nM) radioaktiv markiertes Phosphat ( $[^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ ) zugegeben. b: Konzentrationsabhängige Pi-Aufnahme. Der Einschub stellt die Linearisierung der Daten nach Eadie-Hofstee dar. In den Abbildungen a und b sind Median, Maximum und Minimum von drei parallelen Messungen (n=3) in einem repräsentativen Experiment gezeigt. c: Transkriptionsanalyse der hoch-affinen Pi-Transporter *NtPT1* und *NtPT2*. Die cDNA-Fragmente wurden in 30 Zyklen amplifiziert. d: qRT-PCR-Analyse der *NtPT1* und *NtPT2*. Das Expressionslevel der Gene wurde nach dem  $\Delta\Delta C_t$ -Berechnungsmodell

- auf das Expressionslevel in der +Pi-Kontrolle bezogen. Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde *Actin* als Referenzgen benutzt. Die Daten stellen den Mittelwert von drei unabhängigen Messungen  $\pm$  SD dar. .... 76
- Abbildung 3-23: In -Pi-Tabakzellen wurden vergleichbare  $K_T$ -Werte von Phi anhand (a) der Dosis-Wirkungsbeziehung ( $K_T=2.3 \pm 0.1$  mM) und (b) des Dixon-Plots ( $K_T=2.2$  mM) berechnet. a: Die [ $^{32}$ P]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Aufnahme wurde in der Anwesenheit steigender Pi- ( $K_T=3.3 \pm 0.3$   $\mu$ M), Arsenat- ( $K_T=30.8 \pm 2.4$   $\mu$ M) und Phi-Konzentrationen gehemmt. Die Pi-Aufnahme ohne Inhibitor wurde als 100 % festgelegt. b: Die Pi-Aufnahme wurde bei drei festgelegten Pi-Konzentrationen (1, 2.5 und 5  $\mu$ M) und in der Gegenwart steigender Phi-Konzentrationen gemessen. Der Schnittpunkt der Regressionskurven stellt den  $K_T$ -Wert dar. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei Messungen (n=3) in einem repräsentativen Experiment gezeigt. .... 77
- Abbildung 3-24: Phi hemmt die Pi-Aufnahme in -Pi-Tabakzellen durch einen kompetitiven Hemmmechanismus. Pi-Aufnahme in der Gegenwart von (a) Phi, (b) Arsenat und (c) CCCP. Die verwendeten Konzentrationen der Hemmsubstanzen sind in Klammern in der Tabelle angegeben. Phi und Arsenat veränderten den  $K_m$ -Wert aber nicht den  $V_{max}$ -Wert. Sie wirkten als kompetitive Inhibitoren der Pi-Aufnahme. CCCP diente als Beispiel für eine unkompetitive Hemmung und veränderte wie erwartet  $K_m$  und  $V_{max}$ . Die Regressionskurven passen die Medianwerte an die Michaelis-Menten-Gleichung an. Die Einschübe stellen die lineare Regression der Daten im Eadie-Hofstee-Diagramm dar. Es sind Median, Maximum und Minimum von drei Messungen in einem repräsentativen Experiment gezeigt. Die Tabellen erfassen die Daten  $\pm$  SE, die aus der Eadie-Hofstee-Auftragung ermittelt wurden. .... 78
- Abbildung 3-25: Die FACS-Analyse bestätigte die hohe Reinheit und Unversehrtheit der Vakuolenpräparation. a: Ungefärbte Kontrolle. b: Vakuolenpräparation nach Färbung mit Rhodamin 123 und Hoechst 33342. Durch eine Färbung mit Rhodamin 123 und Hoechst 33342 konnten zwischen intakten Vakuolen (Rhodamin<sup>+</sup>, 86 %, Quadrant links oben), Mitochondrien/Plastiden (Rhodamin<sup>+</sup>; Hoechst<sup>+</sup>, 0.76 %, Quadrant rechts oben) und beschädigten Organellen und Zellbruch (Rhodamin<sup>-</sup>, 13 %, Quadrant rechts unten) unterschieden werden. .... 80
- Abbildung 3-26: Der Dichtegradient, bestehend aus 25 % Percoll und AR-Siliconöl (AR200:AR1000=8:2), blieb nach der Zentrifugation stabil (graue Balken). Unter diesen Bedingungen war die Vakuolenausbeute bei den zwei Messzeiten gleich gut und reproduzierbar. Die Abbildung stellt die Ausbeute an Vakuolen bei verschiedenen Flotationsgradienten dar. Die Einstellung der Siliconöldichte erfolgte durch Mischen der Siliconöle AR200 und AR1000. Dem Aufnahmemedium wurden 20 % oder 25 % (v/v) Percoll zugesetzt. Jeder Messwert stellt den Mittelwert  $\pm$  SD (n=6) dar. .... 82
- Abbildung 3-27: Aufnahme von [ $^3$ H]E<sub>2</sub>17G und [ $^3$ H]LTC<sub>4</sub> in intakten Vakuolen aus Tomatenzellen zum funktionellen Nachweis der Transporteigenschaften des Aufnahmesystems. Die Aufnahme wurde unter der Anwendung der Siliconöl-Filtrationszentrifugation nach 18 min Inkubation ohne ATP (-ATP), mit ATP (+ATP) und in der Anwesenheit von ATP und Vanadat (+ATP/+Vanadat) untersucht. Die Konzentration von Vanadat war 1 mM. Die Aufnahme von [ $^3$ H]E<sub>2</sub>17G wurde in der Gegenwart von 10  $\mu$ M unmarkiertem E<sub>2</sub>17G gemessen. Das Vakuolenvolumen wurde anhand des aufgenommenen [ $^{14}$ C]Glycerols bestimmt. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert  $n \pm$  SD (n=6) dar. .... 84
- Abbildung 3-28: Die zeitabhängige Pi-Aufnahme durch den Tonoplasten intakter Vakuolen aus -Pi-Tomatenzellen war (a) ATP bzw. (b) PPI-abhängig. Trotzdem verlief der Transport sehr langsam. Um unspezifische Bindungen zu vermindern, wurde 100  $\mu$ M unmarkiertes Pi zugesetzt. Die Vakuolen wurden mit 0.1  $\mu$ Ci (3.7 kBq) [ $^{33}$ P]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> innerhalb 8, 16, 24 und 32 min inkubiert. Gleichzeitig wurde zur Bestimmung der Menge an flotierten Vakuolen 0.1  $\mu$ Ci (3.7 kBq) [ $^3$ H]H<sub>2</sub>O zum Aufnahmemedium zugegeben. Die Radioaktivität wurde anhand doppelter  $^3$ H- $^{33}$ P-Markierung im Szintillationszähler gemessen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert  $n \pm$  SD (n=6) eines repräsentativen Experiments dar. .... 85
- Abbildung 3-29: Der konzentrationsabhängige Pi-Transport durch den Tonoplasten intakter Vakuolen aus (a) -Pi- und (b) +Pi-Tomatenzellen blieb im untersuchten Konzentrationsbereich linear. Die Aufnahme wurde durch die Zugabe von Mg-ATP stimuliert. Die Vakuolen wurden mit 0.1  $\mu$ Ci (3.7 kBq) [ $^{33}$ P]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in der Gegenwart steigender Konzentrationen an unmarkiertem Pi inkubiert. Zur Bestimmung der Menge an flotierten Vakuolen wurde gleichzeitig 0.1  $\mu$ Ci (3.7 kBq) [ $^3$ H]H<sub>2</sub>O zum Aufnahmemedium zugegeben. Die Radioaktivität wurde anhand doppelter  $^3$ H- $^{33}$ P-Markierung im Szintillationszähler gemessen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert  $n \pm$  SD (n=6) eines repräsentativen Experiments dar. .... 85
- Abbildung 3-30: Mikroskopische Aufnahmen von Tomaten- und Tabakzellen. Die Bilder zeigen Tomatenzellen aus 4 Tage alter Suspensionskultur und Tabakzellen aus 6 Tage alter Suspensionskultur. .... 86
- Abbildung 3-31: Die Zugabe von Pi zu Pi-verarmten Zellen führte zu einer Stoffwechselaktivierung. Repräsentative *in vivo*  $^{31}$ P-NMR-Spektren von BY-2 Tabakzellen (-Pi-Zellen) nach einer Zugabe von Pi. Die Zellen wurden zunächst mit sauerstoffreichem, Pi-freiem Medium in einen Gleichgewichtszustand (semi steady-state) gebracht. Danach wurde 1 mM Pi zugegeben (t=0 bei Pi-Zugabe). a: *In vivo*  $^{31}$ P-NMR Spektren. Spektrum A: steady-state der Zellen; Spektrum B: 5 h Inkubation mit Pi; Spektrum C: 10 h Inkubation mit Pi; Spektrum D: 16 h Inkubation mit Pi. Zuordnung der NMR-Signale: G6P, Glukose-6-Phosphat; Signal „a“, Phosphomonoester und Zuckerphosphate wie z. B. Fruktose-6-Phosphat, Ribose-5-Phosphat; Signal „b“, NADP(H) und Phosphocholin; cyt Pi, cytoplasmatisches Pi; extr Pi, extrazelluläres Pi; vac Pi, vakuoläres Pi;  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -NTPs,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Nukleosidtriphosphate;  $\alpha$ - und  $\beta$ -NDPs,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Nukleosiddiphosphate (nicht nachweisbar); UDPG, Uridin-5'-diphosphat- $\alpha$ -D-Glukose. b und c: Relative Quantifizierung wichtiger Metabolite des Phosphatstoffwechsels. Die Signalfächen sind als % der Signalfäche der Referenzsubstanz (MDP) angegeben. Dazu wurde die TopSpin Software (Bruker) verwendet. MDP (16.91 ppm) ist nicht in den Spektren gezeigt. .... 89

- Abbildung 3-32:  $^{31}\text{P}$  chemische Verschiebung von Phi in Abhängigkeit des pH-Wertes. a: Die Spektren wurden bei Raumtemperatur und bei den im Bild angegebenen pH-Werten aufgenommen. Sowohl die (b) chemische Verschiebung als auch die (c) skalare Kopplungskonstante zeigten sich sensitiv gegenüber pH-Änderungen. Besonders ausgeprägt war die pH-Abhängigkeit beider Parameter im pH-Bereich von 4.5 bis 7.5. Dies ermöglichte die subzelluläre Lokalisierung der Phi-Signale..... 90
- Abbildung 3-33: In der Anwesenheit von Phi blieb der Stoffwechsel der  $-\text{Pi}$ -Tabakzellen intakt. *In vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR von BY-2 Tabakzellen nach Zugabe von Phi. Die Zellen wurden zunächst mit sauerstoffangereichertem, Pi-freiem Medium zum semi steady-state gebracht. Danach wurde 1 mM Phi zugegeben. Aus den aufgenommenen Spektren ergab sich eine deutliche cytoplasmatische Akkumulation von Phi. Phi wurde aber auch in geringen Mengen in die Vakuolen aufgenommen. Die Zuordnung der Phi-Signale fand durch einen Vergleich mit den in Abbildung 3-32 dargestellten pH-Titrationskurven statt (cyt Phi, cytoplasmatisches Phi; vac Phi, vakuoläres Phi). Die Zuordnung der Signale wurde wie in Abbildung 3-31 vorgenommen. a: *In vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren. Spektrum A: semi steady-state der Zellen; Spektrum B: 3 h Inkubation mit Phi; Spektrum C: 6 h Inkubation mit Phi; Spektrum D: 11 h Inkubation mit Phi; Spektrum E: 15 h Inkubation mit Phi. b: Relative Quantifizierung von cyt und vac Phi. Die Signalfächen sind als % der Signalfäche der Referenzsubstanz (MDP) angegeben. Dazu wurde die TopSpin Software (Bruker) verwendet. MDP (16.91 ppm) ist nicht in den Spektren gezeigt..... 93
- Abbildung 3-34: Subtraktion der aufgenommenen Spektren nach Perfusion mit Phi. Die Akkumulation von Phi in Cytoplasma und in den Vakuolen ist in der Subtraktion noch deutlicher zu erkennen. Spektrum A: 20 h (semi steady-state der Phi-Akkumulation) – 19 h; Spektrum B: 20 h – 13 h; Spektrum C: 20 h – 9 h; Spektrum D: 20 h – 6 h; Spektrum E: 20 h – 2 h..... 93
- Abbildung 3-35: Influx und Efflux von xenobiotischem Phi in Abhängigkeit vom extrazellulären Pi-Status. Die Abbildung stellt die aufgenommenen *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren dar. Unter Pi-Mangelbedingungen wurde Phi überwiegend im Cytosol akkumuliert (pH 7.3, Spektren C, C\*). Die Zugabe von Pi zu den Phi-gesättigten Zellen führte zum Efflux der cytosolischen Phi-Signale (Spektren E, E\*). Spektrum A: semi steady-state der  $-\text{Pi}$ -Zellen; Spektrum B: 6 h Inkubation mit Phi; Spektrum C: 20 h Inkubation mit Phi (semi steady state der Phi Akkumulation); Spektrum D: 21 h Inkubation mit Phi und 1 h nach Pi Zugabe; Spektrum E: 22 h Inkubation mit Phi und 2 h nach Pi Zugabe. Die Zuordnung der Signale wurde wie in Abbildung 3-31 vorgenommen. Als externe Referenzsubstanz wurde MDP benutzt. MDP (16.91 ppm) ist nicht in den Spektren gezeigt..... 94
- Abbildung 3-36: Relative Quantifizierung der NMR-Signale vor und nach Pi-Zugabe zu Phi-gesättigten Zellen. a: Relative Quantifizierung des cytoplasmatischen Phi-Signals. ND\*: Die Auswertung der Signalintensität war nicht möglich, aber so niedrig, dass sie im Diagramm als „0“ festgelegt wurde. b und c: Relative Quantifizierung wichtiger Metabolite des Phosphatstoffwechsels. Die Signalfächen sind als % der Signalfäche der Referenzsubstanz (MDP) angegeben. Dazu wurde TopSpin Software (Bruker) verwendet. Die leichte Zunahme der Signalintensität des vakuolären Pi-Signals war auf die vakuoläre Phi-Akkumulation zurückzuführen..... 95
- Abbildung 3-37: Ein kleiner Teil des cytoplasmatischen Phi wurde in das vakuoläre Kompartiment verschoben. Subtraktion der aufgenommenen Spektren nach Zugabe von Pi zu Phi-gesättigten Zellen. Spektrum A: 20 h (semi steady-state der Phi-Akkumulation) – 21 h; Spektrum B: 20 h – 22 h; Spektrum C: 20 h – 23 h; Spektrum D: 20 h – 24 h; Spektrum E: 20 h – 25 h; Spektrum F: 20 h – 26 h. Die Zuordnung der Signale wurde wie in Abbildung 3-31 vorgenommen..... 96
- Abbildung 3-38: Pi-gesättigte Zellen akkumulierten Phi direkt in den Vakuolen. Die chemische Verschiebung der Phi-Signale entsprach pH 5.5. Spektrum A: semi steady-state der  $-\text{Pi}$ -Zellen; Spektrum B: 4 h Inkubation mit Pi; Spektrum C: 11 h Inkubation mit Pi und 7 h nach Phi-Zugabe; Spektrum D: 17 h Inkubation mit Pi und 13 h nach Phi-Zugabe. Die Zuordnung der Signale wurde wie in Abbildung 3-31 vorgenommen. Als externe Referenzsubstanz wurde MDP benutzt. MDP (16.91 ppm) ist nicht in den Spektren gezeigt..... 97
- Abbildung 3-39: Repräsentative  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren zum Nachweis von Pi und Phi in Blattextrakten der *pho2*-Mutante aus *A. thaliana*. Spektrum A: Blattextrakt nach Wachstum der *pho2*-Mutante auf +Pi-Medium; Spektrum B: Blattextrakt nach Wachstum der *pho2*-Mutante auf  $-\text{Pi}/+\text{Phi}$ -Medium..... 98
- Abbildung 3-40: In Blättern der *pho2*-Mutante wird sowohl Pi als auch Phi überakkumuliert. Es wurde eine 3- bzw. 5-fach höhere Akkumulation von Pi und Phi als in Blättern der Wildtyp-Pflanzen nachgewiesen. Vermutlich findet die Allokation von Pi und Phi innerhalb der Pflanze über die gleichen Mechanismen statt. Die *Arabidopsis*-Pflanzen wurden für eine Woche als Hydrokultur auf Medium mit und ohne Pi kultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen für eine weitere Woche auf Medium mit Pi (+Pi) bzw. ohne Pi aber mit Phi ( $-\text{Pi}/+\text{Phi}$ ) kultiviert. Phi wurde in einer Konzentration von 0.5 mM angewandt. Die Daten stellen den Mittelwert einer Doppelbestimmung in einem repräsentativen Experiment dar..... 99
- Abbildung 4-1: Schematische Zusammenfassung des subzellulären Anreicherungsmusters von Pi bzw. Phi in Pi-verarmten Zellen. Extrazelluläres Pi wurde von Pi-verarmten Zellen kontinuierlich aufgenommen und in den Vakuolen (pH 5.6) gespeichert. Phi zeigt dagegen eine deutliche cytoplasmatische Anreicherung (pH 7.3). Nur in geringerem Maß wurde Phi in die Vakuolen transportiert..... 106
- Abbildung 4-2: Zusammenfassung der Effekte von Phi in Pflanzenzellen. Phi hemmte die Pi-Aufnahme, die *PSR*-Genexpression, das Wachstum (Mitose) und die Pi-Wahrnehmung. Weiterhin wurde durch *in vivo* NMR gezeigt, dass Phi nicht von BY-2 Zellen verstoffwechselt und nur in geringem Umfang in die Vakuolen transportiert wurde..... 119

Abbildung 7-1: Substrataffinität des hoch-affinen Pi-Transportsystems in Tomatenzellen ( <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Lulullus). Die Aufnahme von 0.1 $\mu$ Ci (37 KBq) radioaktiv markierter Phosphorsäure ( $^{32}\text{P}[\text{H}_3\text{PO}_4]$ ) wurde in der Gegenwart steigender Konzentrationen ausgewählter Pi-Strukturanaloga ( $\text{KH}_2\text{CrO}_4$ , $\text{K}_2\text{MoO}_4$ ) und Inhibitoren des Ionentransportes (2,4 DNP, CCCP) ermittelt. Der $^{32}\text{P}$ -Influx ohne Inhibitor wurde auf 100 % festgelegt. Die $^{32}\text{P}$ -Aufnahme in Gegenwart von unmarkiertem Pi (weiße Quadratsymbole, Hill-Koeffizient: $P=1.08$ ) ist als Kontrolle dargestellt. Es sind Median, Maximum und Minimum gezeigt. Die Regressionskurven passen die logistische Dosis-Wirkungsbeziehung (allosterische Hill-Kinetik) an die Medianwerte an.....	XIV
Abbildung 7-2: <i>In vivo</i> $^{31}\text{P}$ -NMR von Tomatenzellen ( $-\text{Pi}$ -Zellen) nach Zugabe von Pi. Aufgrund der kleinen Zellgröße (im Durchschnitt 25 $\mu\text{m}$ , vgl. Abbildung 3-30) wurden die Zellen sehr dicht im NMR-Röhrchen gepackt, wodurch vermutlich die gleichmäßige Verteilung von Nährmedium bzw. Sauerstoff verhindert wurde. Das führte zum Absterben der Zellen. Das konnte an der Abnahme der G6P- und NTP-Signalintensitäten erkannt werden. Die Zellen wurden zunächst mit sauerstoffangereichertem Pi-freiem Medium in einen Gleichgewichtszustand (semi steady-state) gebracht. Danach wurde 1 mM Pi zugegeben ( $t=0$ bei Pi-Zugabe). Spektrum A: semi steady-state der Zellen; Spektrum B: 1 h Inkubation mit Pi; Spektrum C: 2 h Inkubation mit Pi; Spektrum D: 6 h Inkubation mit Pi; Spektrum E: 8 h Inkubation mit Pi. Zuordnung der NMR-Signale: G6P, Glucose-6-Phosphat; Signal „a“, Phosphomonoester und Zuckerphosphate wie z.B. Fructose-6-Phosphat, Ribose-5-Phosphat; Signal „b“, NADP(H) und Phosphocholin; cyt Pi, cytoplasmatisches Pi; extr Pi, extrazelluläres Pi; vac Pi, vakuoläres Pi; $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -NTPs, $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Nukleosidtriphosphate; $\alpha$ - und $\beta$ -NDP, $\alpha$ - und $\beta$ -Nukleosiddiphosphate; UDPG, Uridin-5'-Diphosphat- $\alpha$ -D-Glukose. MDP (16.91 ppm) diente als Referenzsubstanz und ist nicht in den Spektren gezeigt.....	XV

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Anzuchtbedingungen von Tomaten- und Tabakzellkulturen.....	30
Tabelle 2-2: Liste der verwendeten Enzymtests. Die Tabelle fasst den Zweck der einzelnen Enzymbestimmungen zusammen.....	35
Tabelle 2-3: Reaktionsansatz zur cDNA Synthese.....	43
Tabelle 2-4: Reaktionsansatz für Real Time PCR.....	44
Tabelle 2-5: Amplifikationsbedingungen der Real-Time PCR. Die Annealing-Temperatur ( $X^\circ\text{C}$ ) wurde für jedes Gen spezifisch optimiert (vgl. Kapitel 2.8.3.4).....	44
Tabelle 2-6: Zusammenfassung von verwendeten Sequenz-spezifischen Primern zur Durchführung von PCR und RT-PCR.....	45
Tabelle 3-1: Übersicht zur Vakuolenausbeute und Reinheit an einem repräsentativen Beispiel einer Vakuolenpräparation anhand der Aktivität von Markerenzymen.....	80
Tabelle 7-1: Zusammensetzung von MS-Medium zur Anzucht von Zellkulturen aus <i>S. lycopersicum</i> (Tomatenzellkulturen). Das Nährmedium wurde nach Murashige & Skoog (1962) hergestellt. Der pH-Wert des Mediums wurde auf $\text{pH}=6.0$ eingestellt. Zur Herstellung von $-\text{Pi}$ -Medium wurde auf $\text{KH}_2\text{PO}_4$ verzichtet.....	VII
Tabelle 7-2: Zusammensetzung von MS-Medium zur Anzucht von Zellkulturen aus <i>N. tabacum</i> (Tabakzellkulturen, BY-2; Rezept von Duchefa; M0221). (*) Diese Komponenten wurden zum Basalmedium zugegeben, wobei die Endkonzentration von $\text{KH}_2\text{PO}_4$ auf 2.5 mM erhöht wurde. Der pH-Wert des Mediums wurde auf $\text{pH}=5.8$ eingestellt. Zur Herstellung von $-\text{Pi}$ -Medium wurde auf $\text{KH}_2\text{PO}_4$ verzichtet.....	VIII
Tabelle 7-3: Zusammensetzung von 1 $\times$ Hoagland-Medium zur hydroponischen Anzucht von $+\text{Pi}$ -Pflanzen aus <i>S. lycopersicum</i> (Tomate). Das Medium wurde nach Daram <i>et al.</i> (1998) hergestellt. Der pH-Wert des Mediums wurde auf $\text{pH}=5.5$ eingestellt.....	VIII
Tabelle 7-4: Zusammensetzung von 1 $\times$ Hoagland-Medium zur hydroponischen Anzucht von $-\text{Pi}$ -Pflanzen aus <i>S. lycopersicum</i> (Tomate). Das Medium wurde nach Daram <i>et al.</i> (1998) hergestellt. Der pH-Wert des Mediums wurde auf $\text{pH}=5.5$ eingestellt.....	IX
Tabelle 7-5: Zusammensetzung von CPW-Medium (modifiziert nach Frearson <i>et al.</i> , 1973). Der pH-Wert des Mediums wurde auf $\text{pH}=5.0$ eingestellt. Zur Herstellung von $-\text{Pi}$ -CPW-Medium wurde auf $\text{KH}_2\text{PO}_4$ verzichtet.....	IX
Tabelle 7-6: pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung (ppm) von Pi.....	X

### 7.3 Zellkulturmedien

**Tabelle 7-1:** Zusammensetzung von MS-Medium zur Anzucht von Zellkulturen aus *S. lycopersicum* (Tomatenzellkulturen). Das Nährmedium wurde nach Murashige & Skoog (1962) hergestellt. Der pH-Wert des Mediums wurde auf pH=6.0 eingestellt. Zur Herstellung von -Pi-Medium wurde auf  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  verzichtet.

Komponenten	mmol/L	mg/L
<b><u>Anorganische Salze</u></b>		
Ammoniumnitrat ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	20.61	1650.00
Kaliumnitrat ( $\text{KNO}_3$ )	18.79	1900.00
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	1.50	180.72
Eisensulfat ( $\text{FeSO}_4$ )	0.18	27.36
Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	3.00	333.27
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2.50	340.22
Mangansulfat ( $\text{MnSO}_4$ )	0.10	16.90
Zinksulfat ( $\text{ZnSO}_4$ )	0.029	8.60
Kaliumiodid (KI)	0.005	0.83
Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0.10	6.20
Natriummolybdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ )	0.00103	0.25
<b><u>Andere Komponenten:</u></b>		
D(+)-Saccharose	8.70	30.00
Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	0.10	33.69
<b><u>Vitamine</u></b>		
Thiamin $\text{B1} \times \text{HCl}$	0.0015	0.50
Pyridoxin $\text{B6} \times \text{HCl}$	0.0029	0.50
Nicotinsäureamid	0.0082	1.00
<i>myo</i> -Inosit	0.56	100.00
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	0.00045	0.10
6-Furfurylaminopurin	0.000092	0.02

**Tabelle 7-2:** Zusammensetzung von MS-Medium zur Anzucht von Zellkulturen aus *N. tabacum* (Tabakzellkulturen, BY-2; Rezept von Duchefa; M0221). (\*) Diese Komponenten wurden zum Basalmedium zugegeben, wobei die Endkonzentration von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf 2.5 mM erhöht wurde. Der pH-Wert des Mediums wurde auf pH=5.8 eingestellt. Zur Herstellung von -Pi-Medium wurde auf  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  verzichtet.

Komponenten	mmol/L	mg/L
<b><u>Anorganische Salze</u></b>		
Ammoniumnitrat ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	20.61	1650.00
Kaliumnitrat ( $\text{KNO}_3$ )	18.79	1900.00
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	1.50	180.72
FeNaEDTA-Komplex	0.10	36.70
Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	2.99	332.02
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) <sup>*</sup>	2.50	340.22
Mangansulfat ( $\text{MnSO}_4$ )	0.10	16.90
Zinksulfat ( $\text{ZnSO}_4$ )	0.029	8.60
Kaliumiodid (KI)	0.005	0.83
Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0.10	6.20
Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ )	0.001	0.025
Kobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ )	0.0011	0.025
Natriummolybdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ )	0.00103	0.25
<b><u>Andere Komponenten:</u></b>		
D(+)-Saccharose <sup>*</sup>	8.70	30.00
<b><u>Vitamine</u></b> <sup>*</sup>		
Thiamin $\text{B1} \times \text{HCl}$	0.0029	0.98
<i>myo</i> -Inosit	0.56	100.00
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	0.00018	0.04

**Tabelle 7-3:** Zusammensetzung von  $1 \times$  Hoagland-Medium zur hydroponischen Anzucht von +Pi-Pflanzen aus *S. lycopersicum* (Tomate). Das Medium wurde nach Daram *et al.* (1998) hergestellt. Der pH-Wert des Mediums wurde auf pH=5.5 eingestellt.

Komponenten	mmol/L	mg/L
<b><u>Anorganische Salze</u></b>		
Kaliumnitrat ( $\text{KNO}_3$ )	18.79	303.3
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	1.08	130.1
Eisensulfat ( $\text{FeSO}_4$ )	0.018	2.74
Kalziumnitrat ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ )	2.00	328.4
Ammoniumdihydrogenphosphat ( $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ )	0.50	57.5
Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2$ )	0.00014	1.76
Zinksulfat ( $\text{ZnSO}_4$ )	0.0008	0.13
Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0.046	2.84
Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ )	0.0003	0.048
Natriummolybdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ )	0.0005	0.103
<b><u>Andere Komponenten:</u></b>		
Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	0.016	5.38



**Tabelle 7-4:** Zusammensetzung von 1×Hoagland-Medium zur hydroponischen Anzucht von –Pi-Pflanzen aus *S. lycopersicum* (Tomate). Das Medium wurde nach Daram *et al.* (1998) hergestellt. Der pH-Wert des Mediums wurde auf pH=5.5 eingestellt.

<b>Komponenten</b>	<b>mmol/L</b>	<b>mg/L</b>
<b><u>Anorganische Salze</u></b>		
Kaliumnitrat (KNO <sub>3</sub> )	18.79	303.3
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	1.08	130.1
Eisensulfat (FeSO <sub>4</sub> )	0.018	2.74
Kalziumnitrat (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	2.00	328.4
Ammoniumnitrat (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	0.50	40.02
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	0.00014	1.76
Zinksulfat (ZnSO <sub>4</sub> )	0.0008	0.13
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0.046	2.84
Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )	0.0003	0.048
Natriummolybdat (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> )	0.0005	0.103
<b><u>Andere Komponenten:</u></b>		
Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat (Na <sub>2</sub> EDTA)	0.016	5.38

**Tabelle 7-5:** Zusammensetzung von CPW-Medium (modifiziert nach Frearson *et al.*, 1973). Der pH-Wert des Mediums wurde auf pH=5.0 eingestellt. Zur Herstellung von –Pi-CPW-Medium wurde auf KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> verzichtet.

<b>Komponenten</b>	<b>mmol/L</b>	<b>mg/L</b>
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.2	27.2
Kaliumnitrat (KNO <sub>3</sub> )	1.0	101.0
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	1.0	120.48
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	10.0	1121.1
Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )	0.0001	0.016
Kaliumiodid (KI)	0.001	0.16

## 7.4 pH-abhängige chemische Verschiebung von Pi

Die pH-Titrationskurve der chemischen Verschiebung (ppm) von Pi wurde freundlicherweise von Dr. Cor Dijkema und Dr. Pieter de Waard (WNMRC der Universität Wageningen, Wageningen, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die Werte sind in Tabelle 7-6 aufgeführt.

**Tabelle 7-6:** pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung (ppm) von Pi.

Pi (ppm)	pH	Pi (ppm)	pH	Pi (ppm)	pH	Pi (ppm)	pH	Pi (ppm)	pH	Pi (ppm)	pH
0.74	4.32	1.13	5.95	1.52	6.33	1.91	6.62	2.30	6.90	2.69	7.23
0.75	4.60	1.14	5.96	1.53	6.34	1.92	6.63	2.31	6.61	2.70	7.24
0.76	4.77	1.15	5.97	1.54	6.35	1.93	6.63	2.32	6.91	2.71	7.25
0.77	4.89	1.16	5.99	1.55	6.36	1.94	6.64	2.33	6.92	2.72	7.27
0.78	4.99	1.17	6.00	1.56	6.36	1.95	6.65	2.34	6.93	2.73	7.28
0.79	5.07	1.18	6.01	1.57	6.37	1.96	6.66	2.35	6.94	2.74	7.29
0.80	5.13	1.19	6.02	1.58	6.38	1.97	6.66	2.36	6.94	2.75	7.30
0.81	5.19	1.20	6.03	1.59	6.39	1.98	6.67	2.37	6.95	2.76	7.31
0.82	5.24	1.21	6.04	1.60	6.40	1.99	6.68	2.38	6.96	2.77	7.32
0.83	5.29	1.22	6.06	1.61	6.40	2.00	6.68	2.39	6.97	2.78	7.33
0.84	5.33	1.23	6.07	1.62	6.41	2.01	6.69	2.40	6.97	2.79	7.35
0.85	5.37	1.24	6.08	1.63	6.42	2.02	6.70	2.41	6.98	2.80	7.36
0.86	5.41	1.25	6.09	1.64	6.43	2.03	6.70	2.42	6.99	2.81	7.37
0.87	5.44	1.26	6.10	1.65	6.43	2.04	6.71	2.43	7.00	2.82	7.38
0.88	5.48	1.27	6.11	1.66	6.44	2.05	6.72	2.44	7.01	2.83	7.40
0.89	5.51	1.28	6.12	1.67	6.45	2.06	6.73	2.45	7.01	2.84	7.41
0.90	5.53	1.29	6.13	1.68	6.46	2.07	6.73	2.46	7.02	2.85	7.42
0.91	5.56	1.30	6.14	1.69	6.46	2.08	6.74	2.47	7.03	2.86	7.44
0.92	5.59	1.31	6.15	1.70	6.47	2.09	6.75	2.48	7.04	2.87	7.45
0.93	5.61	1.32	6.16	1.71	6.48	2.10	6.75	2.49	7.05	2.88	7.47
0.94	5.63	1.33	6.17	1.72	6.49	2.11	6.76	2.50	7.06	2.89	7.48
0.95	5.65	1.34	6.18	1.73	6.49	2.12	6.77	2.51	7.06	2.90	7.50
0.96	5.68	1.35	6.20	1.74	6.50	2.13	6.77	2.52	7.07	2.91	7.51
0.97	5.70	1.36	6.20	1.75	6.51	2.14	6.78	2.53	7.08	2.92	7.53
0.98	5.72	1.37	6.21	1.76	6.51	2.15	6.79	2.54	7.09	2.93	7.55
0.99	5.73	1.38	6.21	1.77	6.52	2.16	6.80	2.55	7.10	2.94	7.56
1.00	5.75	1.39	6.22	1.78	6.53	2.17	6.80	2.56	7.11	2.95	7.58
1.01	5.77	1.40	6.23	1.79	6.54	2.18	6.81	2.57	7.12	2.96	7.60
1.02	5.79	1.41	6.24	1.80	6.54	2.19	6.82	2.58	7.13	2.97	7.62
1.03	5.80	1.42	6.25	1.81	6.55	2.20	6.82	2.59	7.13	2.98	7.64
1.04	5.82	1.43	6.26	1.82	6.56	2.21	6.83	2.60	7.14	2.99	7.66
1.05	5.84	1.44	6.27	1.83	6.56	2.22	6.84	2.61	7.15	3.00	7.68
1.06	5.85	1.45	6.28	1.84	6.57	2.23	6.85	2.62	7.16	3.01	7.70
1.07	5.87	1.46	6.28	1.85	6.58	2.24	6.85	2.63	7.17	3.02	7.72
1.08	5.88	1.47	6.29	1.86	6.59	2.25	6.86	2.64	7.18	3.03	7.75
1.09	5.89	1.48	6.30	1.87	6.59	2.26	6.87	2.65	7.19	3.04	7.77
1.10	5.91	1.49	6.31	1.88	6.60	2.27	6.88	2.66	7.20	3.05	7.80
1.11	5.92	1.50	6.32	1.89	6.61	2.28	6.88	2.67	7.21	3.06	7.83
1.12	5.94	1.51	6.33	1.90	6.61	2.29	6.89	2.68	7.22	3.07	7.86

## 7.5 Berechnung kinetischer Parameter

### 7.5.1 Transportgeschwindigkeit

Zur Berechnung der Pi-Transportgeschwindigkeit wurde Gleichung 2-1 angewandt:

$$v = \frac{C \times V_R \times [dpm_{Probe}]}{[dpm_{Referenz}]} \quad (\text{Gleichung 7-1})$$

wobei  $C$ : Konzentration von Pi (radioaktiv markiert und unmarkiert);

$V_R$ : Volumen der Referenzlösung;

$dpm_{Probe}$ : Aktivität von [ $^{32}\text{P}$ ] bzw. [ $^{33}\text{P}$ ] in der Probe;

$dpm_{Referenz}$ : Aktivität von [ $^{32}\text{P}$ ] bzw. [ $^{33}\text{P}$ ] in der Referenzlösung.

Die spezifische Pi-Aufnahme ( $v$ ) wurde in Zellsuspensionskulturen auf die Frischmasse (FG) und in intakten Vakuolen auf das Vakuolenvolumen ( $V_{vak}$ ) bezogen. Zur Bestimmung des Vakuolenvolumens wurde die folgende Gleichung verwendet:

$$v = \frac{[dpm_{Referenz, \text{ } ^3\text{H}}]}{[dpm_{Probe, \text{ } ^3\text{H}}] \times V_{R, \text{ } ^3\text{H}}} \quad (\text{Gleichung 7-2})$$

wobei  $dpm_{Referenz, \text{ } ^3\text{H}}$ : Aktivität von [ $^3\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O in der Referenzlösung;

$dpm_{Probe, \text{ } ^3\text{H}}$ : Aktivität von [ $^3\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O in der Probe;

$V_{R, \text{ } ^3\text{H}}$ : Volumen der Referenzlösung.

### 7.5.2 Michaelis-Menten-Kinetik

Die Transportgeschwindigkeit nimmt mit steigenden Substratkonzentrationen zu und erreicht bei hohen Konzentrationen einen maximalen Wert  $V_{max}$ .  $V_{max}$  ist von der Substratkonzentration unabhängig. Mithilfe der von Michaelis und Menten angegebenen Gleichung lässt sich der Zusammenhang zwischen Transportgeschwindigkeit und Substratkonzentration beschreiben. Ein Maß für die Affinität des Transporters zum Substrat stellt die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) dar. Bei dieser Konzentration läuft der Transport mit halbmaximaler Geschwindigkeit ab. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde eine nichtlineare Regressionsanpassung der experimentellen Daten nach der Michaelis-Menten-Gleichung vorgenommen:

$$v = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S} \quad (\text{Gleichung 7-3})$$

Dabei bedeuten:

$V_{max}$ : Maximaltransportgeschwindigkeit;

$K_m$ : Michaelis-Menten-Konstante;

$S$ : Substratkonzentration.

In Tabakzellen wurde zusätzlich ein Diffusionsanteil addiert:

$$v = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S} + K_D \times S \quad (\text{Gleichung 7-4})$$

wobei  $K_D$  die Diffusionskonstante darstellt.

### 7.5.3 Eadie-Hofstee Linearisierung

Die Bestimmung der kinetischen Parameter nach Michaelis und Menten ist verhältnismäßig ungenau, da die Sättigungskurve (Asymptote einer Hyperbel) von Beginn an gekrümmt ist. Im Bereich niedriger Substratkonzentrationen, wo die Anfangsgeschwindigkeit annähernd proportional zu der Substratkonzentration ist, führt dies zu fehlerhafter Bestimmung des  $K_m$ -Wertes. Darum wurde die Sättigungskurve in eine lineare Form gebracht. Die Linearisierung der Daten basiert hierbei auf den Verfahren nach Eadie-Hofstee:

$$v = V_{max} - K_m \times \frac{v}{S} \quad (\text{Gleichung 7-5})$$

Bei einer Auftragung von  $v$  gegen  $v/S$  erhält man eine Gerade, welche die Ordinate im Punkt  $V_{max}$  schneidet.  $K_m$  lässt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden berechnen.

### 7.5.4 $IC_{50}$ -Wert und Hill-Kinetik

Der  $IC_{50}$ -Wert, die Substratkonzentration, die zu einer halbmaximalen Hemmung der Aufnahme einer Referenzsubstanz führt, wurde aus den experimentell ermittelten Daten mittels nichtlinearer Regression nach der logistischen Dosis-Wirkungsbeziehung (allosterische Hill-Kinetik) errechnet:

$$Y = \frac{Y_{Min} + (Y_{Max} - Y_{Min})}{1 + \left(\frac{X}{IC_{50}}\right)^{-P}} \quad (\text{Gleichung 7-6})$$

wobei  $Y_{Max}$ : Aufnahmegeschwindigkeit ohne Inhibitor (=100 %);

$Y_{Min}$ : nicht sättigbarer Anteil, der bei einem starkem Überschuss an Inhibitor gegenüber der Konzentration des eingesetzten Pi gemessen wurde;

$X$ : Konzentration des Inhibitors;

$P$ : Hill-Koeffizient.

Dazu wurde die Aufnahme von [ $^{32}$ P] in der Gegenwart steigender Inhibitorkonzentrationen gemessen. Die [ $^{32}$ P]-Aufnahme ( $Y$ ) wurde mit Gleichung 2-1 berechnet, ohne die Frischmasse zu berücksichtigen. Die Werte  $Y$  wurden als Prozent gegen  $C_I$  aufgetragen.

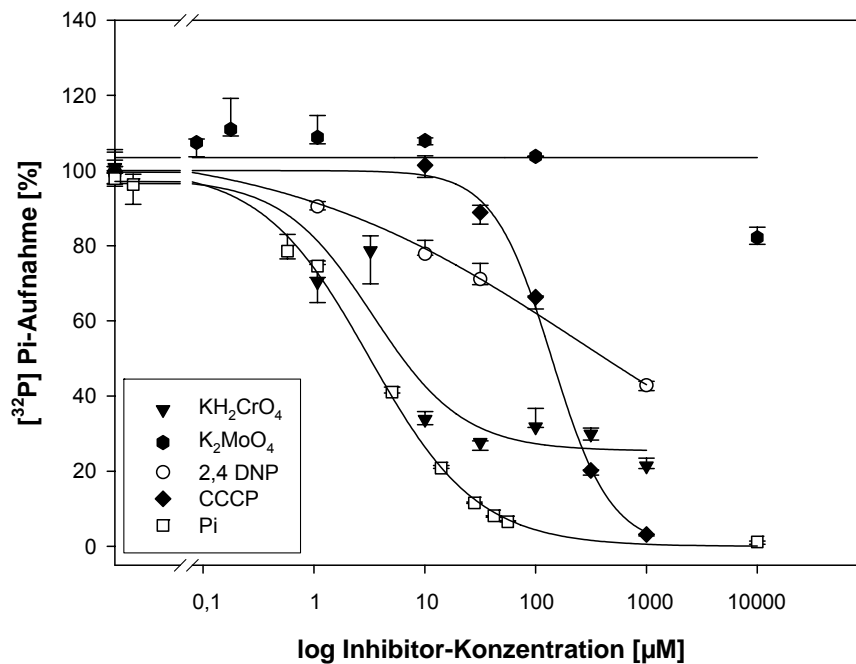
Der  $IC_{50}$ -Wert ist mit der Inhibitorkonstante ( $K_i$ ), die ein Maß für die Affinität zwischen Transporter und Inhibitor darstellt, über die Cheng-Prusoff-Gleichung (Cheng & Prusoff, 1973) verknüpft:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{S}{K_m}} \quad (\text{Gleichung 7-7})$$

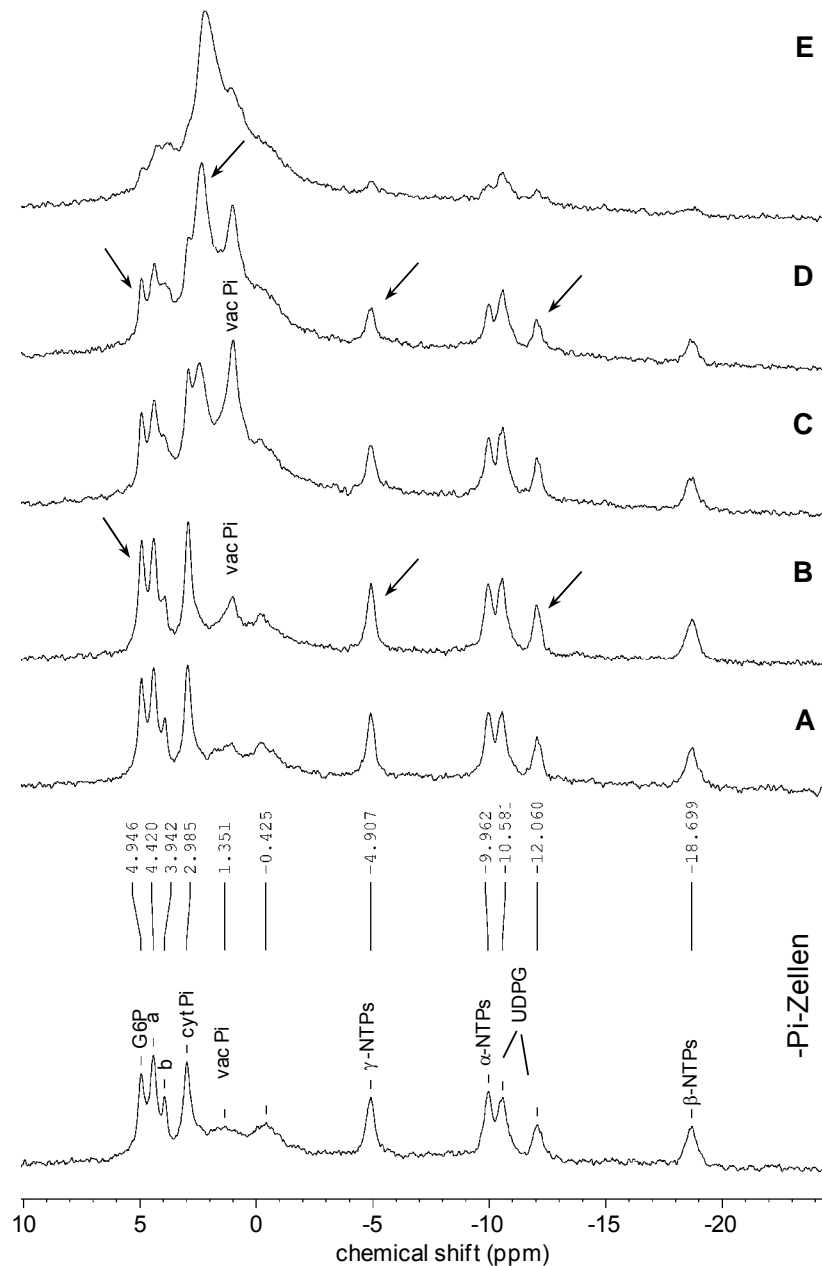
### 7.5.5 Dixon-Plot

Die Bestimmung der Inhibitorkonstante ( $K_i$ ) nach Dixon (1953) ist eine weitere Methode zur Ermittlung der Affinität zwischen Transporter und Inhibitor. Bei diesem Verfahren wird die Transportgeschwindigkeit bei einer konstanten Substratkonzentration ( $S$ ), aber bei steigenden Inhibitorkonzentrationen ( $I_1, I_2, I_3 \dots I_n$ ) gemessen. Der reziproke Wert der Transportgeschwindigkeit ( $1/v$ ) wird gegen die Inhibitorkonzentration ( $I$ ) aufgetragen. Die Messung wird bei mehreren konstanten Substratkonzentrationen ( $S_1, S_2, S_3 \dots S_n$ ) wiederholt. Den erhaltenen Messpunkten bei jeder Substratkonzentration lässt sich eine lineare Regressionsgerade unabhängig vom Mechanismus bzw. Typ der Hemmung anpassen. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden ergibt den  $K_i$ -Wert. Im Falle einer kompetitiven Inhibierung liegt der Schnittpunkt der Regressionsgeraden im zweiten Quadrant über der negativen x-Achse. Bei einem nichtkompetitiven Hemmmechanismus liegt der Schnittpunkt auf der negativen x-Achse, sodass der  $K_i$ -Wert direkt abgelesen werden kann. Ein paralleler Verlauf der Regressionsgeraden ist bei einem unkompetitiven Hemmmechanismus zu erwarten.

## 7.6 Substrataffinität des Pi-Transportsystems



## 7.7 *In vivo* $^{31}\text{P}$ NMR von Tomatenzellen



**Abbildung 7-2:** *In vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR von Tomatenzellen (-Pi-Zellen) nach Zugabe von Pi. Aufgrund der kleinen Zellgröße (im Durchschnitt 25  $\mu\text{m}$ , vgl. Abbildung 3-30) wurden die Zellen sehr dicht im NMR-Röhrchen gepackt, wodurch vermutlich die gleichmäßige Verteilung von Nährmedium bzw. Sauerstoff verhindert wurde. Das führte zum Absterben der Zellen. Das konnte an der Abnahme der G6P- und NTP-Signalintensitäten erkannt werden. Die Zellen wurden zunächst mit sauerstoffangereichertem Pi-freiem Medium in einen Gleichgewichtszustand (semi steady-state) gebracht. Danach wurde 1 mM Pi zugegeben ( $t=0$  bei Pi-Zugabe). Spektrum A: semi steady-state der Zellen; Spektrum B: 1 h Inkubation mit Pi; Spektrum C: 2 h Inkubation mit Pi; Spektrum D: 7 h Inkubation mit Pi; Spektrum E: 8 h Inkubation mit Pi. Zuordnung der NMR-Signale: G6P, Glucose-6-Phosphat; Signal „a“, Phosphomonoester und Zuckerphosphate wie z.B. Fructose-6-Phosphat, Ribose-5-Phosphat; Signal „b“, NADP(H) und Phosphocholin; cyt Pi, cytoplasmatisches Pi; extr Pi, extrazelluläres Pi; vac Pi, vakuoläres Pi;  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -NTPs,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Nukleosidtriphosphate;  $\alpha$ - und  $\beta$ -NDP,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Nukleosiddiphosphate; UDPG, Uridin-5'-Diphosphat- $\alpha$ -D-Glukose. MDP (16.91 ppm) diente als Referenzsubstanz und ist nicht in den Spektren gezeigt.

## 7.8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und geholfen haben!

Mein größter Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Margret Köck. Ich danke für die Möglichkeit, dieses interessante und vielfältige Thema zu bearbeiten, für die jederzeit gewährte Unterstützung sowie für die zahlreichen Erfahrungen, die ich sammeln konnte. Für die Finanzierung meines Projektes und das in mich gesetzte Vertrauen möchte ich zugleich danken.

Für die praktischen Hinweise in meiner Laborarbeit möchte ich Frau Karin Klar danken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Ilka Knütter für die vielen Hilfestellungen und die wertvollen Ratschläge zur Durchführung der Transportexperimente.

Unseren Kooperationspartnern danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Am Wageningen NMR Center, Niederlande konnte ich *in vivo* NMR-Messungen durchführen. Besonderer Dank gilt Dr. Cor Dijkema und Dr. Pieter de Waard für die Einführung in die NMR-Messtechnik, die Hilfe bei den Messungen und bei der Interpretation der NMR-Daten. Der ganzen AG Biophysik der Universität Wageningen danke ich für die freundliche Aufnahme.

An der Züricher Universität, Institut für Pflanzenbiologie konnte ich Transportexperimente mit intakten Vakuolen durchführen. Für diese Möglichkeit möchte ich Dr. Markus Klein und Prof. Enrico Martinoia danken.

Bei Frau Dr. Beate Fuchs möchte ich für die *in vitro* NMR-Messungen danken.

Ein Dankeschön geht an Prof. Steffen Abel für die Überlassung der *pho2*-Mutanten.

Meinem Ehemann Rüdiger möchte ich ganz besonders danken. Danke, dass Du mich in schwierigen und erfreulichen Momenten stets begleitet hast. Danke für die zahlreichen Anregungen und die konstruktiven Diskussionen während der Erstellung dieser Arbeit. Auch danke ich Dir für das kritische und aufmerksame Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern ganz herzlich bedanken, die mir stets ihre volle Unterstützung in allen meinen Vorhaben gewährt haben.

Allen anderen, die zur Entstehung meiner Arbeit beigesteuert haben und die ich hier nicht namentlich genannt habe, sei auch gedankt!



## 7.9 Lebenslauf

Ralitza Danova-Alt, geboren am 24.02.1979 in Sofia, Bulgarien

Nationalität: bulgarisch

Familienstand: verheiratet, keine Kinder

seit 01.01.2008	Martin-Luther-Universität, Biozentrum der MLU, Halle/S. <i>wiss. Mitarbeiterin: pflanzliche Stoffwechselanalyse</i>
01.12.2006 bis 31.12.2007	BioSolutions GmbH, Halle/Saale <i>wiss. Mitarbeiterin: pflanzliche Stoffwechselanalyse</i>
01.2007 bis 04.2007	Universität Wageningen, NMR Centre, Niederlande <i>Forschungsaufenthalt: in vivo NMR an Pflanzenzellkulturen</i>
05.2006 bis 07.2006	Universität Zürich, Schweiz <i>Forschungsaufenthalt: Untersuchungen an isolierten Vakuolen</i>
10.2003 bis 11.2006	Martin-Luther-Universität, Biozentrum der MLU, Halle/S. <i>wiss. Mitarbeiterin: pflanzliche Stoffwechselanalyse</i> <i>DFG Stipendium (Graduierten Kolleg, 416)</i>
01.2002 bis 10.2003	Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg <i>HPLC-Analyse von Aminosäuren, Zuckern und org. Säuren, Stoffwechseluntersuchungen, Zellkultur; Stipendium für Ausländer der Max-Planck-Gesellschaft</i>
03.2001 bis 08.2001	Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Chemische Verfahrenstechnik <i>Erasmusstipendium für Diplomarbeit: Quantifizierung der Gradientenchromatographie</i>
11.2000 bis 01.2001	Universität für chemische Technologie und Metallurgie, Sofia, Bulgarien, Fakultät für Chemie und Systemingenieurwesen <i>Studienarbeit: Struktur und Funktion von Glykoproteinen - Isolierung von Hexosaminidase aus Sojabohnen</i>
08.2000 bis 09.2000	Nationalinstitut für Weintechnologie, Sofia, Bulgarien <i>Praktikum: Analyse von Weinen</i>
09.1996 bis 08.2001	Studium der Biotechnologie, Schwerpunkt chemische und pharmazeutische Biotechnologie, Universität für chemische Technologie und Metallurgie, Sofia, Bulgarien <i>Abschluss: Dipl.-Ing. Biotechnologie</i>
09.1993 bis 06.1996	„Vasil Levski Gymnasium“, Sofia, Bulgarien <i>Abschluss: allgemeine Hochschulreife; Förderstipendium für schulische Leistungen</i>

## Publikationsliste

- Danova-Alt R., Dijkema C., de Waard P., Köck M (*in press*) Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells – kinetic and  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance studies. *Plant Cell Environment*.

## Poster und Vorträge

- Danova-Alt R. (2007) Tracking of xenobiotic phosphite in plant cells by *in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR. Vortrag, Wageningen NMR Centre User Meeting, Wageningen, Niederlande, 29-30 November
- Danova-Alt R. (2007) *In vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR: Subzelluläre Lokalisationsstudien von xenobiotischem Phosphit in Pflanzen. Vortrag, Universität Leipzig, 2 November
- Danova-Alt R. (2007) *In vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR: Subzelluläre Lokalisationsstudien von xenobiotischem Phosphit in Pflanzen. Vortrag, DFG Graduiertenkolleg 416, Halle/S., 25 Oktober
- Danova-Alt R. (2006) Einfluss von xenobiotischem Phosphit auf Adaptionreaktionen gegenüber Phosphatmangel in *Solanum lycopersicum*. Vortrag, DFG Graduiertenkolleg 416, Freyburg/ Unstrut, 10-11 November
- Danova-Alt R. (2005) Einfluss von xenobiotischem Phosphit auf Adaptionreaktionen gegenüber Phosphatmangel in *Solanum lycopersicum*. Vortrag, DFG Graduiertenkolleg 416, Heidelberg, 03-05 November
- Danova-Alt R. (2004) Einfluss von Phosphit auf die Genexpression unter Phosphatmangel in Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Vortrag, DFG Graduiertenkolleg 416, Wandgräben, 26-27 November
- Danova-Alt R., Köck M. (2004) Phosphite influence on the phosphate starvation response in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Posterbeitrag Botanikertagung, Braunschweig

## **7.10 Eigenständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit,

- dass ich meine Dissertation selbstständig und ohne Zuhilfenahme anderer als der angegebenen Quellen erstellt habe,
- dass ich aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken in der Arbeit als solche kenntlich gemacht habe,
- dass ich an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung jemals ein Promotionsverfahren begonnen habe.

Halle (Saale), den 13. Januar 2009

Ralitza Danova-Alt