

**Identifikation von Transportern und Charakterisierung ihrer
Rolle im Nukleotidzucker- und Glucosinolat-Stoffwechsel
in *Arabidopsis thaliana***

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

zur

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

vorgelegt von

Inga Rollwitz
aus Gülzow

Mai 2007

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von Juni 2003 bis Mai 2007 am Botanischen Institut der Universität zu Köln anfertigt.

Berichterstatter: **Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge**
 Prof. Dr. Reinhard Krämer

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juli 2007

„When you have excluded the impossible, whatever remains, however improbable, must be the truth.“

Sherlock Holmes in *The Adventure of the Beryl Coronet*

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	V-VIII
1.	Einleitung	1
2.	Material- und Methoden	17
2.1.	Material	17
2.1.1.	Bezugsquellen für Chemikalien und Geräte	17
2.1.2.	Bakterien- und Hefestämme	17
2.1.2.1	<i>Escherichia coli</i>	17
2.1.2.2.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
2.1.2.3.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.1.3.	Vektoren	19
2.1.4.	Pflanzenmaterial	20
2.2.	Anzucht- und Kultivierungsmethoden	20
2.2.1.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
2.2.2.	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2.2.3.	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.2.3.1.	Anzucht auf Erde	23
2.2.3.2.	Sterilisation der Samen und <i>in vitro</i> -Anzucht auf Agarplatten	24
2.3.	Präparation und Analyse von DNA	25
2.3.1.	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	25
2.3.2.	Isolation von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis</i>	26
2.3.3.	Reinigung von DNA	27
2.3.4.	Agarosegelelektrophorese	28
2.3.5.	Quantifizierung von DNA	28
2.3.6.	Elution von DNA aus Agarosegelen	29
2.3.7.	Restriktion von DNA	29
2.3.8.	Ligation von DNA - Enden	29
2.3.9.	<i>Gateway</i> [®] -Klonierung	29
2.3.10.	Kapillartransfer von DNA (Southern Blot)	30
2.3.11.	Radioaktive Markierung von DNA	31
2.3.12.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.3.12.1.	<i>Colony</i> -PCR	33
2.3.12.2.	<i>Screening</i> -PCR zur Durchsicht transgener Pflanzenpopulationen	33
2.3.13.	Sequenzierung von DNA	34

2.4.	Transformationsmethoden	34
2.4.1.	Transformation von <i>E. coli</i>	34
2.4.1.1.	Herstellung TSS-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
2.4.2.	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	35
2.4.2.1.	Herstellung elektrokompeter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	35
2.4.3.	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	36
2.4.3.1.	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	36
2.4.4.	Transformation von <i>A. thaliana</i>	37
2.4.4.1.	β -Glucuronidase Nachweis in transgenen <i>A. thaliana</i> -Pflanzen	38
2.4.5.	Transformation von Zellen aus <i>in vitro</i> -Zellkultur	38
2.4.5.1.	Transformation von BY2-Tabak-Protoplasten	38
2.4.5.2.	Transformation von <i>A. thaliana</i> -Wurzelzellkultur	42
2.5.	Präparation und Analyse von RNA	43
2.5.1.	Isolation von RNA	43
2.5.2.	Quantifizierung von RNA	43
2.5.3.	RT-PCR	44
2.6.	Proteinbiochemische Methoden	44
2.6.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	44
2.6.2.	Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau	45
2.6.3.	Proteinfärbung mit Silbernitrat	46
2.6.4.	Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen (<i>Western Blot</i>)	46
2.6.5.	Immunologischer Nachweis von Proteinen	46
2.6.6.	Quantifizierung von Membranproteinen	47
2.6.7.	Expression und Gewinnung rekombinanter Membranproteine aus <i>S. cerevisiae</i>	48
2.6.8.	Reinigung von His-getagten Proteinen mittels Ni ²⁺ NTA-Affinitätschromatographie	48
2.6.9.	Reinigung des Phospholipids	49
2.6.10.	Rekonstitution von Membranproteinen	49
2.6.11.	Messung der Transportaktivität von Nukleotidzucker-Transportern	50
2.6.12.	Messung der Transportaktivität pflanzlicher Gallensäure-Transporter-Homologe	51
2.7.	Internetadressen	52

	Ergebnisse	54
3.	Funktionelle Charakterisierung von Transportern der AtKT-Familie in <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
3.1.	Expressionsstudien an ausgewählten Mitgliedern der KT-Genfamilie	54
3.1.1.	Sequenzanalysen auf DNA- und Proteinebene	54
3.1.2.	Expressionsanalyse auf Basis von <i>Microarray</i> -Daten	57
3.1.3.	Expressionsanalyse mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR	59
3.1.4.	Expressionsanalyse mit Hilfe von Promotor:: <i>GUS</i> - Fusionen	60
3.2.	Analyse von T-DNA-Insertionsmutantenlinien, in denen ausgewählte <i>KT</i>-Gene betroffen sind	62
3.2.1.	Isolierung homozygoter T-DNA-Insertionsmutantenpflanzen	62
3.2.2.	Verifizierung des Genausfalls mittels RT-PCR	63
3.2.3.	Bestimmung der Anzahl der Insertionen mittels <i>Southern-Blot</i>	64
3.2.4.	Phänotypische Charakterisierung von <i>KT</i> -T-DNA-Insertionsmutanten	65
3.3.	Intrazelluläre Lokalisation ausgewählter <i>KT</i>-Proteine	67
3.4.	Heterologe Expression von <i>KT</i>-Proteinen in <i>S. cerevisiae</i>	69
3.4.1.	Aufreinigung der heterolog produzierten <i>KT</i> -Proteine über Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	70
3.5.	Transportexperimente zum Nachweis der Aktivität und zur Analyse der Substratspezifität von <i>KT</i>-Transportern	71
3.6.	Transportexperimente zur Bestimmung kinetischer Parameter für <i>AtKT1</i>	74
4.	Funktionelle Charakterisierung der <i>Bile-Acid</i>-Transporter (<i>BAT</i>)-Familie in <i>Arabidopsis thaliana</i>	78
4.1.	Expressionsstudien der Mitglieder der <i>BAT</i>-Genfamilie	78
4.1.1.	Sequenzanalysen auf DNA- und Proteinebene	78
4.1.2.	Expression der <i>BAT</i> -Gene laut <i>GENEVESTIGATOR</i>	81
4.1.3.	Expressionsanalyse mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR	82
4.1.4.	Expressionsanalyse mit Hilfe von Promotor:: <i>GUS</i> - Fusionen	83
4.1.5.	Analyse der Coexpression von Genen in <i>Arabidopsis</i>	85
4.2.	Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten, die in <i>BAT</i>-Genen betroffen sind	88
4.2.1.	Isolierung homozygoter T-DNA-Insertionsmutantenpflanzen	88

4.2.2.	Verifizierung des Genausfalls mittels RT-PCR	89
4.2.3.	Bestimmung der Anzahl der Insertionen mittels <i>Southern-Blot</i> -Analyse	90
4.2.4.	Phänotypische Charakterisierung von <i>BAT</i> -T-DNA-Insertions - Mutantenlinien	91
4.2.5.	Herstellung von <i>BAT</i> -Doppel-und Tripel- <i>Knock out</i> -Linien	93
4.2.6.	Phänotypische Charakterisierung von T-DNA-Insertions- Mutantenlinien nach Ausfall mehrerer <i>BAT</i> -Gene	96
4.3.	Intrazelluläre Lokalisation der <i>BAT</i>-Proteine	97
4.4.	Heterologe Expression von <i>BAT</i>-Genen in <i>S. cerevisiae</i>	99
4.4.1.	Aufreinigung der heterolog synthetisierten <i>BAT</i> -Proteine über Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	100
4.5.	Transportexperimente zur Identifizierung des Substrates pflanzlicher <i>BAT</i>-Proteine	101
4.5.1.	Herstellung von radioaktiv markiertem Ketomethylthiobutyrat (KMTB)	102
4.5.2.	Transportexperimente mit ³⁵ S-KMTB als putativem Substrat pflanzlicher <i>BAT</i> -Proteine	103
4.6.	Untersuchungen der Funktion von <i>BAT</i>-Proteinen durch Komplementation von bakteriellen Mutanten	106
5.	Diskussion	112
5.1.	Funktionelle Charakterisierung von Transportern der <i>AtKT</i>-Familie in <i>Arabidopsis thaliana</i>	112
5.2.	Funktionelle Charakterisierung der <i>Bile Acid</i>-Transporter-Familie in <i>Arabidopsis thaliana</i>	129
6.	Zusammenfassung	141
7.	Literaturverzeichnis	143
8.	Anhang	153
8.1.	Primersequenzen	153
8.2.	Klonierungen	157
8.3.	DNA- und Proteinmarker	159

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% v/v	Volumenprozent
% w/v	volumenbezogenes Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μF	Mikrofarad
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
35S	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> 35S-Promotor
3-PGA	3-Phosphoglycerat
A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
AtUTR	UDP-Galactose-Transporter aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
BCAT	<i>Branched-chain Aminotransferase</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat
Beq	Becquerel
BFA	Brefeldin A
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> , Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
BY2	Tabakzellkultur <i>Bright yellow 2</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
CDG-IIc	<i>Congenital Disorder of Glycosylation</i> IIc, angeborene Glycosylierungsdysfunktion
cDNA	komplementäre DNA
CHO-Lec8	<i>Chinese Hamster Ovary celline</i> , UDP-Galactose-Transportdefiziente Zelllinie
CI	Chloroform : Isoamylalkohol
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
CMP	Cytidinmonophosphat
CMP-Sia	CMP-Sialylsäure
Col-O	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia
cpm	<i>counts per minute</i> , radioaktive Zerfälle pro Minute
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase
d	Tag(e)
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
DM	β-Dodecylmaltosid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	2-Desoxyribonukleosidtriphosphat
dATP	2`-Desoxyadenosin-5`-triphosphat
dCTP	2`-Desoxycytidin-5`-triphosphat
dGTP	2`-Desoxyguanosin-5`-triphosphat
dTTP	2`-Desoxythymidin-5`-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Bis-(Aminoethyl)-Glycoether-N,N,N',N',-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>expressed sequence tag</i>
evtl.	eventuell
g	Gramm
G	Guanin
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GDP-Ara	Guanidindiphosphat-Arabinose
GDP-Fuc	Guanidindiphosphat-Fucose
GDP-Glc	Guanidindiphosphat-Glucose
GDP-Man	Guanidindiphosphat-Mannose
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
Gluc, Glc	Glucose
GMP	Guanosinmonophosphat
GONST1 to 5	<i>Golgi Nucleotide Sugar Transporter 1 to 5</i> , Golgi-lokalisierte Nukleotidzuckertransporter 1 - 5
GPT	Glucose 6-phosphat/Phosphat-Translokator
GUS	β- Glucuronidase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAA	Indol-3-essigsäure (Auxin)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
K	Kalium
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
KD	Unterfamilie der pPT/NST-homologen Proteine
kDa	kilo Dalton
KMTB	Ketomethylthiobutytrat = Methylthiooxobutytrat (MSOB)
KMTP	Ketomethylthiopentanat
KOH	Kaliumhydroxid
KT	Unterfamilie der pPT/NST-homologen Proteine
KVAG	Unterfamilie der pPT/NST-homologen Proteine
kv	Kilovolt
l	Liter
LB	<i>left border</i> , linke Begrenzungssequenz der T-DNA
LB	Luria-Bertani-Medium zur Kultivierung von Bakterien
m	Milli
M	Molar
MAM	Methylthioalkylmalat-Synthase
mA	Milliampere
MCDK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i> , UDP-Gal-Transport-defiziente Zelllinie

MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM1	definiertes Minimalmedium zur Kultivierung von <i>C. glutamicum</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA, Boten-RNA
ms	Millisekunde
MS	Murashige-Skoog-Salz-Vitamin-Gemische für Pflanzenmedien
MSOB	Methylthiooxobutyrat (siehe KMTB)
NAA	Napthylelessigsäure
Na	Natrium
NAD(P)	Nikotinamid-Adenin-dinukleotid(phosphat)
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Center</i>
NBT	Nitrotetrazoliumblau
ng	Nanogramm
Ni ²⁺ -NTA	<i>Ni²⁺-nitrilotriacetic Acid</i> , Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Nr.	Nummer
NST	<i>Nucleotide Sugar Transporter</i> , Nukleotidzuckertransporter
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
pBSC	Vektor pBluescript
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phospho <i>eno</i> lpyruvat
P _i	anorganisches Phosphat
PLP	Pyridoxalphosphat
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPT	Phospho <i>eno</i> lpyruvat/Phosphat-Translokator
pPT	plastidärer Phosphattranslokator
PTh	plastidärer Phosphattranslokator-homolog
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RB	<i>right border</i> , rechte Begrenzungssequenz der T-DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SC	<i>Synthetic Complete Medium</i> , Hefe-Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SSC	<i>Sodium Chloride/Sodium Citrate Buffer</i> , Natriumchlorid/citrat-Puffer

T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	<i>Tris Buffer Saline/Tween20/Triton X-100</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 und Triton X-100
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	Transfer-Desoxyribonukleinsäure
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N' –Teramethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
TMH	Transmembranhelix
TPT	Triosephosphat/Phosphat-Translokator
Tricin	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	Octylphenolpoly-(Ethylenglycolether) ₁₀
U	unit(s), Enzymeinheit für Substratumsatz in [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$]
ü.N.	über Nacht
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Glucose	Uridindiphosphat-Glucose
UDP-Ara	Uridindiphosphat-Arabinose
UDP-Gal	Uridindiphosphat-Galactose
UDP-GalA	Uridindiphosphat-Galacturonsäure
UDP-GalT1 & 2	UDP-Galactose Transporter 1 & 2
UDP-Glc	Uridindiphosphat-Glucose
UDP-GlcA	Uridindiphosphat-Glucuronsäure
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat-N-acetyl-glucuronsäure
UDP-Xyl	Uridindiphosphat-Xylose
UMP	Uridinmonophosphat
UV	Ultraviolett
usw.	und so weiter
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
xg	<i>Times Gravity</i> , -fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid
X-Gluc	5-Brom-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronid
XPT	Xylulose-5-phosphat/Phosphattranslokator
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose Medium</i> , Hefe-Vollmedium
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Transport ist eine essentielle Funktion biologischer Membranen.

Biologische Membranen sind für das Leben von grundlegender Bedeutung. Sie sind in Signalperzeptions- und Energieumwandlungsprozesse involviert, legen Zellgrenzen fest, unterteilen Zellen in diskrete Kompartimente und erlauben somit das gleichzeitige Ablaufen komplexer, unterschiedlicher Reaktionsfolgen innerhalb einer Zelle. Für das Überleben und Wachstum von Zellen ist ein kontinuierlicher Einstrom von Nährstoffen wie Zucker, Aminosäuren und Ionen sowie ein Ausstrom von Stoffwechselendprodukten essentiell. Eine elementare Aufgabe von Biomembranen liegt demnach darin, die Flussgeschwindigkeiten einer Vielzahl von Stoffen zwischen der Zelle und ihrer Umgebung sowie zwischen den Kompartimenten einer Zelle zu kontrollieren. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, enthalten biologische Membranen spezifische Proteine, die den Transport von Stoffen durchführen. Dabei wird je nach Transportmechanismus und Energieabhängigkeit zwischen Pumpen, Kanälen und Carriern bzw. Transportern unterschieden. Während als Pumpen ATPasen bezeichnet werden, die Ionen unter ATP-Verbrauch durch die Membran entgegen eines Konzentrationsgradienten transportieren, bilden Kanäle Poren, durch die Stoffe entsprechend ihrer elektrochemischen Potentialdifferenz diffundieren. Transporter operieren wie Enzyme, wobei sie ihr Substrat auf einer Seite der Membran selektiv binden, eine Konformationsänderung vollziehen und dabei eine Verlagerung des Substrats auf die andere Seite der Membran bewirken. Dieser Prozess kann primär aktiv, also ATP-getrieben, sein oder sekundär aktiv, indem ein Transport entlang eines Membrangradienten erfolgt. Je nach Anzahl der verlagerten Substrate und ihrer Transportrichtung unterscheidet man weiterhin zwischen Uniportern, Antiportern und Symportern. Während der Uniport den Transport nur eines Substrats bezeichnet, bedeutet ein Anti- bzw. Symport die Verlagerung jeweils zweier Substrate in die entgegengesetzte bzw. gleiche Richtung.

Komplexe Stoffwechselwege, wie die Synthese von Glycoproteinen oder Zellwandbestandteilen, schließen den Transport von Intermediaten in verschiedene Zellkompartimente ein.

Der Ablauf vieler komplexer Stoffwechselwege erfordert das Zusammenwirken verschiedener Kompartimente der Zelle. Als verbindende Elemente zwischen den Kompartimenten ist die Aktivität von Transportern von essentieller Bedeutung. Ein Beispiel hierfür stellt die Synthese von Glycokonjugaten und die diesen Prozessen vorgeschalteten Reaktionen in *A. thaliana* dar (Abb. 1).

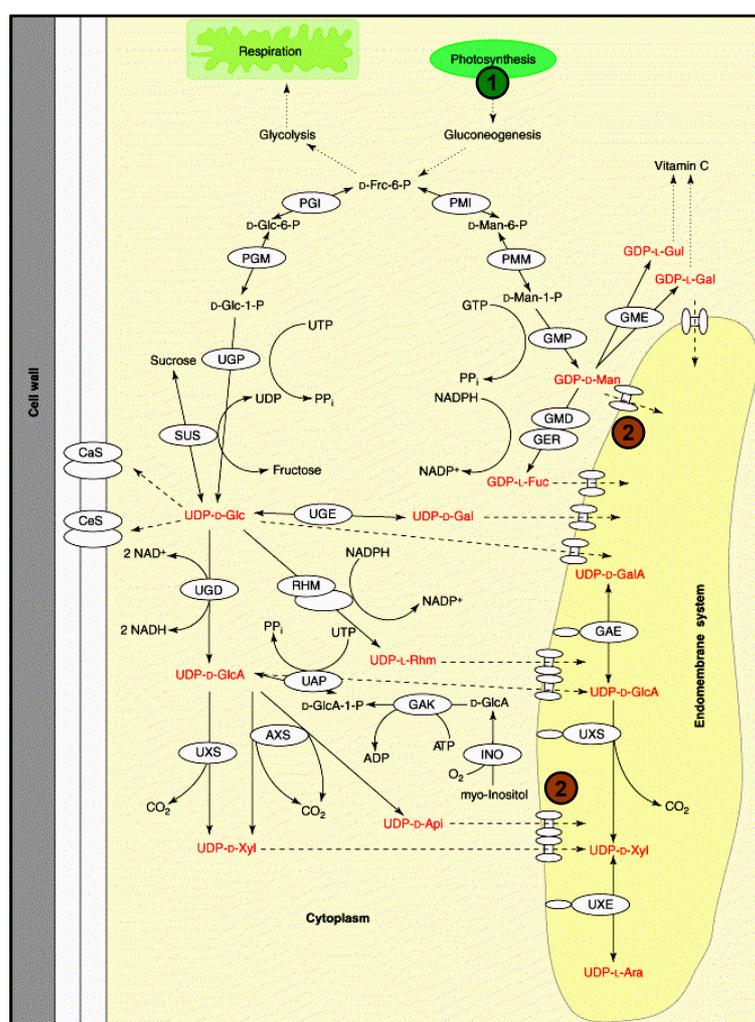


Abb. 1: Schematische Darstellung der Kompartimentierung von der Synthese von Glycokonjugaten im Endomembransystem vorgeschalteten Reaktionen in *Arabidopsis thaliana* (nach Seifert, 2004). Die notwendigen Transportprozesse aus den Chloroplasten ins Cytoplasma (1) und vom Cytoplasma ins Endomembransystem (2) sind angedeutet. PMI: Phosphomannose-Isomerase; PGI: Phosphoglucose-Isomerase; PMM: Phosphomannomutase; PGM: Phosphoglucomutase; UGP: UDP-Glucose-Pyrophosphorylase; GMP: GDP-Mannose-Pyrophosphorylase; UAP: UDP-Glucuronsäure-Pyrophosphorylase; SUS: Saccharose-Synthase; CaS: Kalllose-Synthase; CeS: Zellulose-Synthase; UXS: UDP-Xylose-Synthase; UXE: UDP-Xylose-Epimerase; UGE: UDP-Glucose-Epimerase; UGD: UDP-Glucose-Dehydrogenase; RHM: Rhamnose-Synthase; GME: GDP-Mannose-Epimerase; GMD: GDP-Mannose-Dehydratase; GAE: UDP-Glucuronsäure-Epimerase; AXS/UXS: UDP-Apiose/UDP-Xylose-Synthase; GER: GDP-Keto-Desoxy-Mannose-Epimerase/Reduktase; INO: Inositol-Oxygenase; GAK: Glucurono-Kinase

Ausgehend vom Export des photosynthetisch fixierten Kohlenstoffs in Form von Triosephosphaten aus dem Chloroplasten erfolgt zunächst die Synthese von Zuckern -bzw. Zuckerphosphaten, die anschließend durch eine Verknüpfung mit Nukleotiden aktiviert werden. Diese Synthese von Nukleotidzuckern findet im Cytosol statt. Da die Enzyme, die Nukleotidzucker als Substrate für Glycosylierungen und die Synthese von Zellwandpolysacchariden verwenden, jedoch im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat lokalisiert sind, muss ein Transport derselben vom Cytosol in das Endomembransystem erfolgen. Somit sind die Transportaktivitäten plastidärer Phosphattranslokatoren (pPTs) und endomembranständiger Nukleotidzuckertransporter (NSTs) für den Ablauf dieser Reaktionsfolge notwendig.

Phosphattranslokatoren sind für den Transport von Kohlenstoffverbindungen über die innere Chloroplastenmembran essentiell.

Die pflanzlichen pPT-Proteine sind in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten und nicht-grünen Plastiden lokalisiert und katalysieren den strikten Austausch phosphorylierter C3-, C5- und C6-Kohlenstoffverbindungen mit anorganischem Phosphat (Flügge, 1999; Weber, 2004). Im Genom von *Arabidopsis thaliana* kodieren sechs Gene für funktionelle plastidäre Phosphattranslokatoren (Knappe *et al.*, 2003a). Diese können aufgrund von Sequenzhomologien und anhand ihrer verschiedenen Substratspezifitäten in vier Klassen unterteilt werden. Der Triosephosphat/Phosphat-Translokator (TPT) repräsentiert den ersten, auf molekularer Ebene charakterisierten, plastidären Phosphattranslokator (Flügge *et al.*, 1989). Seine Hauptaufgabe besteht in dem Export des photosynthetisch fixierten Kohlenstoffs in Form von Triosephosphaten aus dem Chloroplastenstroma in das Cytosol während der Lichtphase (Flügge, 1999).

Die zweite Klasse der Phosphoenolpyruvat/Phosphat-Translokatoren (PPT) akzeptiert ausschließlich C3-Verbindungen, wie 2-PGA und PEP, als Substrate (Fischer *et al.*, 1997). Die physiologische Funktion der PPTs liegt hauptsächlich in der Versorgung der Plastiden mit PEP, das als Precursor in den Shikimatweg eingespeist wird und somit der Synthese aromatischer Aminosäuren und einer Vielzahl von Sekundärmetaboliten dient (Herrmann & Weaver, 1999).

Der Transporter der dritten pPT-Klasse der Xylulose-5-Phosphat/Phosphat-Translokatoren (XPT) zeichnet sich durch ein breiteres Substratspektrum aus, das neben Xylulose-5-Phosphat auch Triosephosphate und 3-PGA umfasst. Die

vorgeschlagene Funktion von AtXPT liegt in der Versorgung des plastidären Pentosephosphat-Wegs mit cytosolischen Kohlenstoffgerüsten in Form von Xylulose-5-Phosphat, insbesondere unter Bedingungen eines hohen Bedarfs an Intermediaten dieses Weges (Eicks *et al.*, 2002).

Die Transportproteine der vierten Klasse der Glucose-6-Phosphat/Phosphat-Translokatoren (GPT) weisen ein noch breiteres Substratspektrum als der XPT auf, indem sie zusätzlich den Import von Glucose-6-Phosphat in nicht-grüne Plastiden katalysieren, wo dieses als Precursor für die Fettsäurebiosynthese, den oxidativen Pentosephosphat-Weg und die Stärkesynthese dienen kann (Kammerer *et al.*, 1998). Ferner scheint der GPT von essentieller Bedeutung für die Gametogenese in *A. thaliana* zu sein, deren genaue Ursachen jedoch noch nicht vollständig geklärt sind (Niewiadomski *et al.*, 2005).

Die Phosphattranslokatoren (pPT) sind Transporter der *Drug/Metabolite* Superfamilie. Diese besteht wiederum aus 14 Unterfamilien, für deren Mitglieder der Transport von medizinisch wirksamen Substanzen, Nährstoffen und Stoffwechselmetaboliten über Zellgrenzen oder intraorganellare Membranen beschrieben ist (Jack *et al.*, 2001). Sechs Unterfamilien, wie die Glucose/Ribose- und L-Rhamnose-Transporter, wurden bisher nur in Prokaryoten identifiziert, während Mitglieder von acht Familien nur in Eukaryoten gefunden wurden.

Nukleotidzuckertransporter sind für den Transport aktivierter Zucker in das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat verantwortlich.

Zu den eukaryotischen Familien der *Drug/Metabolite*-Superfamilie zählt neben den pPTs auch die Gruppe der Nukleotidzuckertransporter (*Nucleotide Sugar Transporters*; NSTs). Die evolutionäre Verwandtschaft insbesondere dieser beiden Familien spiegelt sich sowohl in strukturellen als auch in mechanistischen Ähnlichkeiten wider. Als Substrate werden in einem obligatorischen 1:1 Antiportmechanismus jeweils phosphorylierte Verbindungen transportiert, wobei die Transporter als Homodimere agieren (Martinez-Duncker *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 1989; Hirschberg, Robbins & Abeijon, 1998). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wurden die Transportproteine beider Familien in der pPT/NST-Familie zusammengefasst (Ward *et al.*, 2001; Knappe *et al.*, 2003a). Wichtige Unterscheidungsmerkmale

bestehen hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation und der im Einzelnen transportierten phosphorylierten Substrate.

Für Nukleotidzuckertransporter wird ein 10 Transmembrandomänenmodell mit ins Cytosol ragenden N- und C-Termini vorgeschlagen (Eckhardt *et al.*, 1999). Sie sind in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparates lokalisiert. Dort vermitteln sie den Transport von Nukleotidzuckern aus dem Cytosol in das Lumen des ER bzw. des Golgi-Apparates im Gegentausch mit dem korrespondierenden lumenalen Nukleotidmonophosphat (Hirschberg, Robbins & Abeijon, 1998). Im Lumen des Endomembransystems befindliche Glycosyltransferasen nutzen diese aktivierten Zucker als Substrate zur Modifizierung von Glycoproteinen, Glycolipiden und Proteoglycanen. Die hierbei abgespaltenen Nukleotiddiphosphate werden von ebenfalls lumenal lokalisierten Diphosphatasen in Nukleotidmonophosphate umgewandelt, die den NSTs als Gegentauschsubstrat dienen (Abb. 2).

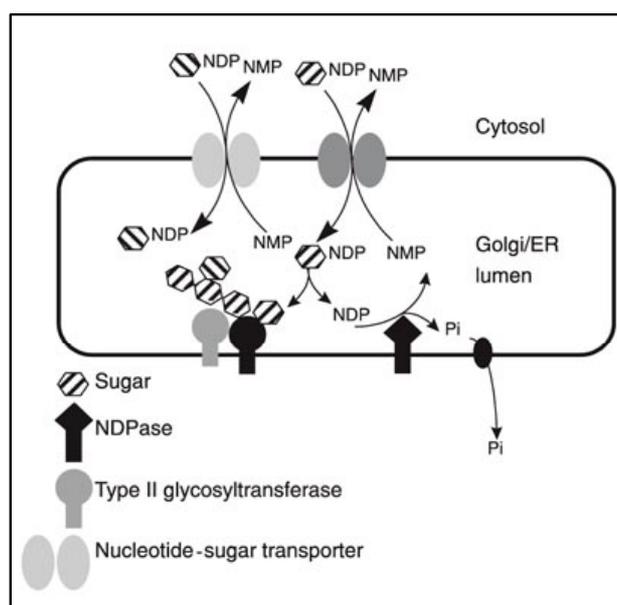


Abb. 2: Schematische Darstellung der Transportaktivität von Nucleotidzuckertransportern.

Modell des generellen Transportmechanismus` von NSTs (nach Handford *et al.*, 2006). Aktivierte Zucker (NDP-) werden durch spezifische Nucleotidzuckertransporter vom Cytosol in das ER/Golgi-Lumen importiert, wo Glycosyltransferasen die Verknüpfung des Zuckeranteils an ein Glycokonjugat katalysieren. Das resultierende Nucleotiddiphosphat wird durch eine Diphosphatase (NDPase) in ein Nucleotidmonophosphat (NMP) und ein anorganisches Phosphat (Pi) gespalten. Das NMP wird im Austausch mit einem eintransportierten Nucleotidzucker in das Cytosol ausgeschleust, während für den Export von Pi die Existenz eines spezifischen Transporters vermutet wird.

Die Notwendigkeit von NSTs als verbindendem Element zwischen dem Cytosol und den Glycosylierungsprozessen im Endomembransystem ergibt sich aus dem Befund, dass die Synthese fast aller Nukleotidzucker im Cytosol erfolgt (Bonin *et al.*, 1997). Dabei fungieren GDP-Mannose und vor allem UDP-Glucose als Ausgangssubstanzen für verschiedenste Interkonversionsreaktionen, die nur teilweise im Golgi-Apparat selbst stattfinden können (Seifert, 2004; Abb. 1). Somit ergibt sich ein vielschichtiges Netzwerk von der Synthese, über eine Vielzahl von Umwandlungsreaktionen in den einzelnen Kompartimenten bis hin zur Verwendung von Nukleotidzuckern als Substrate für die Polymerisierung von Disacchariden, Glycogen, Stärke, Cellulose und komplexeren extrazellulären Polysacchariden.

Auf die bedeutende Rolle, die diese Glycokonjugate für das Wachstum und die Entwicklung von Organismen im Allgemeinen spielen, weisen die Auswirkungen von Modifikationen der Transportaktivität von NSTs hin. Da diese in den letzten Jahren in allen Eukaryoten wie Säugern, Hefen, Insekten und Würmern identifiziert und charakterisiert werden konnten (Miura *et al.*, 1996; Gao & Dean, 2000; Goto *et al.*, 2001; Berninsone *et al.*, 2001), liegt eine Vielzahl von Informationen über derartige Dysfunktionen in den einzelnen Organismen vor. So kann eine erhöhte Aktivität des menschlichen UDP-Galactose-Transporters zu einer verstärkten Expression von Galactose-enthaltenden Markern für Dickdarmkrebs führen (Kumamoto *et al.*, 2001). Doch auch verminderte Aktivitäten von NSTs können schwerwiegende Folgen nach sich ziehen. Das Krankheitsbild des kohlenhydratdefizienten Glycoproteinsyndroms CDG-IIc ist durch schwere geistige Retardierung, Minderwuchs und ständig wiederkehrende bakterielle Infektionen gekennzeichnet und wird durch den vollständigen Verlust der GDP-Fucose-Transportaktivität ausgelöst (Lübke *et al.*, 1999; Lühn *et al.*, 2001).

Die Vorhersage von Substraten für die Nukleotidzucker-Transporter auf Grundlage von Sequenzvergleichen scheint bisher nicht möglich zu sein. So konnte bislang für keinen UDP-Zucker-transportierenden NST ein charakteristisches Motiv identifiziert werden. Da weiterhin festzustellen ist, dass nahe verwandte NSTs, wie der menschliche UDP-N-Acetylglucosamin-Transporter und der menschliche UDP-Galactose-Transporter, unterschiedliche Substrate transportieren, während die gleichen Substrate von Proteinen akzeptiert werden, die nur geringe Ähnlichkeiten aufweisen wie der humane und der aus *Kluyveromyces lactis* stammende UDP-N-

Acetylglucosamin-Transporter, geht man davon aus, dass die Substratspezifität nicht aus der Primärsequenz abgeleitet werden kann (Caffaro & Hirschberg, 2006). Allerdings scheint es möglich, Voraussagen hinsichtlich der Spezifität der Zucker-verknüpften Base zu treffen, weil keine NSTs bekannt sind, die UDP- und GDP-gebundene Zucker transportieren (Martinez-Duncker *et al.*, 2003). Darüber hinaus gilt als gesichert, dass der Nukleotidanteil die initiale Bindung der Nukleotidzucker vermittelt, der Zuckeranteil jedoch bestimmt, ob ein Transport des gesamten Moleküls erfolgt (Berninsone & Hirschberg, 2000).

Die Identifizierung von funktionell bedeutenden Motiven gelingt nur durch gezielte experimentelle Ansätze. So führte die detaillierte Untersuchung eines NSTs durch eingeführte Punktmutationen zur Entdeckung des GALNK-Motivs nahe des C-Terminus` von GDP-Mannose-Transportern, das für deren Transportaktivität von entscheidender Bedeutung ist (Gao *et al.*, 2001).

Zusammenfassend muss darauf hingewiesen werden, dass trotz der besonderen Bedeutung der Nukleotidzucker und ihrer Transporter für die Synthese von Zellwandbausteinen wie Hemicellulose und Pektin (Lerouxel *et al.*, 2006) bisher keine NST-Mutanten in Pflanzen beschrieben worden sind. Fast alle bekannten Eigenschaften von NSTs wurden durch intensive Studien an Säugerproteinen gewonnen.

Phosphattranslokatoren und Nukleotidzuckertransporter weisen Ähnlichkeiten zu bisher nicht charakterisierten Transportern auf, deren Funktion in *A. thaliana* nicht verstanden ist.

Interessanter Weise existieren im *Arabidopsis*-Genom weitere Gene, deren Produkte Ähnlichkeiten zu den Transportern der pPT und NST-Gruppe aufweisen. Neben den genannten, nachweislich funktionellen Mitgliedern der pPT-Familie wurden zehn pPT-Pseudogene und achtundzwanzig pPT-homologe Membranproteine (PTh) identifiziert (Knappe *et al.*, 2003a). Diese PTh-Proteine weisen eine 20-25%ige Aminosäuresequenzidentität zu den pPTs auf. Außer einigen Glycin- und Prolinresten ist die Konservierung eines Lysinrests an Position 273 (bezogen auf die Nummerierung der ersten reifen TPT-Sequenz aus Spinat) besonders auffällig. Da die pPT-Substrate unter physiologischen Bedingungen als divalente Anionen vorliegen, könnten positiv geladene Aminosäurereste wie Lysin an Bindung und Transport derselben beteiligt sein. Für K273 konnte experimentell eine Mitwirkung an

der Bindung des Inhibitors 4,4'-Diisothiocyano-Stilben-2,2'-Disulfonat (DIDS) gezeigt werden (Fischer *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 1990) und ein gezielter Aminosäureaustausch dieses Restes hin zu Glutamin resultierte in einem vollständigen Verlust der TPT-Transportaktivität in Spinat (B. Kammerer, K. Fischer, U.-I. Flügge, unveröffentlichte Daten).

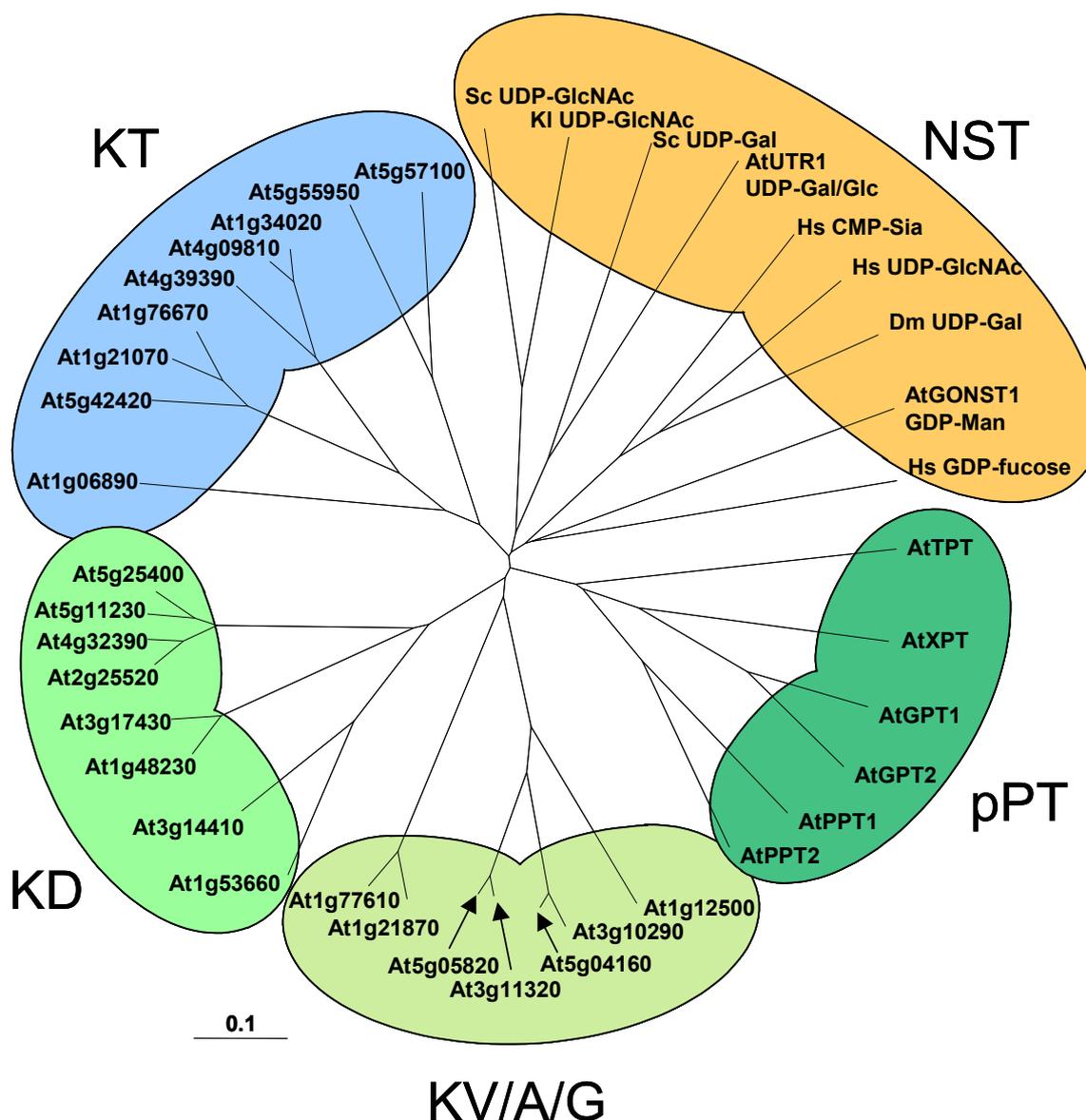


Abb. 3: Graphische Darstellung des Ergebnisses eines Sequenzvergleichs von Proteinen der NST- und pPT-Familie mit ähnlichen Transportproteinen aus *A. thaliana*. Entsprechend der Gruppierung nach der Clusteranalyse und der gefundenen Sequenzübereinstimmung (siehe Text) wurde die Benennung der Gruppen als KD-, KT- und KVAG-Familie vorgenommen. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Kl: *Kluyveromyces lactis*; At: *Arabidopsis thaliana*; Hs: *Homo sapiens*; Dm: *Drosophila melanogaster*

Aufgrund dieser Befunde wurde K273 als putative Substratbindestelle für die pPTs vorgeschlagen (Knappe *et al.*, 2003a). Im Falle der PTh-Proteine scheint außerdem der an Position 274 dem Lysin folgende Aminosäurerest von besonderer Bedeutung zu sein, denn dieser Rest ist spezifisch für bestimmte PTh-Proteine und wurde zu ihrer Einteilung in Familien herangezogen.

Demnach können die PTh-Proteine je nach spezifischem Dipeptid an Position 273/274 in drei Familien gegliedert werden: die KD-, die KV/A/G- und die KT-Familie. Der Vergleich der gesamten Aminosäuresequenz der PTh-Proteine aus *A. thaliana* zeigt ebenfalls diese Gruppierung in drei unterschiedliche Familien und bestätigt somit die Einteilung (Abb. 3). Weiterhin wurde vorgeschlagen, dass diese Dipeptidfolge auch für PTh-Proteine eine putative Substratbindestelle darstellt, wobei der zweite Aminosäurerest eine Unterscheidung der Substratspezifitäten bedingt (Knappe *et al.*, 2003a).

Dabei ist die Vorhersage von möglichen Substraten von Transportern aufgrund von Sequenzvergleichen, wie am Beispiel der NST beschrieben, oft ungenau und nur der experimentelle Nachweis der Transportfunktion kann Aufschluss über die vom Carrier tatsächlich translozierten Substrate geben.

Um die Funktion von pPT-homologen Proteinen in *Arabidopsis thaliana* zu entschlüsseln, sollte daher innerhalb dieser Arbeit eine detaillierte funktionelle Charakterisierung von Proteinen der KT-Familie durchgeführt werden. Von zentralem Interesse war dabei, welche Substrate von den Transportern der KT-Familie transportiert werden. Als Arbeitshypothese wurde der Transport von Nukleotidzuckern definiert. Dies begründet sich aus dem Vorschlag der Funktion des zur KVAG Gruppe zählenden Transporters GONST5 (At1g21870) als GDP-Mannose-Transporter (Handford *et al.*, 2004). Dieses Protein gehört zu einer Familie von zu AtGONST1-homologen Proteinen in *A. thaliana*.

Über Sequenzähnlichkeiten mit dem Hefe-GDP-Mannose-Transporter und dem humanen UDP-Galactose-Transporter konnten mit den *Arabidopsis*-Proteinen GONST1 und UTR1 die ersten beiden pflanzlichen NSTs identifiziert werden (Baldwin *et al.*, 2001; Norambuena *et al.*, 2002). AtGONST1 ist ein ubiquitär exprimierter, monospezifischer GDP-Mannose-Transporter, der seine Lokalisierung im Golgi-Apparat hat. Im Gegensatz dazu ist AtUTR1 ein multispezifischer NST, der sowohl UDP-Galactose als auch UDP-Glucose als Substrate akzeptiert. Neuere Untersuchungen ergaben, dass AtUTR1 im ER lokalisiert und dort in die

Mechanismen der Qualitätskontrolle von Glycoproteinen involviert ist (Reyes *et al.*, 2006). Ausgehend von diesen beiden NSTs konnte mit AtUTR2 ein zweiter UDP-Gal-Transporter sowie eine ganze Familie von GONST1-homologen Proteinen in *A. thaliana* gefunden und charakterisiert werden (Norambuena *et al.*, 2005; Handford *et al.*, 2004). Demnach sind GONST2-5 zwar in der Lage, eine GDP-Mannose-Transport-defiziente Hefemutante zu komplementieren, doch nur für GONST2 gelang ein weiterer indirekter Nachweis der Transportaktivität für diesen Nukleotidzucker (Handford *et al.*, 2004).

Neben GONST5 als Mitglied der KVAG-Familie wurde für ein weiteres Mitglied dieser Gruppe sowie für ein Mitglied der KT-Familie die Funktion als Nukleotidzucker-Transporter gezeigt. Die als UDP-GalT1 (At1g77610) und UDP-GalT2 (At1g76670) bezeichneten Transporter gehören der KVAG bzw. der KT-Familie an und wurden durch Komplementation einer Galactosetransport-defizienten Säuger-Zelllinie mit einer *Arabidopsis*-cDNA-Bank identifiziert (Bakker *et al.*, 2005). Nach ihrer Überexpression im Hefesystem erfolgte der direkte Nachweis des Transports von radioaktiv markiertem UDP-Gal in isolierte Hefe-Golgi-Vesikel.

Somit scheint die Einteilung der pPT-homologen Familien sich zwar nicht auf unterschiedliche Substratspezifitäten zu gründen, doch die Frage nach den Substraten der pPT-homologen Proteine lässt sich nun beantworten.

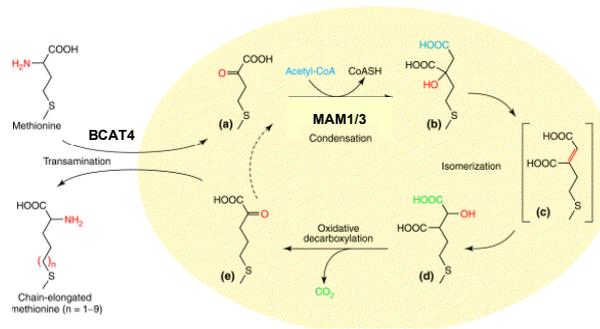
Dennoch bleiben wichtige Fragen ungeklärt, die im Rahmen dieser Arbeit anhand einer detaillierten funktionellen Charakterisierung von Proteinen der KT-Familie beantwortet werden sollten. Sind auch weitere Proteine der KT-Familie UDP-Galactose-Transporter oder weisen sie andere Substratspezifitäten auf? Wo sind die KT-Proteine in der pflanzlichen Zelle lokalisiert? Kann mit Hilfe ihres Expressionsmusters oder einer Analyse von *Knock out*-Mutanten eine genaue physiologische Funktion in *A. thaliana* abgeleitet werden?

Während der Synthese von Glucosinolaten ist der Transport von Intermediaten in verschiedene Kompartimente der pflanzlichen Zelle notwendig.

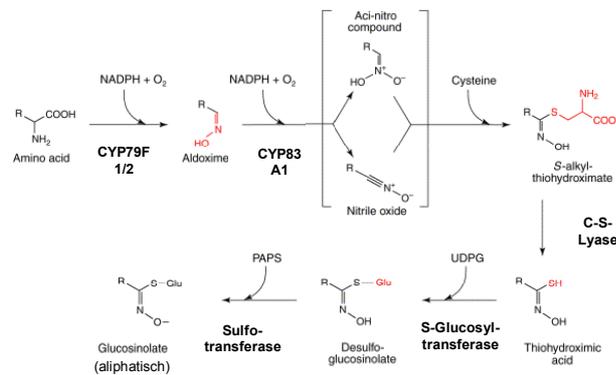
Der Biosyntheseweg für aliphatische Glucosinolate in *A. thaliana* stellt ein weiteres Beispiel für eine Aufteilung eines komplexen Stoffwechselwegs auf verschiedene Kompartimente der Zelle dar.

Glucosinolate, auch Senfölglycoside genannt, sind Stickstoff- und Schwefelenthaltende pflanzliche Sekundärmetabolite, die fast ausschließlich in Pflanzen der Familie der *Brassicaceae* vorkommen (Wittstock & Halkier, 2002). Ihre Grundstruktur besteht aus einem N-Hydroximosulfatester, der mit einem Thioglucose-Rest und einer variablen Seitenkette verbunden ist. Sie sind Bestandteil des binären Glucosinolat-Myrosinase-Systems, welches bei Verwundung von Pflanzengewebe aktiviert wird (Grubb & Abel, 2006). Die zweite Hälfte des Systems, der Myrosinase-Teil, besteht aus Thioglucosidasen, die eine Abspaltung des Glucose-Restes katalysieren. Daraufhin entstehen instabile Aglycone, die spontan in biologisch aktive Substanzen, wie Thiocyanate oder Nitrile, umgesetzt werden (Halkier & Gershenzon, 2006). Diese Substanzen besitzen eine Vielzahl verschiedener Aktivitäten, die der Pflanze im Allgemeinen zur Abwehr von Fraßfeinden dienen. Auch für Menschen sind diese Abbauprodukte von gewisser Bedeutung, da sie den charakteristischen Geruch und Geschmack von Kohlarten hervorrufen und darüber hinaus antikarzinogenes Potential besitzen sollen (Zhang *et al.*, 1992, Shapiro *et al.*, 2006). Der *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia enthält neben der Klasse der indolischen und aromatischen hauptsächlich aliphatische Glucosinolate, die sich von Methionin ableiten. In den letzten Jahren gelang die fast vollständige Aufklärung der einzelnen Syntheseschritte einschließlich der Charakterisierung der verantwortlichen Enzyme. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Kompartimentierung bedarf es verschiedener Transportprozesse über die innere Chloroplastenmembran, insbesondere im Verlauf der ersten Stufe der Synthese (Abb. 4B). Grundsätzlich erfolgt die Synthese in drei Stufen. Ausgehend von der Transaminierung von Methionin, die im Cytoplasma stattfindet, erfolgt die erste Stufe der Verlängerung der Seitenkette von Methionin im Chloroplastenstroma. Daraufhin müssen die kettenverlängerten Derivate in Keto- oder Aminosäureform wiederum aus dem Chloroplasten ausgeschleust werden, denn die Synthese der Kernstruktur, auch Glycon genannt, erfolgt im Cytoplasma bzw. am ER-Cytoplasma-Interface (Abb. 4A). Die abschließende dritte Stufe der Synthese, bestehend aus zum Teil umfangreichen Modifikationen der Seitenkette, wird ebenfalls im Cytoplasma vorgenommen. Trotz der Kenntnis vieler beteiligter Enzyme sind die involvierten Transporter bisher unbekannt.

A 1. Stufe: Verlängerung der Seitenkette



2. Stufe: Synthese der Kernstruktur



B

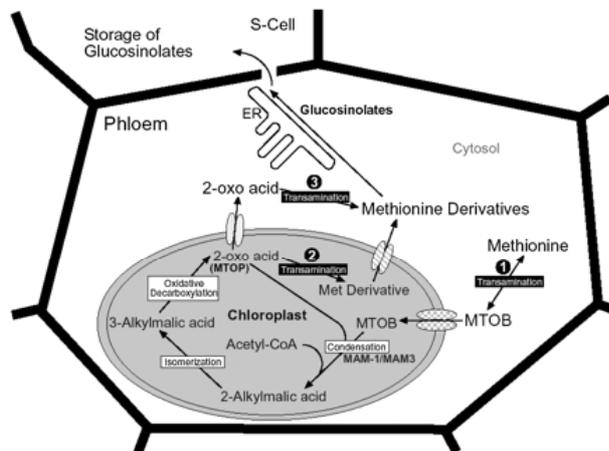


Abb. 4: Ausschnitt aus dem Biosyntheseweg von aliphatischen Glucosinolaten in *A. thaliana*.

A) Darstellung der ersten beiden Stufen des Biosynthesewegs für aliphatische Glucosinolate und der diese Reaktionen katalysierenden Enzyme, modifiziert nach Wittstock & Halkier, 2002

B) Modell für die Kompartimentierung der Biosynthese im Blütenstand, der über spezialisierte sulfatreiche Zellen (S-cells) zur Lagerung von Glucosinolaten verfügt (Koroleva *et al.*, 2000); (nach Schuster *et al.*, 2006)

MAM1/3: Methylthioalkylmalat-Synthase; BCAT4: *Branched-Chain Amino* Transferase 4; CYP: Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase; PAPS: 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat; UDPG: UDP-Glucose; R: variable Seitenkette; MTOB: Methylthiooxobutyrat ⇔ Synonym KMTB: Ketomethylthiobutyrat; MTOB: Methylthiooxopentanoat

Gibt es eine funktionelle Verbindung von Glucosinolatsynthese und aus Säugern bekannten Gallensäuretransportern?

Die Analyse der genomweiten Expression von Genen in *A. thaliana* ergab, dass Gene, deren Produkte an der Synthese aliphatischer Glucosinolate beteiligt sind, gleiche Expressionsmuster aufwiesen, wie ein Gen, das für einen bisher unbekanntem Transporter kodiert. Bei diesem Transporter handelt es sich um ein Mitglied der BART-Familie (Mansour et al, 2007). Im Genom von *A. thaliana* wurden vier weitere Transporter dieses Typs durch Sequenzvergleiche identifiziert, die zusammen im Folgenden als AtBAT (*Bile Acid Transporter*)1-5 bezeichnet werden.

Die sekundär aktiven Transporter der BART-(*Bile/Arsenite/Riboflavine*-Transporter) Superfamilie können in sechs Familien gegliedert werden (Mansour et al., 2007). Neben der Riboflavin-Transporter-Familie (RFT) und der Acr3-Familie von Arsenit-Transportern zählen die *Bile Acid/Sodium*-Symporter (BASS) zu dieser Transporterfamilie. Charakteristisches Merkmal aller Mitglieder ist das Vorkommen der *Sodium-Bile-Acid-Family*-(SBF)-Domäne, worauf auch die frühere Bezeichnung SBF-Transporter-Familie beruhte. In Säugern sind diese Transporter von essentieller Bedeutung. Die physiologische Rolle des NTCP (*Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide*) und des ASBT (*Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter*) besteht in der Aufrechterhaltung des enterohepatischen Zyklus` von Gallensalzen. Diese werden in der Leber ausgehend von Cholesterol synthetisiert und in der Gallenblase zusammen mit weiteren Bestandteilen, die zusammen die Galle bilden, konzentriert und gelagert. Im Laufe der Verdauung erfolgt die Sekretion der Galle in den Darm, wo die Gallensalze bei der effizienten Aufspaltung und Absorption von Lipiden und lipidlöslichen Vitaminen beteiligt sind. Im terminalen Ileum findet daraufhin die fast quantitative Rückgewinnung der Gallensalze über den ASBT in der apikalen Darmwandmembran statt. Mit dem Blutfluss gelangen die Gallensalze wieder in die Leber, wo die Aktivität des NTCP für ihre aktive Reabsorption in die Leberzellen sorgt (Hagenbuch & Dawson, 2004). Auf diese Weise können 95% der Gallensalze rückgewonnen werden, was vor dem Hintergrund einer 6-10maligen Zirkulation pro Tag eine deutliche Energieersparnis für den Körper bedeutet (Trauner & Boyer, 2003).

Der NTCP (*Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide*) und der ASBT (*Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter*) wurden mit Hilfe von *expression cloning*-Ansätzen isoliert (Hagenbuch et al., 1990, 1991; Wong et al., 1994, 1995) und waren

in den folgenden Jahren Gegenstand eingehender Analysen. Beide Proteine bestehen aus etwa 350 Aminosäuren und sind sehr hydrophob. Die Anwendung verschiedener experimenteller Methoden führte zur Identifikation von 7 bzw. 9 Transmembrandomänen sowie einem extrazellulär lokalisierten N-Terminus und einem cytoplasmatischen C-Terminus (Zhang *et al.*, 2004; Hallen *et al.*, 1999, 2002). Als Substrate verwenden beide Transporter generell alle physiologisch vorkommenden Dihydroxy- und Trihydroxygallensäuren, bevorzugen jedoch jene, die mit Glycin oder Taurin konjugiert sind (Craddock *et al.*, 1998; Hata *et al.*, 2003). Die Triebkraft des Transports stellt ein nach innen gerichteter Na^+ -Gradient dar, der durch die Na^+K^+ -ATPase aufrechterhalten wird. Die Energetisierung des Transports erfolgt demnach durch einen elektrogenen Na^+ -Symport im Verhältnis $\text{Na}^+ : \text{Taurocholat}$ 2:1 (Weinmann *et al.*, 1998).

Transporter der BASS-Familie kommen in Tieren, Pflanzen und Bakterien vor und ihre physiologische Funktion ist häufig unklar.

Die Suche nach Proteinsequenzen, die Ähnlichkeiten zu Gallensäuretransportern aus *A. thaliana* aufweisen, führte zur Identifikation zahlreicher Proteine aus sehr unterschiedlichen Organismen. Wie in Abb. 5 dargestellt, sind BASS-Proteine in allen Organismenreichen zu finden, zum Teil sogar mehrere Mitglieder in einer Spezies. Für intestinal vorkommende Bakterien, aber auch für Bodenbakterien wäre ein Transportsystem für Gallensalze sehr sinnvoll, denn die als Detergenzien wirkenden Gallensalze müssen von der Zelle exportiert werden. So konnte kürzlich das BASS-Mitglied Ctr des Darmbesiedlers *Bifidobacterium longum* als Cholattransporter identifiziert werden (Price *et al.*, 2006). Allerdings existieren in Bakterien häufig ebenfalls unspezifische *Multidrug-Efflux*-Systeme, die auch Gallensalze transportieren können (Piddock, 2006.).

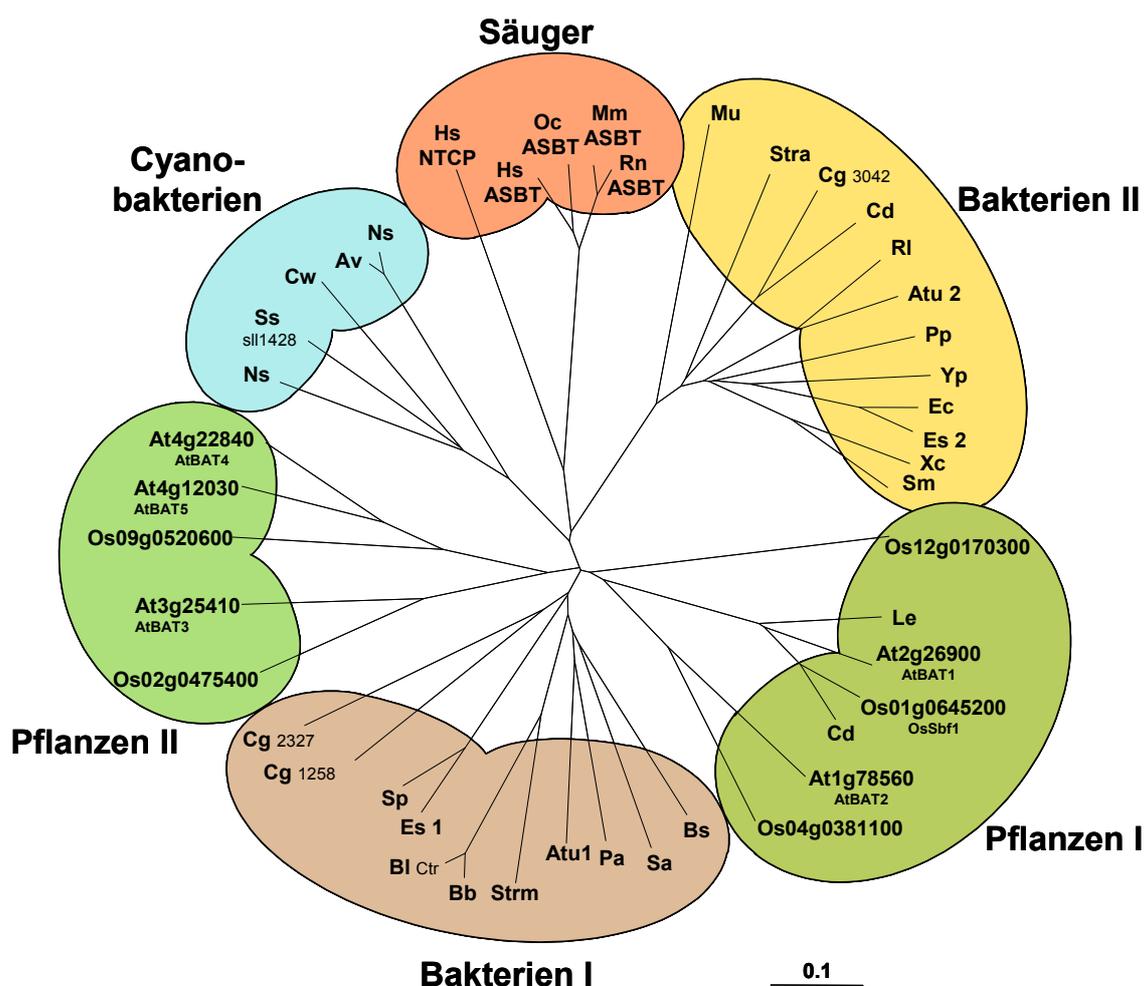


Abb. 5: Graphische Darstellung des Ergebnisses eines Sequenzvergleichs von Proteinen der BASS-Familie aus Säugern, Pflanzen und Bakterien. Die erhaltenen Cluster sind farblich hinterlegt. Hs: *Homo sapiens*; Oc: *Oryctolagus cuniculus*; Mm: *Mus musculus*; Rn: *Rattus norvegicus*; Mu: *Mycobacterium ulcerans*; Stra: *Streptomyces avermitilis*; Cg: *Corynebacterium glutamicum*; Cd: *Corynebacterium diphtheriae*; Ri: *Rhizobium leguminosarum*; Atu: *Agrobacterium tumefaciens*; Pp: *Pseudomonas putida*; Yp: *Yersinia pestis*; Ec: *Escherichia coli*; Es: *Enterobacter sp.*; Xc: *Xanthomonas campestris*; Sm: *Stenotrophomonas maltophilia*; Os: *Oryza sativa*; Le: *Lycopersicon esculentum*; At: *Arabidopsis thaliana*; Cd: *Cynodon dactylus*; Bs: *Bacillus subtilis*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Strm: *Streptococcus mutans*; Bb: *Bifidobacterium breve*; Bl: *Bifidobacterium longum*; Sp: *Serratia proteamaculans*; Ns: *Nodularia spumigena*; Ss: *Synechocystis sp.*; Cw: *Crocospaera watsonii*; Av: *Anabaena variabilis*; Ns: *Nostoc sp.*

Die Rolle, die Gallensalztransporter in Pflanzen übernehmen könnten, ist jedoch völlig unklar, da bisher kein direkter Nachweis ihrer Existenz in Pflanzen beschrieben ist. Es konnte lediglich *in vitro* ein ATP-abhängiger Transport von Taurocholat in isolierte Vakuolen gemessen werden (Hörtensteiner *et al.*, 1993). Ein weiterer Bericht weist auf eine mögliche Funktion von Cholat und dessen Derivaten als Elicitor pflanzlicher Abwehrmechanismen hin (Koga *et al.*, 2006). In Reis wiederum wurde

ein BASS-Mitglied als unter hypoxischen Bedingungen induziert beschrieben, ohne dass diesem als OsSbf1 bezeichneten Protein eine genaue Funktion zugewiesen werden konnte (Rzewuski & Sauter, 2002).

Neuere Studien zur Aufklärung des Substratspektrums von ASBT und NTCP deuten jedoch auf weitergehende Funktionen dieser Transporter hin. Während für ASBT bisher ein auf Gallensalze beschränktes Substratspektrum nachgewiesen werden konnte, scheint NTCP eine ganze Reihe weiterer Substrate zu akzeptieren. Dazu zählen Steroidderivate, wie Östron-3-Sulfat, sowie Substanzen wie Bromosulfophthalein und Chlorambucil-Taurocholat (Craddock *et al.*, 1998; Kullak-Ublick *et al.*, 1997). Außerdem wurden vier weitere homologe BASS-Mitglieder aus Säugern analysiert: P3, P4 und P5, deren Funktion noch unbekannt ist, und SOAT (*Sodium-dependent Organic Anion* Transporter), ein Carrier ausschließlich für Steroidsulfate, die als nicht-aktive Vorstufen von Hormonen charakterisiert wurden (Geyer *et al.*, 2004, 2006). Obwohl SOAT und ASBT eine 70%ige Homologie auf Gesamtebene aufweisen, akzeptiert SOAT keine Gallensalze als Substrate. Durch eine detaillierte Analyse konnte eine Reihe von Aminosäuren identifiziert werden, die für die Transportaktivität essentiell sind. Da diese jedoch in allen Säugerproteinen der BASS-Familie konserviert sind, können sie nicht für die unterschiedliche Substratspezifität verantwortlich sein (Geyer *et al.*, 2006). Somit kann bisher keine Erklärung für die unterschiedlichen Substratspektren auf molekularer Ebene geliefert werden.

Infolgedessen ist auch für die in *A. thaliana* gefundenen BASS-Transporter eine Vorhersage ihrer Substrate auf Grundlage von Sequenzvergleichen nicht möglich und eine Funktion als Transporter für Intermediate im Glucosinolatstoffwechsel nicht ausgeschlossen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten daher die fünf Mitglieder der BASS-Familie in *A. thaliana* funktionell charakterisiert werden. Eine vergleichende Analyse von *Knock out*-Mutanten, der intrazellulären Lokalisation der einzelnen Proteine und der Expressionsmuster der sie kodierenden Gene sollte dabei nähere Hinweise auf ihre mögliche physiologische Rolle liefern. Durch die Expression im heterologen System und die Anwendung eines etablierten Transportsystems war eine Analyse von möglichen Substraten geplant.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bezugsquellen für Chemikalien und Geräte

Chemikalien, Enzyme, Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd (Buckinghamshire, GB); Applichem (Darmstadt, D); Biorad (München, D); Biometra (Göttingen, D); Roche (Mannheim, D); Difco (Hamburg, D); Duchefa (Haarlem, ND); DuPont Company (Wilmington, GB); Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D); Fluka AG (Schweiz); GibcoBRL (Karlsruhe, D); Heraeus (Düsseldorf, D); Intas (Göttingen, D); Merck (Darmstadt, D); Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe, D); Molecular Dynamics (Krefeld, D); New England Biolabs (Schwalbach, D); Promega (Mannheim, D); Qiagen GmbH (Hilden, D); Roche (Mannheim, D); Roth (Karlsruhe, D); Sarstedt (Nümbrecht, D); Schleicher & Schuell (Dassel, D); Serva (Heidelberg, D); Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D); Stratagene Europe (Amsterdam, ND). Radiochemikalien wurden von den Firmen ICN (Eschwege) und Hartmann Analyticals (Braunschweig, D) hergestellt.

Weiterhin wurden folgende Kits eingesetzt und gemäß der Herstellerangaben verwendet:

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D)
 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D)
 Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad, München, D)
 Quiagen Plasmid Midi Kit
 pGEM[®]Teasy cloning Kit (Promega, Mannheim, D)
 pENTR/D-TOPO[®] cloning Kit (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D)
 Gateway[®] LR clonase[™] Enzyme Mix (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D)
 Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA)
 SuperScript[™] II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D)
 BCA[™] Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA)

2.1.2. Bakterien- und Hefestämme

2.1.2.1. *Escherichia coli*

Es wurden folgende *E. coli*-Stämme mit angegebenem genetischen Hintergrund verwendet:

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

Top10 zur Amplifikation von Plasmiden
F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139

$\Delta(\text{ara-leu})7697$ *galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*

XL10 Gold zur Amplifikation von Plasmiden

Tet^R $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ ned A1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lac^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam_R]^a$

DB3.1 für die Vermehrung von Destination-Vektoren, die das *ccdB* Gen enthalten

F- *gyrA462 endA1 (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm_R) xyl-5 - leu mtl1*

BL21(DE3) zur heterologen Expression in *E. coli*

F' ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)gal dcm (DE3)

2.1.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

GV3101 zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Rif^RGm^R (Koncz und Schell, 1986; pMP90)

LBA4404.pBBR1MCS virGN54D zur Transformation von *A. thaliana*-Zellkultur

RK19 Anti-silencing-Helferstamm von LBA4404.pBBR1MCS virGN54D

2.1.2.3. *Saccharomyces cerevisiae*

InvSc1 zur heterologen Expression in *S. cerevisiae*

his3 Δ 1 leu2 trp1-289 ura3-52

2.1.3. Vektoren

Tabelle 1: Auflistung der eingesetzten Vektoren

Vektor	Bezugsquelle	Verwendung
pBluescript®-Serie	Stratagene	Amplifikation von Fragmenten in <i>E. coli</i> , Komplementation der <i>E. coli</i> -KAM3-Mutante
pGEMTeasy®	Promega	TA-Klonierung von PCR-Fragmenten
PENTR™-D-TOPO®	Invitrogen	gerichtete Klonierung von PCR-Fragmenten; Eingangsvektor für das Gateway-Klonierungssystem
PGWB3	Tsuyoshi Nakagawa (Shimane University, Japan)	Gateway-Destination-Vektor; Herstellung von Promotor::GUS-Fusionen zur Expression in <i>A. thaliana</i>
PGWB5	Tsuyoshi Nakagawa (Shimane University, Japan)	Gateway-Destination-Vektor; Herstellung von cDNA::GFP-Fusionen zur Expression in Tabak- und <i>A. thaliana</i> -Protoplasten
pYES-NT®-Serie	Invitrogen	Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>
pYes-Dest-52®	Invitrogen	Gateway-Destination-Vektor; Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>
pDest 17®	Invitrogen	Gateway-Destination-Vektor; Heterologe Expression in <i>E. coli</i>

2.1.4. Pflanzenmaterial

Die nachfolgend aufgeführten *A. thaliana* T-DNA-Insertionsmutanten-Linien wurden im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert :

Tabelle 2: Auflistung der bearbeiteten *A. thaliana* T-DNA-Insertionsmutanten-Linien

Distributor	Population	Linie	T-DNA-Insertionsort
NASC (http://nasc.nott.ac.uk/home.html)	SALK Institut	SALK_101808	At2g26900
		SALK_044369	At4g22840
		SALK_126525	At4g12030
		SALK_134294	At5g42420
		SALK_125196	At1g21070
GABI-Kat (www.mpiz-koeln.mpg.de/GABI-Kat/)	GABI-Kat	GK_479D02	At3g25410
		GK_179E05	At1g78560
		GK_582F05	At1g76670
		GK_827C11	At4g39390

Als Wildtyp diente *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. cv. Columbia (NASC-Nr. N1093).

2.2. Anzucht- und Kultivierungsmethoden

2.2.1. Kultivierung von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in bzw. auf nachfolgenden Nährmedien:

LB-Medium:

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1 l H₂O_{dest.}

für Platten: 1,5% Bacto-Agar
autoklavieren

YEB-Medium:

5 g Bacto Peptone
5 g Fleischextrakt
1 g Hefeextrakt
5 g Saccharose
0.5 g MgSO₄ x 7 H₂O
ad 1 l ad 1 l H₂O_{dest.}
für Platten: 1.5% Bacto-Agar
autoklavieren

Indikatorplatten zur Blau-Weiß-Selektion:

2 g Trypton
1 g Hefeextrakt
0.2 g NaCl
0.5 g MgCl₂
3 g Agar
ad 200 ml H₂O_{dest.}
autoklavieren
400 µl Ampicillin (50mg/ml in 1 M Tris-Cl pH 8.0)
1 ml 2% (w/v) X-Gal in Dimethylformamid
40 mg IPTG

Tabelle 3: Antibiotika-Konzentrationen für *E. coli*- und *Agrobacterium*-Selektionsmedien

Antibiotikum	Endkonzentration (µg/ml)	Stocklösung (mg/ml)	Lösungsmittel
Ampicillin	50	50	Wasser
Kanamycin <i>E. coli</i>	50	50	Wasser
Kanamycin <i>A. tumefaciens</i>	100	100	Wasser
Hygromycin (Gibco)	50	50	Wasser
Gentamycin	25	25	Wasser
Rifampicin	150	30	DMSO
Tetracyclin	10	10	Wasser
Chloramphenicol	20	20	Ethanol 100%

Die *E. coli*-Stämme wurden bei 37°C in LB-Flüssigmedium im Schüttelinkubator (G25 Incubator Shaker, New Brunswick scientific Co Inc., Edison, New Jersey, USA; 300 rpm) oder auf LB-Agarplatten angezogen. Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* dagegen erfolgte bei 28°C in YEB-Flüssigmedium bzw. auf YEB-Agarplatten.

Je nach Selektion erfolgte die Zugabe der entsprechenden Antibiotika in das jeweils handwarme Medium (siehe Tabelle 3).

Die Lagerung der Bakterien erfolgte auf Agarplatten einige Wochen bei 4°C und längerfristig bei -80°C nach 1:1 Mischung der Bakterienkultur mit folgendem Stammkulturmedium.

Glycerin für Stammkulturen:

65 % Glycerin

0.1 M MgSO₄

25 mM Tris/HCl pH 8.0

autoklavieren

2.2.2. Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Der verwendete Hefestamm InvSc1 wurde in nachstehendem Vollmedium bei 28-30°C angezogen.

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose)- Medium:

1 % Hefeextrakt

2 % Peptone

2 % Dextrose (D-Glucose)

für Platten: 2 % Agar

Als Selektionsmarker diente *URA3*, welches die positiven Transformanten zur Uracilsynthese befähigt, während InvSc1 Uracil-auxotroph ist. Folglich enthielt das Selektionsmedium neben einer Stickstoff- und Zuckerquelle einen Aminosäuremix ohne Uracil.

Selektionsmedium SC-Uracil:

0.67 % Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren, mit Ammoniumsulfat)

2 % Glucose oder Raffinose

0.01 % Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan

0.005 % Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin

Tyrosin, Valin

für Platten: 2% Agar

Die Induktion der Expression des jeweiligen gewünschten Proteins erfolgte, indem im Medium Glucose durch Galactose ersetzt wurde.

Induktionsmedium:

SC ohne Uracil, mit 2% Galactose

2.2.3. Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

2.2.3.1. Anzucht auf Erde

Samen von *Arabidopsis thaliana* wurden auf einem Gemisch von 3 Teilen Erde (Einheitserde Typ Minitray, Gebr. Patzer KG, Sinntal-Jossa) und einem Teil Vermiculit (Basalt Feuerfest, Linz) ausgelegt. Vor der Aussaat wurde das Substrat mit Leitungswasser durchtränkt. Die Pflanzschalen wurden zur Vermeidung von Kontaminationen durch Fremdsamen mit Pikierhauben abgedeckt. Zur Brechung der Samenruhe und Synchronisation der Keimung wurde die Aussaat zunächst für zwei Tage bei 4°C stratifiziert. Die Keimung und Anzucht erfolgten anschließend in einem Gewächshaus oder einer Phytokammer. Die Pflanzen wurden bei einer Photonenflussdichte von ca. 150-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Quantameter LI-1000 der Fa. Li-Cor) im Gewächshaus bzw. 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in einer Phytokammer und einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden angezogen. Für die Beleuchtung in der Phytokammer wurde eine Mischung aus Tageslicht-Neonröhren verschiedener spektraler Qualitäten (Tageslicht L58W/11-860, Warmweiss L58W/30, Natura de Luxe L58W/76 und Fluora L58W/77) der Firma Osram verwendet. Die Temperatur betrug in der Lichtphase ca. 22°C und während der Dunkelphase etwa 18°C. Die relative Luftfeuchtigkeit lag zwischen 40 - 50%.

Sobald die Keimblätter vollständig entfaltet waren, konnte die Pikierhaube entfernt werden. 10-14 Tage nach der Aussaat wurden die Pflanzen vorsichtig in runde Einzeltöpfe (\varnothing 6 oder 9 cm) oder in eine Multitray-Schale pikiert. Die Pflanzen wurden ein- bis zweimal pro Woche mit Leitungswasser angestaut. Als Maßnahmen zur Schädlingsbekämpfung kamen Gelbtafeln (Fa. Neudorff, Emmerthal, FRG), Nematodensuspension (Fa. Sautter und Stepper, Ammerbuch, FRG), Nützlinge (*Chrysoperla*; Fa. Sautter und Stepper, Ammerbuch, FRG) und bei starkem Blattlausbefall Confidor als 25%ige Emulsionsspritzlösung zum Einsatz.

Zur Samengewinnung nach Abschluss der Blütezeit wurden die Infloreszenzen zum Zeitpunkt der Gelbfärbung der Schoten mit Pergamenttüten umhüllt und die Bewässerung eingestellt. Nach beendeter Samenreife wurden die getrockneten Blütenstiele abgeschnitten und zerrieben, um die Samen aus den Schoten zu lösen. Die Samen konnten nahezu rein gewonnen werden, indem Pflanzenreste wiederholt mit einem Metallsieb (Maschenweite 450 μm) abgetrennt wurden. Die Lagerung der Samen erfolgte nach 2tägiger vollständiger Trocknung der Samen unter dem Abzug in 2 ml-Kunststoffgefäßen mit Schraubdeckel und Dichtungsring.

Reste transgener Pflanzen, insbesondere Samen und reproduktive Organe, wurden bei 121°C und 1,2 bar für 40 min autoklaviert, während Reste nicht transgener Pflanzen kompostiert werden konnten.

2.2.3.2. Sterilisation der Samen und *in vitro*-Anzucht auf Agarplatten

Für die *in vitro*-Kultivierung von *A. thaliana* wurde Murashige-Skoog (Murashige & Skoog, 1962), kurz MS-Medium, verwendet.

MS-Medium:

4,6g Murashige-Skoog-Medium micro & macro elements inc. vitamins (Duchefa)
 1 % (w/v) Saccharose
 0,8 % (w/v) Agar
 pH 5,6 – 5,8 mit KOH einstellen
 ad 1 l H₂O_{dest.}
 autoklavieren

Zur Selektion transformierter Pflanzen wurden dem handwarmen Medium die jeweiligen sterilfiltrierten Antibiotika zugegeben.

Tabelle 4: Antibiotikakonzentrationen für *A. thaliana*-Selektionsmedien

Antibiotikum	Endkonzentration (µg/ml)	Stocklösung (mg/ml)	Lösungsmittel
Kanamycin	50	50	Wasser
Hygromycin (Gibco)	20	50	Wasser

Vor der Aussaat der zu selektierenden Samen erfolgte deren Oberflächensterilisation mit Hilfe von Chlorgas in einem Exsikkator. Dazu wurden die Samen zunächst in gut beschriftete Eppendorfgefäße umgefüllt und geöffnet in einen im Exsikkator befindlichen Ständer gestellt. Weiterhin wurde ein Becherglas mit 100 ml NaClO gefüllt und ebenfalls im Exsikkator platziert. Nun folgte die Zugabe von 3 ml konz. HCl und ein möglichst rasches Verschließen des Exsikkators. Nach einer Inkubation von 3 bis 6 h wurde der Exsikkator unter sterilen Bedingungen geöffnet und die Samen zum Abdampfen (2 h) unter der Sterilbank belassen.

Die auf diese Weise sterilisierten Samen wurden auf die fertigen Platten aufgebracht, diese nach vollständigem Trocknen mit luftdurchlässigem Vliesklebeband (Omnipor der Fa. Hartmann) versiegelt und für 2 Tage bei 4 °C stratifiziert. Anschließend erfolgte die Keimung und weitere Anzucht bei 22°C unter einem Licht-Dunkel-Regime von 16:8 h in dem Phytoinkubationsschrank RUMED 1200 (Fa. Rubarth Apparate GmbH, Laatzen).

2.3. Präparation und Analyse von DNA

2.3.1. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Isolation von *Agrobacterium*-Plasmid-DNA im Mini-Maßstab

Hierbei wurde sich der Methode nach Birnboim und Doly (Birnboim & Doly, 1979) bedient, die es ermöglicht, Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen mit nur geringen Kontaminationen an bakterieller chromosomaler DNA und Proteinen zu isolieren.

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden für 10 min bei 3000 rpm in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Sediment in 100 µl Mini-Lösung I (s.u.) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Zur Lyse der Bakterien wurden je 200 µl Mini-Lösung II (s.u.) zugegeben, vorsichtig mehrmals invertiert und die Ansätze nochmals 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Neutralisation durch Zugabe von 150 µl 3M KOAc (pH 4,8) je Ansatz und wiederum gute Durchmischung durch mehrfaches Invertieren. Im Anschluss an eine 5minütige Inkubation auf Eis wurde bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und einem RNase-Verdau unterzogen. Hierfür wurde zunächst die DNA mit Ethanol gefällt, gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA-Pellets wurden in 200 µl RNase/H₂O_{dd}-Lösung (RNase-Konzentration: 10 µg/ml) versetzt und für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Um die RNase zu entfernen, wurden die Proben phenolisiert, mit Ethanol präzipitiert, danach gewaschen, im Exsikkator getrocknet und schließlich in einem adäquaten Volumen dest. Wasser aufgenommen.

Mini-Lösung I:

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

Mini-Lösung II:

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

Isolation von *E. coli*-Plasmid-DNA im Mini-Maßstab

Hierfür kam das Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BioRad, München, D) zum Einsatz, wobei nach mitgeliefertem Protokoll vorgegangen wurde. Zur Kostenminimierung war es möglich, die Bindungsmatrix selbst herzustellen und die gelieferten Säulchen somit nach gründlicher Reinigung mit dest. Wasser mehrfach zu benutzen.

Bindungsmatrix:

5,3 M Guanidin-HCl
20 mM Tris pH 8,0
0.15 g/ml Diatomeenerde

Isolation von *E. coli*-Plasmid-DNA im Midi-Maßstab

Um Plasmid-DNA in Größeren Mengen und in besonders reiner Form zu gewinnen, wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit (Hilden, D) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.2. Isolation von genomischer DNA aus *A. thaliana*

DNA-Schnellpräparation für PCR-Reaktionen

Als eine einfache und schnelle Methode zur Präparation genomischer Pflanzen-DNA kam die Methode von Edwards (Edwards *et al.*, 1991) zur Anwendung. Die auf diese Weise isolierte genomische DNA eignet sich insbesondere als Matrize für PCR-Analysen, weniger für *Southern-Blot*-Untersuchungen, da die DNA hierbei starken Scherkräften unterliegt und nur wenig gereinigt wird.

Ein bis drei Rosettenblätter von *Arabidopsis thaliana* wurden geerntet und entweder sofort verarbeitet oder bis zur DNA-Präparation in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Homogenisation des Blattmaterials erfolgte in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit Hilfe eines Bohrers bei Raumtemperatur. Zu dem homogenisierten Gewebe wurde 400 µl Extraktionspuffer gegeben und für 3-4 s gevortext. Nach der Aufarbeitung aller Proben wurden diese für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 1 Vol. Isopropanol vorsichtig gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die gefällte DNA bei 13.000 rpm in der Eppendorf 5417 Zentrifuge für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet jedoch mit 200 µl 70% Ethanol versetzt und 5 min bei 13.000 rpm gewaschen. Wiederum erfolgte das möglichst vollständige Entfernen des Überstandes, so dass das Pellet unter dem Abzug in ca. 20-30 min lufttrocknen konnte. Anschließend wurde das trockene Pellet in 50 µl 1x TE-Puffer aufgenommen und davon je 1 – 4 µl zur PCR-Reaktion eingesetzt.

Extraktionspuffer:

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

1x TE-Puffer:

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

Isolation genomischer Blüten-DNA für *Southern- Blot-Analysen*

Eine schnelle Möglichkeit zur Präparation genomischer DNA in guter Qualität und Menge, wie sie beispielsweise für genomische *Southern Blots* benötigt wird, stellt die Isolation von DNA aus *A. thaliana*-Blüten nach dem Protokoll von Liu (Liu *et al.*, 1995) dar. Dazu wurden zwei bis vier Blütenstände geerntet, in ein Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zu dem mit einem Pistill gemörserten homogenen Gemisch wurden 250 µl Extraktionspuffer gegeben, gefolgt von weiterem Mörsern bis zum Auftauen, wonach eine nochmalige Zugabe von 250 µl Extraktionspuffer erfolgte. Anschließend wurde das Gemisch mit 400 µl PCI versetzt, kräftig geschüttelt und 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Eppendorfgefäße überführt und die DNA durch Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol gefällt. Nach zehn Minuten Inkubation bei RT schloss sich wiederum ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 3500 rpm an. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol zweimal gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde schließlich in 50 µl TE/RNaseA (10 µg/ml) aufgenommen und in ca. 30 min auf dem Schüttler zur Lösung gebracht.

2x Puffer:

0,6 M NaCl
100 mM Tris pH 7.5
40 mM EDTA
4% (w/v) Sarkosyl
1% (w/v) SDS

Extraktionspuffer:

25 ml 2x Puffer
20 ml 12 M Harnstoff
2.5 ml Phenol
2.5 ml H₂O_{dd}

PCI:

Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol
im Verhältnis 25 : 24 : 1

2.3.3. Reinigung von DNA

Da die nach oben genannten Isolationsmethoden präparierte DNA oft noch Proteinverunreinigungen enthält, die bei einigen Anwendungen störend wirken können, ist in diesen Fällen eine Reinigung der DNA durch Phenolisierung und anschließende Fällung notwendig. Dazu wird die DNA-Lösung mit 2 Vol. PCI versetzt, einige Minuten geschüttelt und für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Oberphase wird abgenommen, die organische Unterphase mit der proteinhaltigen Interphase jedoch verworfen. Es folgt eine nochmalige Extraktion mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol, kurzem Schütteln und Zentrifugation für 10 min bei 12.000 rpm. Zu der nochmalig überführten DNA-haltigen Oberphase wird dann 1/2 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat oder 1/10 Vol 3 M Natriumacetat pH 6,0 und 2,5 Vol. 100 % Ethanol gegeben. Die Lösung wird für 5 min geschüttelt und anschließend für 30 min bei 14.000 rpm sedimentiert. Das

Sediment wird zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in ein adäquates Volumen dest. Wasser oder TE aufgenommen.

2.3.4. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA für analytische und präparative Zwecke dient die horizontale Agarosegelelektrophorese (Maniatis, 1982). In Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße wurden 0.8 - 2 %ige (w/v) Agarosegele hergestellt. Die eingewogene Agarose wurde in dem erforderlichen Volumen 1 x TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Vor dem Gießen in eine Flachbettkammer wurde die Lösung mit 1/20.000stel Vol. Ethidiumbromid versetzt. Während das Gel erstarrte, erfolgte die Zugabe von Stopp-Puffer zu den DNA-Proben. Der Gellauf fand bei einer angelegten Stromstärke von 1-1.5 mA pro cm² Gelfläche in 1x TAE-Puffer statt. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde jeweils mindestens ein DNA-Längenstandard mit aufgetragen (1 kb-Längenmarker der Fa. Invitrogen). Durch die Interkalierung von Ethidiumbromid in die DNA konnte diese auf einer UV-Durchlichtapparatur (254 nm Wellenlänge) sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Geldokumentationssystem (Video-Bildverarbeitungsgerät, Fa. Intas, Göttingen).

50 x Tris-Acetat-Puffer (TAE) :

2 M Tris/ HAc, pH 7,5
50 mM EDTA

10 x Stopp-Puffer:

20 % (w/v) Ficoll 400
100 mM EDTA
1 % (w/v) SDS
0,05% (w/v) Bromphenolblau
0,05% (w/v) Xylenblau

Ethidiumbromid-Stammlösung:

5 mg/ ml Ethidiumbromid

2.3.5. Quantifizierung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte entweder durch Abschätzung in einem Agarosegel oder durch Messung der Absorption der Nukleinsäurelösung im Spektralphotometer (Photometer Ultrospec III, Pharmacia).

Die Mengenabschätzung in einem Agarosegel erfolgte im optischen Vergleich mit einem Mengenstandard (1 kb-Längenmarker der Firma Invitrogen) anhand der subjektiv eingeschätzten Stärke der Färbung mit Ethidiumbromid.

Weiterhin kann der Nukleinsäuregehalt einer Lösung über die Absorption bei 260 nm quantifiziert werden. Ein Aliquot der DNA-Präparation wurde hierzu 1:50 mit Wasser verdünnt und die Absorption bei den Wellenlängen $\lambda = 260$ nm und 280 nm in einer Quarzküvette gegen Wasser als Referenz gemessen. Hierbei gilt: E = 0,05 entspricht 1 µg Oligonukleotide/ ml, E = 0,025 entspricht 1 µg RNA/ ml, bzw. 1 µg einzelsträngige DNA/ ml und E = 0,02 entspricht 1 µg doppelsträngige DNA/ ml.

Verunreinigungen der Lösung durch Proteine lassen sich aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm abschätzen, wobei der Quotient E_{260}/E_{280} zwischen 1.6 und 1.9 liegen sollte. Zusätzlich kann eine Messung der Absorption bei 230 nm Auskunft über Verunreinigungen durch Phenole oder Polysaccharide geben. Dabei sollte der Quotient E_{260}/E_{230} ungefähr zwei betragen.

2.3.6. Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen GmbH, Hilden, D) nach den Anweisungen des Herstellers aus Agarosegelen isoliert.

2.3.7. Restriktion von DNA

Zur Spaltung doppelsträngiger DNA wurde das Restriktionsendonukleasen/Puffer-System der Firma MBI Fermentas gemäß Katalogangaben verwendet.

2.3.8. Ligation von DNA-Enden

Die T4 DNA-Ligase verbindet DNA-Fragmente, die endständige 3'-OH-Gruppen tragen, mit solchen, die 5'-Phosphatgruppen besitzen. Die Reaktion findet unter ATP-Hydrolyse statt. Dabei können sowohl zueinander komplementäre als auch glatte Enden miteinander verknüpft werden. DNA-Fragment und Vektor wurden im molaren Verhältnis 5 : 1 gemischt und für einen 20 µl-Ansatz weiterhin 2 µl 10x Ligase-Puffer und 1-2 U T4 DNA-Ligase (Promega) zugegeben. Die Reaktion erfolgte über Nacht in einem auf 12 °C temperierten Wasserbad. Anschließend wurde der Ansatz direkt für die Transformation kompetenter Bakterienzellen verwendet.

2.3.9. Gateway®-Klonierung

Das Gateway®-System ist ein auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ basierendes Rekombinase-Klonierungssystem. Dieses verwendet insgesamt 4 Erkennungssequenzen, sogenannte *att-sites*, die auf spezifische Weise miteinander rekombiniert werden. Zunächst erfolgt die direkte und gerichtete Klonierung des gewünschten PCR-Produkts in den Eingangs- oder *entry*-Vektor (z.B. pENTR/D-TOPO®, Invitrogen) zwischen die *att*-Sequenzen. Nun folgt der Rekombinationsschritt in den gewünschten Expressions- oder *destination*-Vektor, der ebenfalls über korrespondierende *att-sites* verfügt. Während der Reaktion, die von der jeweiligen Rekombinase (je nach Art der *att-sites* BP- oder LR clonase™ Enzyme Mix, Invitrogen) ausgeführt wird, werden die DNA-Abschnitte, die zwischen den *att*-Sequenzen liegen, zwischen *entry*- und *destination*-Vektor ausgetauscht. Unerwünschte Rekombinationsprodukte werden durch verschiedene Resistenzgene in den jeweiligen Vektor-*backbones* und durch das toxische *ccdB*-Gen, das vom *destination*-Vektor in den *entry*-Vektor rekombiniert, wegselektiert. Auf diese Weise ist es möglich, durch Rekombination ausgehend von einem *entry*-clone in eine ganze

Kollektion von möglichen *destination*-Vektoren einfach und schnell eine Vielzahl von Fragestellungen zu beantworten.

Zur Klonierung der in dieser Arbeit genutzten Konstrukte mit Hilfe des Gateway®-Systems wurde nach Herstellerangaben (Invitrogen) vorgegangen.

2.3.10. Kapillartransfer von DNA (Southern Blot)

Um DNA-Fragmente, die zuvor mittels Agarosegelelektrophorese entsprechend ihrer Länge aufgetrennt wurden, auf eine Membran zu transferieren und dort zu fixieren, so dass später durch Hybridisierung mit markierten Sonden ein spezifischer Nachweis einzelner DNA-Fragmente möglich ist, bedient man sich des sogenannten *Southern Blots* (Southern, 1975). Für ein effizientes Blotting von Gelen nach einem Restriktionsverdau genomischer DNA erfolgte der Transfer der Nukleinsäuren über Nacht im *upward*-Verfahren mit einem Hochsalzpuffer. Bei dieser Blot-Methode wird 20 x SSC-Puffer unter Nutzung der Kapillarkräfte durch das Gel und die Membran in einen Stapel von Papiertüchern gesogen, wobei die DNA mitwandert und an der Membran anhaftet.

Dazu wurde das Gel für 30 min denaturiert, einmal mit Leitungswasser gespült und für weitere 30 min neutralisiert. Anschließend erfolgte der Aufbau des Transferstapels. Eine Wanne wurde mit 20 x SSC befüllt und diese mit einer Glasplatte bedeckt. Ein Stück Whatman - Papier wurde über die Glasplatte gelegt, so dass es auf beiden Seiten in den Puffer eintauchte. Das Gel wurde nun auf das mit 20 x SSC getränkte Whatman - Papier gelegt und die Luftblasen mit einer 10 ml Pipette entfernt. Die Membran (Hybond™ -N+ Nylon-Membran, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd, Buckinghamshire, GB), die zuvor auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten worden war, wurde kurz in 20 x SSC getaucht und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Um ein Vorbeilaufen des Transferpuffers am Gel zu verhindern, wurde der Bereich um das Gel mit Parafilm abgedichtet. Weiterhin wurden 4 Lagen in 20 x SSC getränktes, zurechtgeschnittenes Whatman - Papier und ein ca. 5 cm hoher Stapel Laborpapier aufgelegt. Abschließend erfolgte eine Beschwerung des Stapels durch eine Glasplatte und ein Gewicht von ca. 1 kg. Der Aufbau wurde 12 bis 16 h geblotet. Nach dem Blotting wurde die DNA mit dem UV Stratalinker 2400 (Stratagene Europe, Amsterdam, ND) auf der Membran fixiert.

Zur Hybridisierung der auf der Nylonmembran fixierten DNA mit der radioaktiv markierten Sonde (2.3.11.) wurde die Membran zunächst für mindestens 2 h bei 65°C in RotiHybriQuick (Roth) vorhybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde für 10 min bei 95°C denaturiert und zur Vorhybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in einem Rotationshybridisierungssofen (Fa. Hybaid, Heidelberg). Zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität wurden Waschungen der Membran mit ansteigender Stringenz durchgeführt : zweimal für 30 min bei 65°C mit Waschlösung I und einmal für 10 min mit Waschlösung II. Der noch feuchte Filter wurde in Folie eingeschweißt und ein frisch gelöschter Phosphorimagerscreen (Molecular Dynamics, Krefeld) aufgelegt. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Stärke des erwarteten Signals, welches mit einem Phosphor-Imager (Storm 860, Fa. Molecular Dynamics, Krefeld) erfasst, als TIFF-Datei gespeichert und mit der Software *ImageQuant* Mac (Version 1.2) densitometrisch ausgewertet werden konnte.

Denaturierungslösung:

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung:

1 M NH₄Ac
10 mM NaOH

20 x SSC:

0,3 M Na-Citrat
3 M NaCl
pH 7,5

Vor/Hybridisierungslösung:

RotiHybriQuick (Roth)

Waschlösung I:

2x SSC
0,1% (w/v) SDS

Waschlösung II:

0,2x SSC
0,1% (w/v) SDS

2.3.11. Radioaktive Markierung von DNA

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

20 -100 ng DNA-Fragment wurden zusammen mit 10 µl Labelling-Mix für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Zu dem Ansatz wurden 2 µl BSA (1 mg/ml), 20-30 µCi α-[³²P]-dATP sowie 3 U Klenow-Fragment gegeben. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 30°C inkubiert. Der Einbau der Radioaktivität wurde durch eine TCA (Trichloressigsäure)-Fällung (Ansatz s.u.) mit anschließender Zentrifugation (14.000 min⁻¹, 7 Minuten, Eppendorf Centrifuge 5417) und Vergleich der Aktivitäten in Sediment und Überstand kontrolliert. Der Einbau des (α-³²P)-dATP erfolgte normalerweise mit einer Effizienz von über 80 %.

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

Lösung A:

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

Lösung B:

2 M HEPES/ NaOH, pH 6,6

Lösung C:3,6 µg/ µl Hexadesoxynukleotide (dN₆)**5 x Labelling-Mix:**

Lsg. A : Lsg. B : Lsg. C

100 : 250 : 100

Ansatz zur Kontrolle der Einbaurrate:100 µl H₂O

5 µl Heringssperm-DNA (10 mg/ml), denaturiert

1.5 µl *Labelling*-Ansatz

135 µl TCA (20%)

2.3.12. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als Standardmethode zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen fand die PCR (*Polymerase chain reaction*; Mullis, 1988) Anwendung. Das Prinzip der *in vitro* DNA-Vermehrung beruht auf einem sich 25-35fach wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Bindung der reziproken Oligonukleotide bzw. Primer und Neusynthese der DNA-Stränge durch eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase). Die Verdopplung einer spezifischen DNA-Sequenz mit jedem Zyklus bedeutet einen exponentiellen Anstieg der Konzentration des von den Primern definierten DNA-Fragmentes.

Ein **Standard-PCR-Ansatz** enthielt jeweils:

10 – 100 ng *Template*-DNA

1/10 Vol. 10 x PCR-Puffer (Qiagen, Roche, Promega)

100 µM dNTP-Mix

1/50 Vol. Primer 1 (10pmol/µl)

1/50 Vol. Primer 2 (10pmol/µl)

1 U *Taq*-Polymerase (Qiagen, Roche, Promega)

Die PCR wurde in einem programmierbaren Thermocycler (Biozym PTC 100/200) unter Verwendung folgenden **Standard-Programmes** durchgeführt.

96°C	2 min	
-----		} 35 Zyklen
96°C	15 sec	
52 – 62 °C*	30 sec	
72°C	1 min	

72°C	4 min	
4°C	∞	

*Die Temperatur für die Anlagerung der Primer an die *Template*-DNA hängt von der Basensequenz der verwendeten Primer-Paare ab.

Die Analyse des Amplifikats erfolgte nach Zugabe von 5x Stopp-Puffer mittels Agarosegelelektrophorese.

2.3.12.1.1. Colony-PCR

Als schnelle und einfache Methode, eine Vielzahl von Klonen als Ergebnis einer Transformation auf das Vorhandensein des gewünschten Plasmids zu überprüfen, gilt die *Colony-PCR*. Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wurden Zellen einer Bakterienkolonie in 50 µl steriles A. dest. überführt und durch 5minütiges Kochen aufgeschlossen. Für den Ansatz der PCR-Reaktionen wurden 1 µl des Aufschlusses und die jeweiligen genspezifischen Primer eingesetzt.

2.3.12.1.2. Screening-PCR zur Durchsicht transgener Pflanzenpopulationen

Hierfür wurden zur Bestimmung der Zygotie je 2 PCR-Reaktionen pro Pflanze unter Einsatz der nach Punkt 2.3.2. gewonnenen genomischen Pflanzen-DNA durchgeführt. Der erste Ansatz enthielt ein zum linken Ende der T-DNA homologes Oligonukleotid (*left border primer*) und, je nach zuvor bestimmter Orientierung der T-DNA durch den Distributor, den jeweiligen genspezifischen *forward*- oder *reverse*-Primer. Der zweite Ansatz beinhaltete beide genspezifische Primer. Im gewünschten Fall der Homozygotie der Pflanze einer T-DNA-Insertionslinie entstand nur im ersten Ansatz ein Amplifikat, während im zweiten aufgrund der Größe der inserierten T-DNA von bis zu 5 kb kein Fragment amplifiziert werden konnte. Da diese Methode auf einem Negativnachweis beruht, wurden zur Bestätigung der Homozygotie jeweils mindestens 3 Wiederholungen beider PCR-Reaktionen durchgeführt.

2.3.13. Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden mit dem ABI 3730 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems GmbH) im Institut für Genetik der Universität zu Köln durchgeführt. Die Probenvorbereitung einschließlich Sequenzierungsreaktion erfolgte jedoch im eigenen Hause mit dem Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach einem modifizierten Protokoll der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Hierzu wurden die gereinigte DNA und folgende weitere Komponenten in einen 10 µl-Ansatz gegeben:

10-100 ng DNA
 0,5 µl Primer (10 pmol/µl)
 1 µl Puffer
 2 µl BigDye 3.1
 ad 10 µl HPLC-H₂O

Die **Sequenzierreaktion** fand im Thermocycler bei untenstehenden Bedingungen statt:

96°C	20 sec	
<hr/>		
96°C	10 sec	} 35 Zyklen
55°C	10 sec	
60°C	4 min	
<hr/>		
4°C	∞	

Anschließend wurde jeder Ansatz 1:1 mit HPLC-H₂O verdünnt und zur Analyse in das Institut für Genetik gebracht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Programme Chromas LITE Version 2.0 oder EditView Version 1.0.

2.4. Transformationsmethoden

2.4.1. Transformation von *E. coli*

2.4.1.1. Herstellung TSS-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung TSS-kompetenter Bakterien wurden nach der Methode von Chung & Miller (Chung & Miller, 1993) verfahren. Bakterien des entsprechenden Stammes (z.B. DH5α) wurden in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (New Brunswick G25, Edison/ USA) angezogen. Danach wurde 1 ml der Übernachtskultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml frischem LB-Medium überimpft und die Kultur solange bei 37°C im Schüttler inkubiert, bis eine optische Dichte bei 600nm von 0,4 und somit der Eintritt der exponentiellen Wachstumsphase erreicht war. Daraufhin erfolgte eine Aufteilung der Kultur in zwei 50 ml-Röhrchen und eine 10minütige Sedimentation derselben bei 3.000 rpm. Die Sedimente wurden in je 10ml eisgekühltem TSS-Medium

aufgenommen und vereinigt, 15 min auf Eis inkubiert, möglichst schnell à 50 µl in 1.5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und maximal 2 Monate bis zur Verwendung bei -80° C gelagert.

TSS-Medium:

10 % (w/v) PolyethylenGlycol 8000 in LB-Medium
5 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)
20-50 mM MgCl₂
20-50 mM MgSO₄
pH 6,5/ NaOH
autoklavieren

Zur Transformation wurde ein 50 µl Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe des Ligationsansatzes bzw. der Plasmid-DNA für 20 min auf Eis inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden 90 s auf 42°C erhitzt und kurz auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien bei 37°C eine Stunde leicht geschüttelt. 200 µl bis 1ml des Transformationsansatzes wurden dann auf einer Indikatorplatte bzw. einer LB-Platte mit einem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.4.2. Transformation von *A. tumefaciens*

2.4.2.1. Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* –Zellen

Als Vorkultur wurden Agrobakterien in 5 ml MGL-Medium angeimpft. Nachdem diese bis zur frühen stationären Phase gewachsen waren, wurde die Vorkultur in 100 ml MGL-Medium verdünnt, so dass die OD₆₀₀ ca. 0.04-0.08 betrug. Es folgte eine Vermehrung der Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ ~0.5. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (5 min, 4°C, 5.000 rpm, Rotor GS, Sorvall RC5B) und in 40 ml eisgekühltem 1 mM HEPES, pH 7.0 aufgenommen, erneut abzentrifugiert und in 40 ml eisgekühltem 1 mM HEPES/ 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 4°C, 5.000 rpm, Rotor SS34, Sorvall RC5B) wurden die Zellen in 2 ml 1 mM HEPES/ 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen, auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, kurz sedimentiert und in 200-400 µl HEPES/ 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. 50 µl-Aliquots der kompetenten Agrobakterien wurden direkt verwendet oder bei -80°C gelagert.

MGL-Medium:

0,5% (w/v) Bacto-Trypton
0,25% (w/v) Hefe-Extrakt
0,5% (w/v) NaCl₂
0,5% (w/v) Mannit
0,116% (w/v) Na-Glutamat
0,025% (w/v) KH₂PO₄
0,01% (w/v) MgSO₄
1 mg Biotin
ad 1 l mit bidest. Wasser
autoklavieren

Zur Transformation wurden 2 µl Plasmid-DNA (~ 200ng) zu 50 µl kompetenten Zellen gegeben. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA/Bakterienmischung in eine eiskalte 0,2 cm Küvette gefüllt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 400 Ω, 2,5 kV Puls und 8-9 ms Verzögerung (Genepulser II, Fa. Biorad). Anschließend wurde sofort 1 ml YEB hinzugegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei 28°C unter leichtem Schütteln wurden die Zellen abzentrifugiert und in 200 µl YEB aufgenommen. Es folgte das Ausplattieren der Bakteriensuspension auf entsprechende Selektionsplatten, die 2 Tage bei 28°C inkubierten.

2.4.3. Transformation von *S. cerevisiae*

2.4.3.1. Herstellung kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

10 ml YPD-Medium (2.2.2.) wurden mit einer Einzelkolonie InvSc1 beimpft und über Nacht unter Schütteln bei 30°C herangezogen. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur in einem Volumen von 50 ml YPD auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt und weitere 2 bis 4 h unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden dann auf sterile 50 ml-Polypropylenröhrchen aufgeteilt, 5 min in bei 1.500 x g sedimentiert und in 40 ml sterilem 1 x TE resuspendiert. Die Zellen wurden wie zuvor sedimentiert, in 2 ml 1 x LiOAc/0,5 x TE aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl dieser Suspension mit 1 µg Plasmid-DNA und 10 µl Träger-DNA (10 mg/ml denaturierte Heringsspermen-DNA) in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt, 700 µl 1 x LiOAc/ 40% PEG-3350/ 1 x TE hinzugegeben und das Reaktionsgefäß gründlich invertiert. Danach wurden die Transformationsansätze 30 min bei 30°C inkubiert, bevor 88 µl DMSO zugegeben und die Suspension wiederum sorgfältig durchmischt wurde. Anschließend wurden die Hefezellen einem siebenminütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und nachträglich kurz anzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 1 ml 1 x TE resuspendiert, in gleicher Weise sedimentiert, in 100 µl 1 x TE aufgenommen und auf SC/-Ura-Platten (2.2.2.) zur Selektion auf fehlende Uracil-Auxotrophie der Transformanden ausgestrichen.

1 x TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 7,4
1 mM EDTA
autoklavieren

1 x LiOAc/ 0,5 x TE:

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

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

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

2.4.4. Transformation von *A. thaliana*

Zur Transformation von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens* wurde sich der Blüten-Tauch-Methode („*floral dip*“, Clough & Bent 1998; Desfeux *et al.* 2000; Bent 2000) bedient. Zunächst erfolgte die Aussaat von Samen des *A. thaliana* Wildtyps ColO auf Erde. Im Vier- bis Sechsstadium erfolgte die Vereinzelnung von vier bis fünf Pflanzen pro Topf (\varnothing 9 cm). Nachdem die ersten Infloreszenzen eine Länge von etwa 10 cm erreicht hatten, wurden diese abgeschnitten, um die Bildung vieler nachfolgender Infloreszenzen zu fördern. Etwa eine Woche später verfügten die Pflanzen über eine genügend große Anzahl von Infloreszenzen (5-10), so dass die Anzucht der Agrobakterienkultur zur Transformation begonnen werden konnte. 500 ml YEB-Flüssigmedium einschließlich der zur Selektion notwendigen Antibiotika wurden mit 5 ml Übernachtskultur der positiv getesteten Agrobakterien-Klone beimpft und über Nacht bei 28°C geschüttelt. Nachdem eine OD_{600} von 0,8 – 1,0 erreicht war, folgte die Sedimentation der Zellen für 15 Minuten bei 2500 x g. Anschließend wurde das Sediment in 100 ml Infiltrationsmedium vorsichtig resuspendiert. Unmittelbar vor der Transformation wurde dem Transformationsansatz die oberflächendestabilisierende Substanz Silwet L-77 im Verhältnis 1:2000 und das Hormon Benzylaminopurin (BA; Stammlösung: 0,01% BA in 1 M NaOH) im Verhältnis von 1:100.000 zugesetzt. Die nun komplette Infiltrationslösung wurde in eine Plastikschaale (ca. 10,2 x 13 x 4,3 cm) eingefüllt und die bereitgestellten *A. thaliana*-Pflanzen kopfüber mit den Blüten voran unter vorsichtigen Auf- und Abbewegungen für etwa 10-20 sec hineingetaucht. Die auf diese Weise behandelten Pflanzen wurden über Nacht zunächst waagrecht gelagert, so dass überschüssige Flüssigkeit abtropfen und Schimmelbildung entgegengewirkt werden konnte. Um andererseits ein zu frühes Abtrocknen der Agrobaktériensuspension zu verhindern, erfolgte in den ersten Tagen nach der Transformation eine Abdeckung der Pflanzen mit einer Haube und mehrmaliges tägliches Besprühen mit Leitungswasser.

Infiltrationsmedium:

4,95 mg Murashige-Skoog-(MS)-Medium
50g Saccharose
ad 1l H₂O_{dest.}

2.4.4.1. β -Glucuronidase Nachweis in transgenen *A. thaliana*-Pflanzen

Der histochemische Nachweis von β -Glucuronidase Aktivität in verschiedenen Geweben transgener *A. thaliana* Pflanzen erfolgte nach der von Stomp (1992) beschriebenen Methode. Dazu wurden ganze Pflanzen oder einzelne Pflanzenteile in 15 ml Röhrchen oder 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, die mit Färbelösung gefüllt waren. Die Proben wurden zur Infiltration des Gewebes mit Färbelösung in einen Exsikkator gegeben. Es wurde mehrmals Vakuum angelegt, bis das Gewebe möglichst vollständig infiltriert war. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C. Eine Blaufärbung des Gewebes trat je nach verwendetem Pflanzenmaterial entweder schon nach wenigen Minuten bis Stunden oder nach einer Inkubation über Nacht auf. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem man die Färbelösung entfernte und durch Fixierlösung ersetzte. Nach 15 min bei 65°C in der Fixierlösung erfolgte die vollständige Entfernung des Chlorophylls durch Inkubation in 80% Ethanol bei 65°C. Das Pflanzenmaterial konnte nun direkt mikroskopisch bzw. mit Hilfe eines Binokulars analysiert und dokumentiert werden. Gefärbte Pflanzenteile wurden bis zu 6 Monaten in 80 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

GUS-Färbelösung:

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

GUS-Fixierlösung:

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

2.4.5. Transformation von Zellen aus *in vitro*- Zellkultur

2.4.5.1. Transformation von BY2-Tabakprotoplasten

Die verwendeten BY2-Suspensionskulturen gehören *Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow-2 an. Die Anzucht erfolgte über vier Tage in 70 ml BY2-Zellkulturmedium auf einem Schüttler bei 120 U/min und 22°C unter Lichtausschluss.

BY2-Zellkulturmedium:

4,3 g/l MS-Salze
30 g/l Saccharose
100 mg/l myo-Inositol
1 mg/l Thiamin-HCl
0,2 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
255 mg/l KH₂PO₄
mit KOH auf pH 5,0 einstellen und autoklavieren

Von einer vier Tage alten BY2-Zellkultur wurden für zwei Parallelansätze jeweils 20 ml mit einer weit geöffneten Plastikpipette (Corning, New York, NY, USA) entnommen und in 50 ml Falcons (Corning, New York, NY, USA) überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei RT und 200 g schonend pelletiert. Alle Zentrifugationsschritte beim Arbeiten mit Protoplasten wurden ohne Zuschaltung der Bremse der Zentrifuge durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 ml Waschlösung resuspendiert. Es folgte erneut eine wie oben beschriebene Zentrifugation und wiederum wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde vorsichtig in 13 ml Verdaulösung resuspendiert und der Ansatz in 90 mm Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht, D) überführt. Diese wurden mit Parafilm (American National Can, Chicago, Illinois, USA) versiegelt und für den Zellwandverdau über Nacht bei 22°C abgedunkelt.

Waschlösung:

0,5 % (w/v) BSA
0,01 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
50 mM CaCl₂
10 mM Na Acetat pH 5,8
0,25 mM Mannitol
sterilfiltrieren

Verdaulösung:

Waschlösung, der folgende Enzyme hinzugefügt wurden:
1 % (w/v) Cellulase Onozuka RS (Serva, Heidelberg, D)
0,5 % (w/v) Macerozyme OnozukaR-10 (Serva, Heidelberg, D)
0,1 % (w/v) Pectinase (Sigma-Aldrich, München, D)
sterilfiltrieren

Die Petrischalen mit den BY2-Tabakprotoplasten wurden nach der Inkubation über Nacht drei Mal alle 10 min vorsichtig geschwenkt, um die Zellwände von den Protoplasten zu lösen. Währenddessen wurden alle nachfolgend verwendeten Lösungen auf RT temperiert, die PEG-Lösung zur besseren Löslichkeit bei 37°C inkubiert. Die Protoplasten wurden anschließend mit einer weit geöffneten Plastikpipette vorsichtig in ein 50 ml Falcon überführt und bei RT mit 100 g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde bis auf ein kleines Restvolumen abgenommen, langsam 25 ml Waschlösung hinzugegeben und sehr vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde wie zuvor zentrifugiert und der Überstand in gleicher Weise abgenommen. Nun wurden in 1 ml Schritten insgesamt 10 ml W5-Lösung zugegeben und das Pellet dabei resuspendiert. Erneut folgte ein Pelletieren der Protoplasten wie bereits beschrieben. Nach einer möglichst vollständigen Abnahme des Überstandes wurden zum ersten Ansatz 5 ml, zum zweiten 10 ml W5-Lösung in 1 ml- Schritten zugegeben. Die Protoplastendichte konnte nun mit einer Zählkammer (Roth, Karlsruhe, D) bestimmt werden. Es wurden je Ansatz 10 µl Protoplasten in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und ausgezählt. Von jedem Ansatz wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Mit folgender Formel wurde die Zellzahl der Protoplastensuspension bestimmt:

Zellzahl = bestimmte Zellzahl x Kammerzahl (10⁴) x Volumen Zellsuspension(ml)

Die Protoplastensuspension wurde indessen für 60 min bei 4°C abgedunkelt inkubiert. Anschließend folgte wiederum ein Pelletieren der Protoplasten und das vollständige Entfernen des Überstandes. Die Protoplasten wurden nun in 1 ml Schritten vorsichtig in insgesamt 10 ml MMM-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Danach wurde die Konzentration der Protoplasten durch Zugabe von MMM-Lösung unter Berücksichtigung der ermittelten Zellzahl auf 10^6 Zellen pro 300 µl Zellsuspension eingestellt. Somit waren die Protoplasten zur Transformation bereit.

In einem 50 ml Falcon-Gefäß wurden 25 µg der zur Transfektion bestimmten Midi-Präp DNA in einem Volumen von nicht mehr als 30 µl vorgelegt. 300 µl Protoplastensuspension (10^6 Zellen entsprechend) wurden zum vorgelegten Transformationsansatz gegeben. Weiterhin wurden 300 µl PEG-Lösung tropfenweise sehr vorsichtig zugegeben, nach Möglichkeit nicht direkt auf die Zellen unter ständigem Drehen des Gefäßes. Es schloss sich eine Inkubation des Ansatzes für 20 min bei RT an. Zum Abstoppen der Transfektion wurden 10 ml W5-Lösung, in Schritten von 1 ml, 2 ml, 3ml und 4 ml vorsichtig und unter ständigem Drehen des Falcons zugegeben. Die Protoplasten wurden erneut bei 100 g und RT für 5 min zentrifugiert und der Überstand so vollständig wie möglich entfernt. Nun wurden in 0,2 ml, 0,5 ml und in 1 ml Schritten insgesamt 4 ml K3-Medium vorsichtig und unter ständigem Drehen hinzugegeben, wobei zwischen erster und zweiter Zugabe 2 min Akklimatisierungszeit eingeräumt wurde. Die Protoplasten wurden abschließend in 45 mm Petrischalen überführt, mit Parafilm verschlossen und abgedunkelt über Nacht bei 22-26°C inkubiert. An den folgenden zwei Tagen wurden die der Transfektion unterzogenen Protoplasten unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse E800; Filter: GFP (R) – BP EX 460-500, DM 505, BA 510-560) beobachtet und die subzelluläre Lokalisation dokumentiert (1-CCD Farbvideokamera KY-F1030 (JVC, Singapore) bedient durch das Software-Paket DISKUS (Technisches Büro Hilgers, Königswinter, D)).

W5-Lösung:

154 mM NaCl
125 mM CaCl₂
5 mM KCl
5 mM Glucose
mit KOH oder HCl auf pH 5,8 - 6 einstellen
sterilfiltrieren

MMM-Lösung:

15 mM MgCl₂
0,5 % (w/v) MES-KOH pH 5,8
0,5 M Mannitol
sterilfiltrieren

PEG-Lösung:

40 % (w/v) PEG 4000
0,4 M Mannitol
0,1 M Ca(NO₃)₂
mit KOH auf pH 8 - 9 einstellen
sterilfiltrieren

K3-Medium (Stammlösungen):

Makroelemente:

1,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
9 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
25 g KNO_3
2,5 g NH_4NO_3
1,34 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
ad 1l H_2O
sterilfiltrieren

Mikroelemente:

75 mg KI
300 mg H_3BO_3
1 g $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
200 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
25 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
2,5 mg $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
2,5 mg $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
ad 1l H_2O
sterilfiltrieren

Vitamine / B5-Vitamin-Mix:

100 mg Nicotinacid
100 mg Pyridoxin-HCl
1 g Thiamin-HCl
ad 1l H_2O
sterilfiltrieren

EDTA/Eisen:

7,46 g EDTA in 300 ml H_2O gelöst, gekocht
5,56 g $\text{Fe(II)SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ in 300 ml H_2O , gekocht
ad 1l H_2O
autoklavieren

Ca-Phosphat:

1,26 g $\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 200 ml H_2O gelöst
pH mit 25 % HCl auf pH 3 einstellen
autoklavieren

Naphtylessigsäure (NAA):

1 mg/ml Naphtylessigsäure in H_2O
einige Tropfen NaOH zugeben
sterilfiltrieren

Kinetin:

0,5 mg/ml Kinetin in 0,1 M HCl
sterilfiltrieren

Zusammensetzung des K3-Mediums:

100 ml Makroelemente
1 ml Mikroelemente
1 ml Vitamine
5 ml EDTA/Eisen
10 ml Ca-Phosphat
100 mg myo-Inositol
250 mg D(+)-Xylose
137 g Saccharose
mit 1 M KOH auf pH 5,6 eingestellt
1 ml NAA
0,4 ml Kinetin
sterilfiltrieren

2.4.5.2. Transformation von *A. thaliana*-Wurzelzellkultur

Zur Transformation von *A. thaliana*-Zellkulturen erfolgte eine Cokultivierung mit dem hypervirulenten *Agrobacterium*-Stamm LBA4404.pBBR1MCSvirGN54D, der das gewünschte Plasmid enthielt und für eine Übertragung der dort kodierten Information in die *A. thaliana*-Zellen sorgen sollte. Um eventuelle Silencing-Effekte zu verhindern, wurde weiterhin der Antisilencing - Stamm RK19 zu der Cokultur gegeben.

Die Kultivierung der *A. thaliana* ColO-Suspensions-Kultur erfolgte 3-7 Tage in AT-Medium unter ständiger Bewegung und Lichtausschluss bei 22°C. Diese wurde kurz vor Beginn der Agrobakterien-Zugabe 1:5 in frischem, RT-warmem AT-Medium verdünnt. Währenddessen wurden 5ml Agrobakterien-Kulturen für 24 h bei 28°C in YEB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz im Schüttelinkubator angezogen. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Bakterienzellen für 15 min bei 4000 rpm. Der Überstand wurde so vollständig wie möglich entfernt, um keine Antibiotika mit in die Zellkultur zu übernehmen. Dann folgte die vorsichtige Resuspension der Bakterien in je 1 ml AT-Medium. Zur Cokultur wurden 3 ml *A. thaliana*-Zellen mit 25 µl das Konstrukt enthaltenden Agrobakterien und 25 µl RK19-Zellen in einer Vertiefung einer 6-well-Platte gemischt und 3-5 Tage bei 25°C in Dunkelheit unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach 2-3 Tagen wurden die Kulturen auf GFP-Expression untersucht.

AT-Medium:

4,4g Murashige-Skoog-Salze
30g Saccharose
4 ml B5-Vitamin-Mix (siehe 2.4.5.2)
0,5 ml 2,4 D (2mg/ml Stammlösung)
pH 5,8 einstellen
ad 1 l H₂O_{dest.}
Autoklavieren

2.5. Präparation und Analyse von RNA

2.5.1. Isolation von RNA mit Trizol®

Für die RNA-Extraktion mit Trizol® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden 50 –100 mg Pflanzenmaterial je Eppi abgewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Material wurde entweder mit einem Bohrer oder im Mörser unter Zugabe von 1 ml Trizol-Reagenz homogenisiert. Nach dem Umfüllen in Eppendorfgefäße und einer Inkubation von 5 min bei RT wurden 200 µl Chloroform zugegeben und 15 sec geschüttelt. Es erfolgten eine kurze Inkubation von 2 min bei RT und eine Zentrifugation bei 4°C, 12.000g für 10 min. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Die Proben wurden 10 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (4°C, 7500g, 5 min). Der Überstand wurde entfernt, das RNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und an der Luft 15 bis 20 min getrocknet. Das trockene RNA-Pellet wurde in 50 - 100 µl H₂O/DEPC resuspendiert.

DEPC-Wasser:

0.2% (v/v) DEPC

kräftig schütteln oder rühren lassen, autoklavieren

2.5.2. Quantifizierung von RNA

Die Konzentration der RNA wurde wie bereits für DNA beschrieben (siehe 2.3.5.) über die Absorption bei 260 nm quantifiziert (TECAN GmbH, Salzburg, Österreich). Dazu wurde ein Aliquot der RNA-Präparation 1:50 mit DEPC-H₂O in einem Volumen von 100 µl verdünnt und die Absorption bei 260 nm sowie das Absorptionsverhältnis bei 260 und 280 nm bestimmt. Zur Berechnung der RNA-Konzentration lag folgende Formel zugrunde:

$$((E_{260}-0,0011)/0,0068)*50*0,8 = \text{ng}/\mu\text{l}$$

Um die Qualität der RNA-Präparation und die Zuverlässigkeit der Absorptionsmessung zu überprüfen, wurde die RNA auf denaturierende formaldehydhaltige Agarosegele aufgetragen. Dazu wurde das 30µg entsprechende Volumen RNA-Lösung mit 12µl Formaldehyd, 40 µl Formamid und 10 µl 10x RB-Puffer versetzt, mit DEPC-H₂O auf ein Endvolumen von 100µl gebracht und 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde je Probe 1 µl Ethidiumbromidlösung zugegeben und das vorbereitete Gel beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 150 V für 2-3 Stunden. Als Laufpuffer wurde 1x RB verwendet.

Formaldehyd-Agarosegel:

3.2 g Agarose

32 ml 10x RB

268 ml dest. Wasser

20 ml Formaldehyd (nach Erkalten auf ca. 50°C zugeben)

10x RB:

200 mM Mops (pH 7.0/NaOH)
50 mM Na-Acetat
5 mM EDTA

2.5.3. RT-PCR

Für die Synthese von Erststrang-cDNA wurde das SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) verwendet. Zunächst erfolgte jedoch ein DNase-Verdau, um jegliche DNA-Verunreinigungen zu eliminieren. Es wurden 1-2 µg Gesamt-RNA mit 10 U RNase-freier DNase (Roche) in 1x First Strand buffer 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 2.5 mM) und nachfolgende Hitzebehandlung (10 min 65 °C) inaktiviert.

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

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

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

Zu nachfolgenden RT-PCRs wurden jeweils 1-5µl der so gewonnenen cDNA eingesetzt.

2.6. Proteinbiochemische Methoden**2.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe der Minigel-Apparatur System 2050 Midget (Pharmacia, Freiburg) hergestellt. Polymerisierungsreaktionen wurden durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED gestartet. Bei der Elektrophorese waren die Kathoden- und Anodenpuffertanks voneinander getrennt und durch die Gele miteinander verbunden. Die mit Probenpuffer 1:1 versetzten Proben und der Molekulargewichtsmarker (SM0441 Prestained Marker, MBI Fermentas) wurden aufgetragen, 10 min bei 10 mA einlaufen gelassen, 2 min bei 40 mA fokussiert und bis zum Erreichen der Proteinfront am Ende des Trenngels bei 25 mA aufgetrennt.

Sammelgelpuffer (4x konzentriert):

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

Trenngelpuffer (4x konzentriert):

1.5 M Tris/HCl (pH8.8)
0.4% (w/v) SDS

Sammelgelzusammensetzung:

25% (v/v) 4 x Sammelgelpuffer
15% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) (Roth, Gel 30)
0,06% (w/v) APS
0,3% (v/v) TEMED

Trenngelzusammensetzung (12,5% Acrylamid):

25% (v/v) 4 x Trenngelpuffer
42% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1) (Roth, Gel 30)
0,05% (w/v) APS
0,05% (v/v) TEMED

Elektrodenpuffer (10x konzentriert):

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

Probenpuffer (2 x):

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

2.6.2. Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliantblau

Die Proteinfärbung erfolgte nach Weber und Osborn (1969). Dazu wurden die Färbelösungen I und II zu gleichen Teilen gemischt und die PAGE-Gele darin mindestens 30 min unter leichtem Schütteln gefärbt. Die Gele wurden dann in Entfärber überführt und bis zur Entfärbung des Gelhintergrundes unter Wechseln der Lösung entfärbt. Bei Bedarf wurde das Ergebnis sofort fotografisch dokumentiert oder auf einem Geltrockner getrocknet.

Färbelösung I:

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

Färbelösung II:

20 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

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

2.6.3. Proteinfärbung mit Silbernitrat

Die Silbernitratfärbung nach Blum *et al.* (1987) ist ca. 5- bis 10-mal empfindlicher als die Färbung mit Coomassie-Brilliantblau.

Die Gele wurden zunächst für 30 min in der Fixierlösung geschüttelt, dann dreimal je 10 min mit 50 % (v/v) Ethanol und anschließend 1 min mit 800 μM Natriumthiosulfatlösung gewaschen. Nach dreimaligem kurzen Spülen mit H_2O wurden die Gele für 20 min in der Imprägnierlösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Gele wiederum zweimal kurz mit H_2O gewaschen und dann entwickelt (Entwicklerlösung). Nach deutlichem Hervortreten der Proteinbanden wurde zweimal kurz mit H_2O gespült und der Entwicklungsvorgang durch Schütteln in der Stopplösung beendet (20 min).

Fixierlösung:

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

Entwicklerlösung:

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

Imprägnierlösung:

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

Stopplösung:

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

2.6.4. Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen (*Western Blot*)

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen (Fa. BioRad) wurde mit einer Transfer-Kammer (Carboglass, Schleicher & Schuell) im *semi-dry-blot*-Verfahren nach Khyse-Andersen (1984) durchgeführt. Der Aufbau der Apparatur und die Vorbereitung der Lösungen erfolgten gemäß der Angaben des Herstellers der verwendeten Kathoden- und Anodenpuffer (RotiBlot®-System, Roth, Karlsruhe). Vor dem Aufbau des Systems wurde die PVDF-Membran 10 s in Methanol aktiviert. Der Elektrotransfer dauerte 60-120 min bei $1\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ Gelfläche.

2.6.5. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach Beendigung des Elektrotransfers wurde die Membran zügig in Blockierpuffer überführt und mindestens 1 Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur mit Proteinen aus der Milchlösung abgesättigt. Der primäre, gegen ein Epitop des gesuchten Proteins gerichtete Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2500 bis 1:3000 in den Blockierungspuffer gegeben und 1-3 h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde dann zweimal für 10 min mit TBST-T und

einmal 10 min mit TBS gewaschen und anschließend der sekundäre, mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Antikörper einer 1:3000-Verdünnung in Blockierpuffer appliziert. Nach einer 1-2stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran wie nach Entfernen der primären Antikörperlösung gewaschen und schließlich solange in Färbelösung geschwenkt, bis Banden des blau gefärbten, unlöslichen Niederschlags aus NBT- und BCIP-Addukten sichtbar waren. Die Membran wurde dann kurz in H_2O_{dd} überführt, an der Luft getrocknet und zur besseren Konservierung in Folie eingeschweißt. Die Antikörperlösungen konnten bei $-20^{\circ}C$ eingefroren und mehrfach wiederverwendet werden.

Blockierlösung:

4% (w/v) Magermilchpulver (Heirler) in 1x TBS

Färbelösung:

10 ml Puffer A

66 μ l NBT (5% (w/v) in 70% DMF)

33 μ l BCIP (5% (w/v) in DMF)

Puffer A:

100 mM Tris/ HCl, pH 9,5

100 mM NaCl

5 mM $MgCl_2$

TBST-T:

10% (v/v) 10x TBS

0,2% (v/v) Triton X-100

0,05% (v/v) Tween 20

10x TBS:

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

1,5 M NaCl

2.6.6. Quantifizierung von Membranproteinen

Als verlässliche Methode insbesondere zur Quantifizierung von Membranproteinen gilt das BCA-Proteinbestimmungssystem, da es inert gegen Anwesenheit bestimmter Detergenzien im Lösungspuffer ist. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit das BCATM Protein Assay Kit der Firma Pierce zu Proteinbestimmungen herangezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.6.7. Expression und Gewinnung rekombinanter Membranproteine aus *S. cerevisiae*

Zur Gewinnung der gewünschten Membranproteine aus dem jeweiligen Hefeklon wurden zunächst 100ml-Kulturen desselben in SC-Medium mit 2% Glucose (siehe 2.2.2.) angezogen. Die Kulturen wurden auf zwei 50ml-Falconröhrchen aufgeteilt und für 10 min bei 2500 rpm sedimentiert, der Überstand großzügig abgegossen und das Sediment in insgesamt 1 l Induktionsmedium (2.2.2.) aufgenommen. Zum Zeitpunkt der zuvor bestimmten maximalen Expressionsstärke wurden die Zellen durch Zentrifugation von 15 min bei 3000 rpm und 4°C geerntet, das Pellet im Rücklauf resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor eine Lagerung bei –80°C für mehrere Wochen erfolgen konnte.

Die so gewonnenen Zellen einer 1l-Kultur wurden mit TE/PMSF-Puffer auf 7ml aufgefüllt und in diesem resuspendiert. Anschließend wurden jeweils ~400µl dieser Suspension in ein mit 400 mg Glasperlen gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dem TE-Puffer wurde 1/100 Volumen 100 mM PMSF zugefügt, um die während des Zellaufschlusses aus der Vakuole freigesetzten Endo- und Exoproteasen am Proteinabbau zu hindern. Der Zellaufschluss erfolgte in einem Zellhomogenisator (Fa. Braun, Melsungen) durch kräftiges Schütteln für 10 min bei 4°C. Nach 10 sec Zentrifugation bei 6000 rpm wurde der Überstand abgenommen in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, während das Gemisch aus Glasperlen und Zellsuspension durch Zugabe von 700 µl TE/PMSF gewaschen wurde. Nach kurzem Schütteln wurde erneut zentrifugiert (6000 rpm, 30 sec) und der Überstand mit dem des vorigen Schrittes vereinigt. Durch mehrfache kurze Zentrifugation (6000rpm, 30 sec) der erhaltenen Zellsuspension wurden Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen sedimentiert. Der leicht trübe Überstand wurde dabei jeweils abgenommen, das Pellet verworfen. In einem abschließenden Ultrazentrifugationsschritt bei 42.000 rpm für 20 min (Centrikon T-1065, Rotor 6513, 4°C) wurden lösliche und membrangebundene Fraktion getrennt. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierte Membranfraktion bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.6.8. Reinigung von His-getagten Proteinen mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der rekombinanten Transportproteine erfolgte bei 4°C. In einem Standardansatz wurden ca. 4 mg Hefe - Membranpellet aus einer 100 ml Kultur in 280 µl Puffer I aufgenommen. Die Solubilisierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 55 µl 20 % (w/v) n-Dodecyl-β-maltopyranosid (Endkonz. 3%). Nach 5 min wurden nochmals 370 µl Puffer I zugegeben (Endkonz. ~1,5%). Der verdünnte Solubilisierungsansatz wurde für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit zuvor äquilibriertem Ni²⁺-NTA-Agarosematerial (Volumen Material / Säule ca. 100 µl) für eine Stunde unter gleichmäßigem, langsamem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Ni²⁺-NTA-Agarose/Proteingemisch in eine mit etwas Watte gefüllte Pasteurpipette überführt, der Durchlauf in einem Eppendorfgefäß aufgefangen und die Säule mit mindestens 1,5 ml Puffer II gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte in einem Schritt in ca. 300 µl Puffer III. Eluate wurden direkt zur Rekonstitution im Verhältnis 1:1 in doppelt konzentrierte Liposomen verwendet oder mit dem gleichen Volumen 2 x SB versetzt und bis zur elektrophoretischen Auftrennung bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer I (Solubilisierungspuffer):

100 mM NaH₂PO₄ pH 7,8
50 mM NaCl
8 mM Imidazol

Puffer II (Waschpuffer):

100 mM NaH₂PO₄ pH 7,8
8 mM Imidazol
0.06% (w/v) n-Dodecyl- β -maltopyranosid

Puffer III (Elutionspuffer):

250 mM Imidazol
0.06% (w/v) n-Dodecyl- β -maltopyranosid

2.6.9. Reinigung des Phospholipids

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

2.6.10. Rekonstitution von Membranproteinen

Der Einbau der Membranproteine in künstliche Membranvesikel erfolgte nach der Frier-Tau Methode von Kasahara und Hinkle (1977). Für die Präparation der künstlichen Membranvesikel wurde Liposomenpuffer mit 10 % (w/v) gereinigtem Phospholipid versetzt und zur Vesikelbildung für 3 min auf Eis beschallt (Branson Sonifier 250, *duty cycle* 50%, *output control* 5). Im Anschluss wurden jeweils 100 μ l eines Protein/Detergenz-Gemisches mit 750 μ l Liposomenlösung versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die schockgefrorenen Proteoliposomen wurden für einige Tage bei -80°C gelagert oder sogleich auf Eis aufgetaut und für 30 Pulse beschallt (Branson Sonifier 250, *duty cycle* 30%, *output control* 5). Danach wurde das nicht in die Proteoliposomen eingebaute, externe Substrat über eine Größenausschluss-Chromatographie auf einer mit PD10-Puffer äquilibrierten Sephadex G-25-M Säule abgetrennt. Die Liposomen wurden mit PD10-Säulenpuffer in einem Volumen von 950 μ l eluiert. Die Liposomen wurden nun direkt für die Transportversuche eingesetzt.

Liposomenpuffer:

100 mM KH₂PO₄, pH 7,6
50 mM KaliumGluconat
0,2 mM Substrat
Negativkontrolle: ohne Substrat

PD10-Säulenpuffer:

10 mM KH_2PO_4 pH 7,6
50 mM KaliumGluconat
100 mM Natriumgluconat

2.6.11. Messung der Transportaktivität von Nukleotidzucker-Transportern**Aufnahme einer Kinetik**

Das Prinzip dieser Messung beruht auf der Eigenschaft dieser Transporterklasse, Nukleotidzucker und korrespondierendes Nukleotidmonophosphat im Gegentausch zu transportieren. Indem man eine Vorbeladung der Proteoliposomen mit verschiedenen Nukleotidzuckern vornimmt, während im Außenmedium markiertes Nukleotidmonophosphat angeboten wird, sollte ein Gegentausch beider Substrate den Influx des markierten Nukleotidmonophosphats bewirken und letztendlich die Identifizierung von Nukleotidzucker/Nukleotidmonophosphat-Substratpaaren möglich machen. Die Vorbeladung der Liposomen erfolgte mit jeweils 100 μM der jeweiligen Nukleotidzucker.

Pasteurpipetten wurden mit wenig Watte verstopft, mit 1,5 ml einer dichten Suspension von Anionenaustauscherharz (Dowex AG 1-X8, 100-200 mesh, BioRad, München) in H_2O gefüllt und mindestens zweimal mit 1 ml 400 mM Sorbitol äquilibriert.

Zur Herstellung der Substratlösung wurde als Gegentauschsubstrat ein $2-4 \times 10^5$ cpm entsprechendes Volumen der ^{33}P -markierten Nukleotidmonophosphatlösung (UMP, CMP oder GMP; Hartmann Analyticals) mit 0,4 mM kaltem Substrat und H_2O entsprechend der Anzahl der gewünschten Transportexperimente gemischt. Um die exakte spezifische Aktivität der Substratlösung bestimmen zu können, wurden jeweils 2 Aliquots derselben vor Beginn des Transportexperiments in Szintillationsröhrchen gegeben. Danach wurden 850 μl der Proteoliposomen-Suspension (2.6.10) zum Zeitpunkt $t=0$ sec mit 45 μl Substratlösung versetzt. Nach definierten Zeiten (15, 30, 60 und 120 sec) wurden je 200 μl der Liposomen aus dem Reaktionsansatz entnommen und zum Abstoppen des Transportes auf eine mit Dowex-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule (Biorad, Dowex AG 1x8, Acetatform, 200-400 mesh, 0.5 x 4 cm Säulengröße) gegeben. Anschließend wurden die Liposomen sofort in zwei Schritten (2 x 500 μl mit 400 mM Sorbitol) in ein Szintillationsröhrchen eluiert, wobei das nicht eintransportierte Substrat auf der Säule verblieb. Die in die Liposomen transportierte Aktivität sowie die Aktivität der reinen Substratlösung wurden nach Zugabe von 4,5 ml Szintillationspuffer (Rotiszint Eco Plus, Roth) im Szintillationszähler (LS-6000TA, Beckmann) bestimmt. Die ans Austauscherharz gebundene Restradioaktivität wurde mit 3 x 1 ml 1 M HCl eluiert und entsorgt.

Substratlösung:

10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ [^{33}P]-UMP, CMP oder GMP
0,4 mM nicht-markiertes UMP, CMP oder GMP

Dowex-Puffer:

400 mM Sorbitol

2.6.12. Messung der Transportaktivität pflanzlicher Gallensäure-transporter-Homologe

Herstellung und radioaktive Markierung des putativen Substrates Ketomethylthio-butyrat (KMTB)

Die Herstellung und gleichzeitige radioaktive Markierung von KMTB sollte durch Des- bzw. Transaminierung von ^{35}S -markiertem Methionin erfolgen. Hierfür wurden parallel 2 verschiedene Strategien verfolgt: 1.) die Transaminierung unter Einsatz der heterolog in *E. coli* überexprimierten und gereinigten Aminotransferase BCAT4 aus *A. thaliana* und 2.) die oxidative Deaminierung mittels einer Aminosäure-Oxidase (Ogier *et al.*, 1993, modifiziert nach Meister, 1952). Nachstehend sind die Ansätze für beide Reaktionen aufgeführt:

- 1.) 7 μl ^{35}S -Methionin = 100 μCi
10 mM Methionin
120 mM α -Ketoglutarat
100 μM PLP
5 mM DTT
1 U GDH
30 μl BCAT4-Eluat = ca. 50 μg Protein
10 mM NADH
0,1 M Tris pH 8,0
üN bei 33 °C

- 2.) 7 μl ^{35}S -Methionin = 100 μCi
0,5 μl 0,1 M Methionin = 0,5 mM
1 U Aminosäure-Oxidase
11 U Katalase
0,14 μl 0,1M DTT = 0,14 mM
0,2 M Tris pH 7,5
üN bei 33 °C

Die Abtrennung des auf diese Weise hergestellten KMTBs vom Edukt Methionin erfolgte über Kationen-Austausch-Chromatographie (Dowex 50-Säulen, H^+ -Form), wobei zur Elution 5mM NH_4OH Verwendung fand. Das an das Säulenmaterial gebundene Methionin wurde nachfolgend mit 5M NH_4OH -Lösung heruntergewaschen. Die Überprüfung der Reinheit des KMTBs erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie unter Einsatz von Silicagel-Platten und dem Laufmittelgemisch 1-Butanol-Essigsäure-Wasser im Verhältnis 4:1:2. Zur Visualisierung wurden die gut getrockneten Platten einer Autoradiographie zugeführt und anschließend mit 1%iger Ninhydrin-Lösung gefärbt.

Transportexperimente: Aufnahme einer Kinetik

Prinzipiell wurde hierbei vorgegangen wie unter Punkt 2.6.10. bzw. 2.6.11. beschrieben. Abweichend wurde als PD10-Puffer und zur Herstellung der Liposomen der sogenannte Puffer B verwendet und diese mit 25 mM kaltem KMTB vorbeladen. Zum Transport wurde eine externe Konzentration von 50 μM kaltem KMTB eingestellt und ein 2×10^5 counts entsprechendes Volumen an heißem Tracer-KMTB zugesetzt. Die Elution der Liposomen erfolgte mit 0,2 M Natriumacetatpuffer zu denselben Zeitpunkten, wie auch unter 2.6.11. gewählt : nach 15, 30, 60 und 120 Sekunden.

Puffer B (Liposomen- und PD10-Puffer):

120 mM HEPES
50 mM NaCl
1 mM EDTA
pH 7,4

Substratlösung:

$\sim 1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ [^{35}S]- KMTB
50 μM nicht-markiertes KMTB

Dowex-Puffer:

0,2 M Na-Acetat

2.7. Internetadressen

NCBI Homepage

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

TAIR

<http://www.arabidopsis.org>

GENEVESTIGATOR

<https://www.genevestigator.ethz.ch/>

ARAMEMNON

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

The Arabidopsis Book

www.aspb.org/publications/arabidopsis/

SIGnAL (T-DNA Insertionslinien)

<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>

GABI-Kat (T-DNA Insertionslinien)

www.mpiz-koeln.mpg.de/GABI-Kat/

Primer3 (Software für Primerdesign)

frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3

ExpressionAngler

http://bbc.botany.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi

Ergebnisse

3. Funktionelle Charakterisierung von Transportern der AtKT-Familie in *Arabidopsis thaliana*

3.1. Expressionsstudien an ausgewählten Mitgliedern der KT-Genfamilie

Wie in der Einleitung dargestellt, sollte eine detaillierte Charakterisierung der Mitglieder der KT-Familie zur Aufklärung der allgemeinen Funktion von den plastidären Phosphattranslokatoren verwandten Proteinen in *A. thaliana* führen.

Die KT-Unterfamilie der NST/pPT homologen Proteine in *A. thaliana* besteht aus insgesamt neun Mitgliedern: At4g39390 (AtKT1), At1g21070 (AtKT2), At5g42420 (AtKT3), At1g06890 (AtKT4), At5g57100 (AtKT5), At1g34020 (AtKT6), At5g55950 (AtKT7), At4g09810 (AtKT8) und dem UDP-Galactose-Transporter UDP-GalT2 (At1g76670, Bakker et al, 2005). Im Folgenden werden die Ergebnisse von *in silico* und *in planta* Expressionsanalysen ausgewählter Mitglieder vorgestellt.

3.1.1. Sequenzanalysen auf DNA- und Proteinebene

Die diese Proteine kodierenden Gene weisen eine sehr vergleichbare Exon-Intron-Struktur bezüglich deren Position und Anzahl auf (Abb. 6). Alle KT-Gene sind aus 5 bzw. 4 korrespondierenden Exons bzw. Introns zusammengesetzt. Im Fall von KT 4, 5 und 7 sind die Gene um jeweils zwei weitere Exons und Introns erweitert.

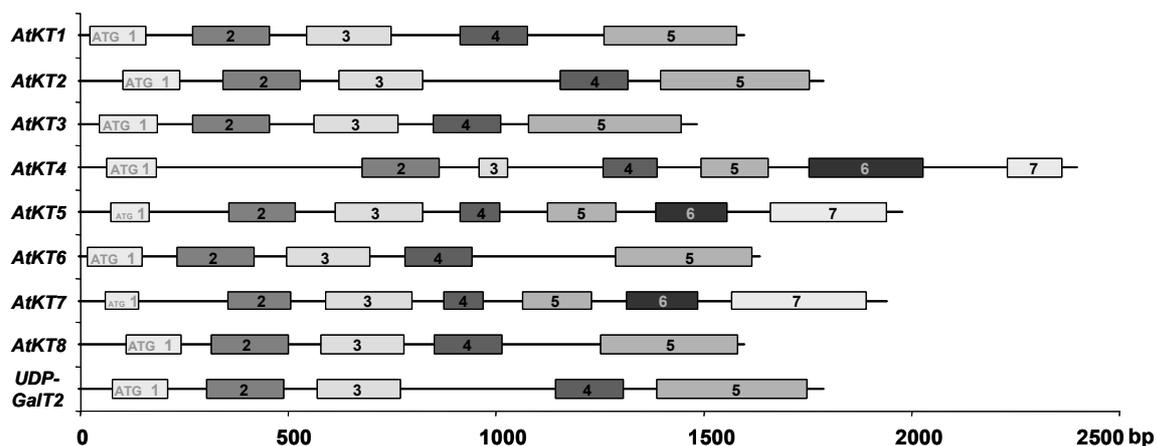


Abb. 6: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur von KT-Transporter kodierenden Genen. Exon-Sequenzen sind als grau gefüllte Balken dargestellt, die zur Verdeutlichung der Reihenfolge unterschiedliche Grautöne erhalten haben. Intron-Sequenzen sind als Verbindungslinien zwischen den Balken angezeigt.

Die abgeleiteten Proteinsequenzen zeigen einen Homologiegrad von 28 bis 78 % auf Gesamtproteinebene, jedoch werden insbesondere in den Randbereichen vorhergesagter Transmembranspannen weitaus höhere lokale Homologien erreicht (Abb. 7). An Position 273 und 274 ist ein Lysin- bzw. Threoninrest konserviert. Beide werden als Teil der putativen Substratbindestelle der plastidären Phosphattranslokatoren und ihrer homologen Proteine diskutiert und zur Bezeichnung dieser Unterfamilie verwendet (KT).

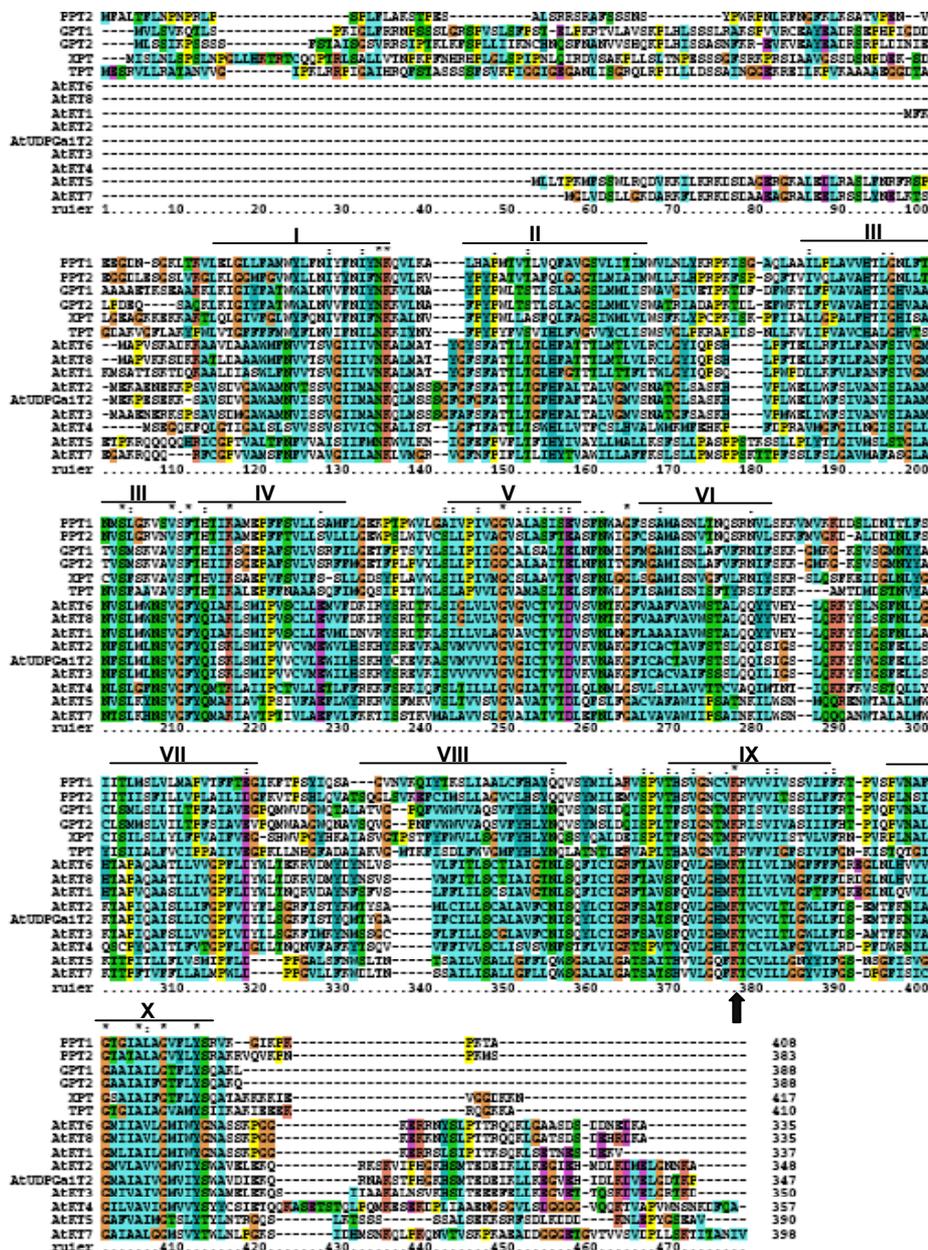


Abb. 7 : Aminosäuresequenzvergleich von plastidären Phosphattranslokatoren und Mitgliedern der KT-Proteinfamilie aus *A. thaliana*. Die Lage der vorhergesagten Transmembrandomänen ist durch Linien gekennzeichnet (I-X). Die namensgebende Aminosäurefolge KT ist durch einen Pfeil markiert.

Wie für die Phosphattranslokatoren und die Nukleotidzuckertransporter werden für die Proteine der KT-Familie hohe Anteile hydrophober Aminosäuren vorhergesagt, die sich auf 7-10 Domänen konzentrieren. Als subzelluläre Lokalisation der somit stark hydrophoben Membranproteine der KT-Familie wird *in silico* von mehreren Programmen das sekretorische System der Zelle vorhergesagt, mit Ausnahme von KT5, welches mitochondrial lokalisiert sein soll (ARAMEMNON database 3.2; Schwacke *et al.*, 2003; Tabelle 5). Ein weiteres Indiz für eine organellare Lokalisation von KT5, aber auch KT7, ist die auch im Sequenzvergleich erkennbare putative N-terminale Transitpeptidsequenz.

Tabelle 5: Zusammenfassung von *in silico* Vorhersagen zu Proteinen der KT-Familie (Quelle ARAMEMNON)

Protein	Gesamthomologie auf AS-Ebene in %	Anzahl TMD	Vorhersage der intrazellulären Lokalisation
AtKT1	—————	9	Sekretorisches System
AtKT2	48	7	Sekretorisches System
AtKT3	50	9	Sekretorisches System
AtKT4	39	9	Sekretorisches System
AtKT5	28	8	Mitochondrien
AtKT6	77	10	Sekretorisches System
AtKT7	30	10	Sekretorisches System
AtKT8	78	10	Sekretorisches System
UDP-GalT2	49	8	Sekretorisches System

3.1.2. Expressionsanalyse auf Basis von *Microarray*-Daten

Da die Expression fast aller *A. thaliana*-Gene durch DNA-*Microarrays* eingehend bezüglich der Organspezifität, Entwicklungsstadien und nach der Einwirkung von Stressbedingungen analysiert wurde (GENEVESTIGATOR www.genevestigator.org, Zimmermann *et al.*, 2004), standen Expressionsdaten für die Gene der *KT*-Familie bereits zur Verfügung. Obwohl ein direkter Vergleich der angezeigten Werte zwischen verschiedenen Genen nicht möglich ist, lassen sich räumliche und zeitliche Coexpressionen von Genen auf diesem Wege einfach erkennen. Die Mitglieder der *KT*-Genfamilie werden demnach hauptsächlich in zwei Organen der Pflanze exprimiert: *KT2*, -4, -7 und -8 in Staubblättern bzw. Pollen der Blüte, während die Expressionsmaxima von *KT1*, -3, -6 und *UDP-GalT2* in den unterschiedlichen Geweben der Wurzel erreicht werden. Es können jedoch für alle Gene ebenfalls mehr oder weniger hohe Level an basaler Expression in jedem Organ detektiert werden (Abb. 8).

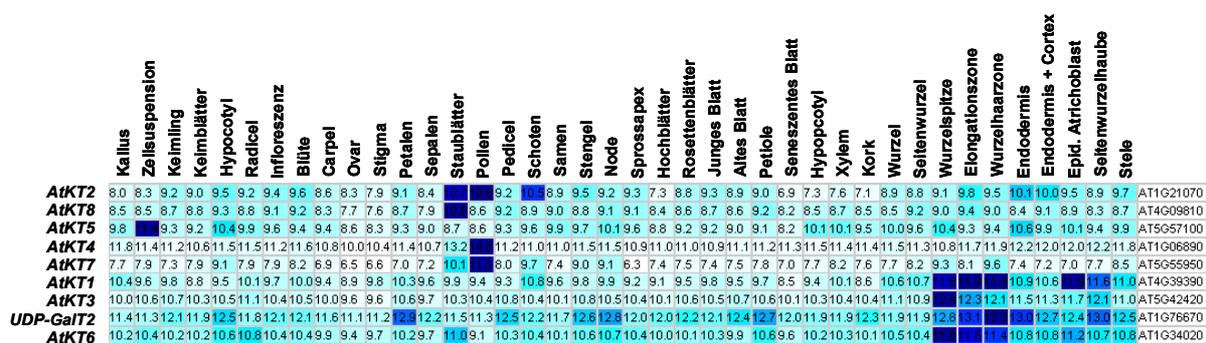


Abb. 8: Organspezifische Expression der *KT*-Gene als Ergebnis von *Microarray*-Experimenten aus der Datenbank GENEVESTIGATOR. Es wurde die Funktion *Meta-Analyzer* Unterpunkt *Organ Specificity* verwendet. Die Expressionsstärke wird in Blauabstufungen von hell = schwach exprimiert bis dunkel = stark exprimiert dargestellt. Die in den Zellen stehenden Zahlen geben die Signalintensitäten als $\log_2(n)$ an.

Ein weitergefasster Vergleich der Expressionsmuster unter Einbeziehung weiterer *pPT*- und *pPT*-homologer Gene aus den KVAG- und KD-Familien gibt ein ähnliches Bild wieder (Abb. 9).

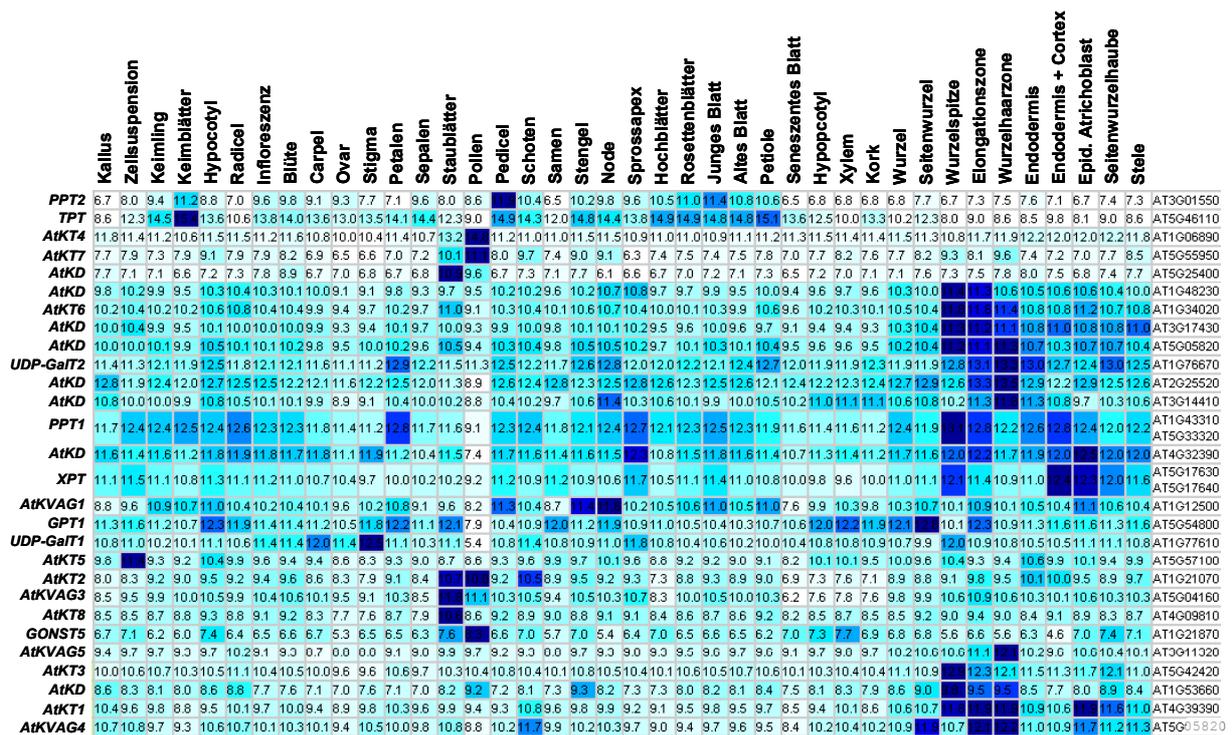


Abb. 9: Organspezifische Expression von *pPT*- und *pPT*-homologen Genen der Familien KT, KD und KVAG als Ergebnis von *Microarray*-Experimenten aus der Datenbank GENEVESTIGATOR. Es wurde die Funktion *Meta-Analyzer* Unterpunkt *Organ Specificity* verwendet. Die Expressionsstärke wird in Blauabstufungen von hell = schwach exprimiert bis dunkel = stark exprimiert dargestellt. Die in den Zellen stehenden Zahlen geben die Signalintensitäten als $\log_2(n)$ an.

Auch hier ist eine mehr oder weniger starke, ubiquitäre Expression fast aller Gene erkennbar, doch fällt eine deutliche Clustering der Expressionsmaxima selbst von Genen, die verschiedenen *pPTh*-Familien angehören, in zwei Organen auf. So werden neben den Genen *KT2*, *4*, *7* und *8* auch *KVAG3*, *GONST5* und *1* Mitglied der *KD*-Familie besonders stark in Pollen und Staubblättern exprimiert. Eine weitaus größere Gruppe von Genen, darunter wiederum Vertreter aller *pPT*-homologen Familien, weisen ihre maximale Expressionsstärke in den verschiedenen Wurzelgeweben auf. Dies deutet auf einen hohen Grad von Redundanz hin, der wiederum für die Übernahme essentieller Funktionen dieser Proteine in Blüte und Wurzel spricht.

Um die Ergebnisse der *Microarray*-Analysen zu verifizieren und zu erweitern, wurden detailliertere Expressionsstudien für die ausgewählten *KT*-Genfamilienmitglieder *1*, *2*, *3* und *UDP-GalT2* durchgeführt.

3.1.3. Expressionsanalyse mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR

Für die semiquantitative RT-PCR zur Bestätigung der Expressionsmuster von *KT1* - 3 und *UDP-GaIT2* wurden als Template cDNAs verschiedener Gewebe des Ökotyps ColO eingesetzt. Als konstitutiv exprimiertes Kontrollgen wurde *Actin2* gewählt (Abb. 10). *UDP-GaIT2* weist eine durchgehend starke Expression in allen getesteten Organen auf, da bereits nach 30 Zyklen hohe Signalintensitäten beobachtet wurden. Für alle anderen *KT*-Gene sind mindestens 35 Zyklen notwendig, um vergleichbare Aussagen über die Expressionsstärke in den einzelnen Organen treffen zu können. *KT1* wird somit ebenfalls, wenn auch schwächer, ubiquitär exprimiert, wobei in Blüte und Wurzel leicht erhöhte Signalintensitäten zu verzeichnen sind. Deutliche Expressionsmaxima in diesen beiden Organen liegen für *KT2* vor, welches zusätzlich in Schoten stark exprimiert wird. *KT3* weist dagegen eine stärkere Expression in Hochblättern und Stengel auf, wird jedoch ebenfalls in der Wurzel exprimiert.

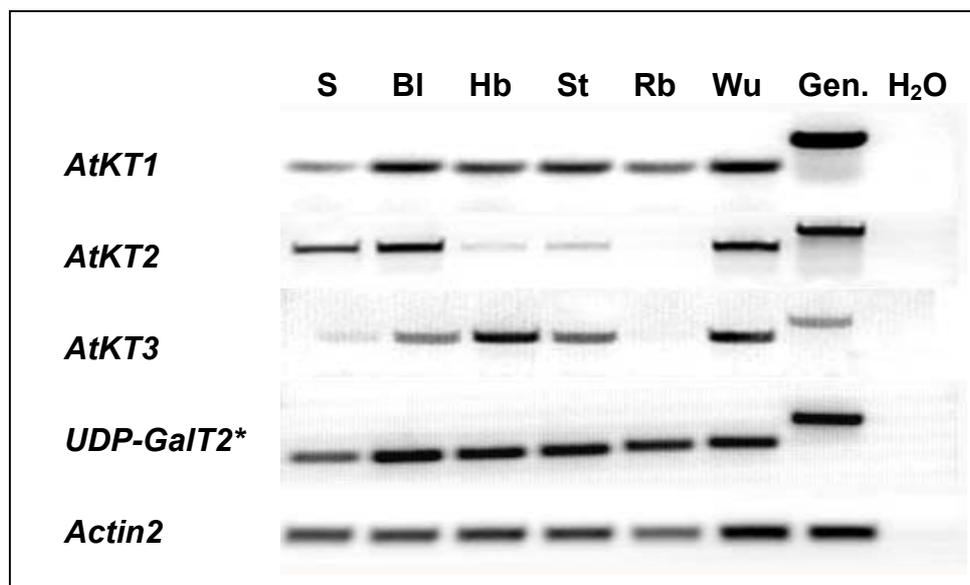


Abb. 10: Organspezifische Expression der *KT*-Gene 1, 2, 3 und *UDP-GaIT2* mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte *Actin2*-Gen verwendet. S: Schoten, Bl: Blüte, Hb: Hochblätter, St: Stengel, Rb: Rosettenblätter, Wu: Wurzel, Gen.: Kontrolle genomische DNA (ungespleisst), H₂O: Wasserkontrolle

* 30 Zyklen, alle anderen 35 Zyklen

3.1.4. Expressionsanalyse mit Hilfe von Promotor::GUS- Fusionen

Um das zeitliche und räumliche Expressionsmuster der ausgewählten *KT*-Gene *in planta* untersuchen zu können, wurden translationale Fusionen der jeweiligen Promotoren der Gene mit dem *uidA*-Gen hergestellt, welches für die *E. coli* β -Glucuronidase (GUS; Jefferson, 1987) kodiert. Hierfür wurden die durch ARAMEMNON definierten Promotorbereiche zusammen mit den jeweiligen Anfangsbereichen des 1. Exons mittels *Gateway*-Klonierung in den Vektor pGWB3 vor das *GUS*-Gen geschaltet. Das in diesem Vektor enthaltene *nptII*-Gen vermittelt Kanamycinresistenz, welche somit zur Selektion der Pflanzentransformanten genutzt werden kann. Für jedes Promotorkonstrukt wurden mindestens 3 unabhängige Linien isoliert, die nach GUS-Färbung über mehrere Generationen ein stabiles Expressionsmuster aufwiesen (Abb. 11). *KT1* zeigt starke Expression in jungen Blättern, während diese in älteren auf die Blattnervatur begrenzt ist. Intensive GUS-Aktivität kann weiterhin in jungen, sich differenzierenden Geweben des Stengels und der Wurzel festgestellt werden, besonders in der Wurzelspitze, der Wurzelelongationszone und den Regionen, in denen die Seitenwurzeln angelegt sind. In den Geweben der Blüte findet sich *KT1*-Expression in der Narbe und den Filamenten der Staubblätter, wohingegen Sepalen, Petalen, Antheren und Stigma keinerlei Färbung aufweisen. In Schoten ist GUS-Aktivität hauptsächlich in der Abscissionszone zu erkennen, in keinem Fall jedoch in den Samen. Ubiquitär und stark exprimiert wird *UDP-GaIT2*, indiziert durch intensive Färbung sowohl in jungen als auch in alten Blattgeweben, in Blüte, Schote, Stengel und Wurzel. Besonders die jungen Blütengewebe lassen hohe Expressionslevel erkennen, die mit der Zeit absinken, so dass in älteren Blüten nur noch die Sepalen, die Filamente der Staubblätter und die Narbe gefärbt wurden. Die Wurzel weist eine durchgehende Blaufärbung auf, dennoch sind Wurzelspitzen und Elongationszonen nicht auffallend intensiv gefärbt. *UDP-GaIT2*-Expression in Schoten bleibt auf die Abscissionszone derselben beschränkt, auch in den Samen ist keine Blaufärbung detektierbar. *KT2* dagegen wird in Samen exprimiert, jedoch weniger in Blättern jeden Alters und der Wurzel. Hohe GUS-Aktivität fällt im Stengel und insbesondere in den Antheren der Staubblätter, den Pollen und dem gesamten Gynözeum auf. Sepalen, Petalen und Filamente zeigen keine Färbung. Die Expression von *KT3* liegt in den meisten Geweben auf einem nur geringen Niveau.

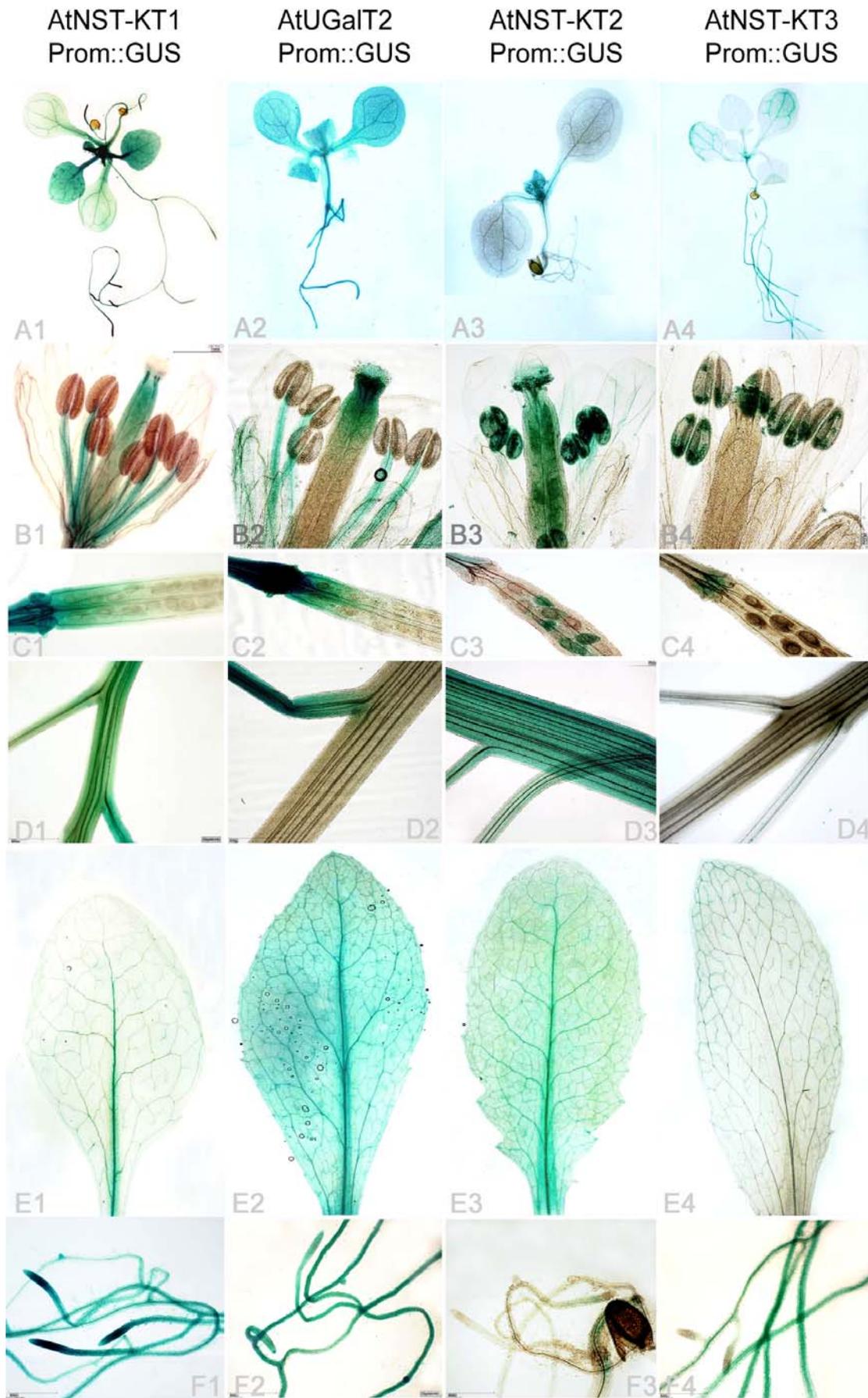


Abb. 11 : Vergleichende Darstellung der Organe GUS-gefärbter Pflanzen, die KT-Promotor::GUS-Konstrukte exprimieren. Reihe A 1-4: Keimlinge im 2-4-Blattstadium; Reihe B 1-4: reife Blüte; Reihe C 1-4: Abscissionszone von Schoten inklusive Samen; Reihe D 1-4: junger Stengel; Reihe E 1-4: Rosettenblätter; Reihe F 1-4: junge Wurzeln; AtNST-KT1: AtKT1; AtUGalT2: AtUDP-GalT2; AtNST-KT2: AtKT2; AtNST-KT3: AtKT3

Blätter unterschiedlichen Alters, Stengel und Schoten mit Samen weisen nur schwache GUS-Aktivität auf, wohingegen in Wurzel und Blüte intensivere Färbungen zu erkennen sind. Bemerkenswert ist hierbei die Begrenzung der *KT3*-Expression auf den Pollen innerhalb der Blüte und die schon ausdifferenzierten Teile der Wurzel.

3.2. Analyse von T-DNA-Insertionsmutantenlinien, in denen ausgewählte *KT*-Gene betroffen sind

3.2.1. Isolierung homozygoter T-DNA-Insertionsmutantenpflanzen

Mit Hilfe der reversen Genetik ist die Aufklärung der Funktion von Proteinen möglich (Chang *et al.*, 1993; Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). Für alle ausgewählten *KT*-Gene wurden T-DNA-Insertionsmutantenlinien in den Kollektionen Gabi-Kat und SALK gefunden (Tab. 6).

Tabelle 6: T-DNA-Insertionslinien, die in den genannten *KT*-Genen betroffen sind

Protein	At-Nummer	Insertionslinie	Bezeichnung
AtKT1	At4g39390	Gabi-Kat 827C11	<i>kt1-1</i>
AtKT2	At1g21070	SALK_125196	<i>kt2-1</i>
AtKT3	At5g42420	SALK_134294	<i>kt3-1</i>
UDP-GalT2	At1g76670	Gabi-Kat 582F05	<i>ugt2-1</i>

Alle Pflanzenlinien wurden durch PCR auf ihren Allelzustand hin überprüft. Dabei wurde die Insertion der T-DNA im entsprechenden Genlocus (Reaktion M) und die Unterbrechung beider Allele (Reaktion W) nachgewiesen. Für jede *KT*-Linie wurden mit dieser Methode homozygote Pflanzen isoliert (Abb. 12B).

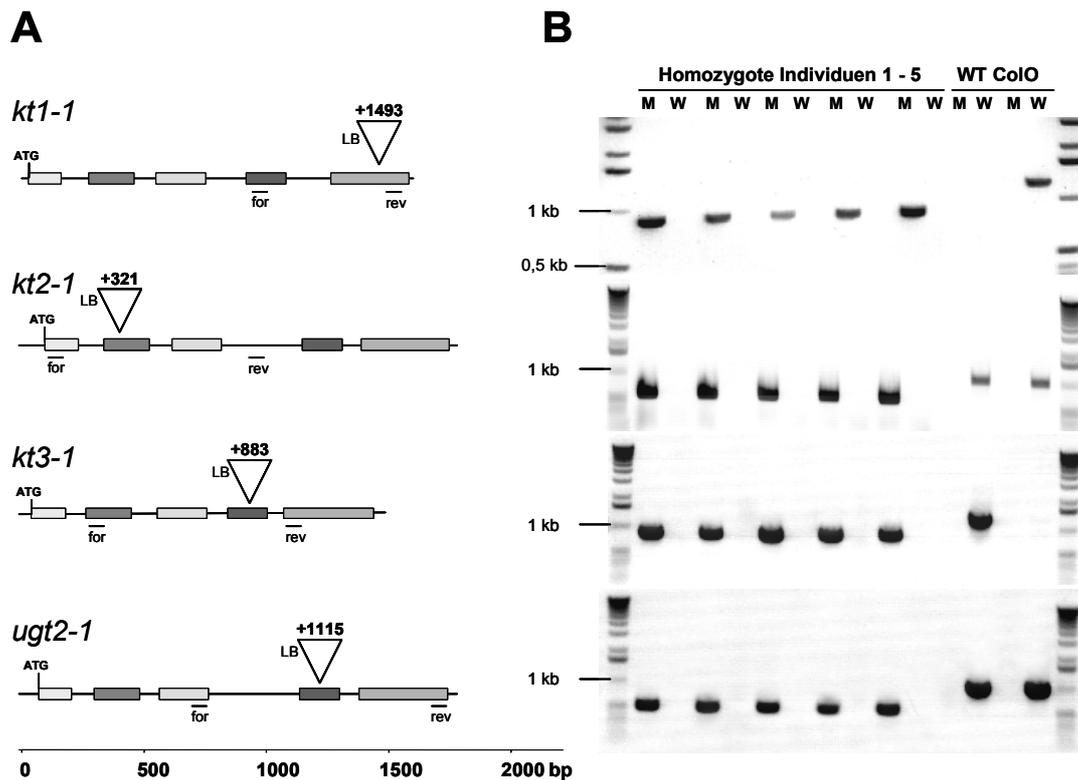


Abb. 12: Identifizierung homozygoter KT-T-DNA-Insertionslinien. A) Schematische Darstellung der Genloci mit Exons und Introns sowie identifiziertem Insertionsort relativ zum ATG und Primerbindestellen LB (*left border* der T-DNA), for + rev (genspezifische Primer); **B)** Ergebnis der PCR-Reaktionen für je 5 homozygote Pflanzen und je 2 Wildtyppflanzen (WT CoIo); Reaktion M mit Kombination der Primer LB + for; Reaktion W mit Kombination der Primer for + rev; DNA-Marker: 1 kb ladder Invitrogen siehe Anhang 8.3.

3.2.1. Verifizierung des Genausfalls mittels RT-PCR

Üblicherweise führt eine T-DNA-Insertion zum Ausfall des Genprodukts bzw. zu dessen Funktionsunfähigkeit. Um dies zu überprüfen, wurden die homozygoten Pflanzen mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von Transkripten hin getestet. Hierzu kamen Primer zum Einsatz, die in Exonbereichen abgeleitet wurden und den Insertionsort flankieren.

Wie in Abb. 13 gezeigt, konnte in den Linien *kt1-1*, *kt2-1* und *ugt2-1* die Abwesenheit der korrespondierenden Transkripte bestätigt werden. In Linie *kt3-1* wurden dagegen noch Transkripte nachgewiesen, woraufhin keine weitergehenden Untersuchungen an dieser Linie erfolgten.

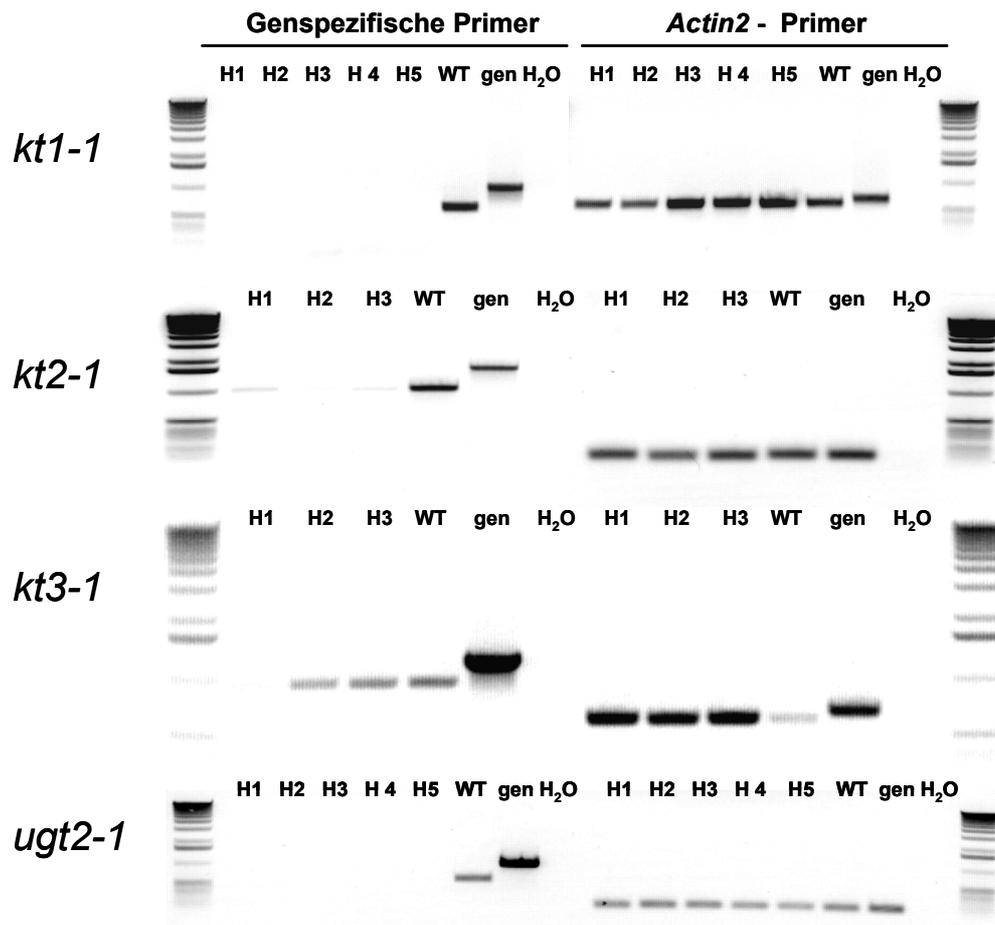


Abb. 13: Überprüfung homozygoter *KT*-T-DNA-Insertionslinien auf *KT*-Expression mittels RT-PCR. RNA aus Blattrosetten wurde in cDNA umgeschrieben und diente als Template, das mit den angegebenen Primerkombinationen für jeweils 35 Zyklen amplifiziert wurde. H1, H2 usw.: homozygote Pflanze Nummer 1, 2 usw.; Als Positivkontrolle diente cDNA des Wildtyps ColO (WT) und genomische DNA (gen) sowie H₂O als Negativkontrolle.

3.2.2. Bestimmung der Anzahl der Insertionen mittels *Southern-Blot*

Um sicherzustellen, dass ein möglicher Phänotyp tatsächlich auf den Ausfall eines *KT*-Gens zurückzuführen ist, wurde mit Hilfe von *Southern-Blot*-Analysen die Anzahl der T-DNA-Insertionen in den einzelnen *Knock out*-Linien bestimmt. Hierfür wurde eine Sonde, die gegen die *Left Border*-Region der T-DNA gerichtet ist, eingesetzt. Ein Nachweis mehrerer Fragmente zeigt das Vorhandensein mehrerer Insertionen im Genom an und damit die mögliche Inaktivierung weiterer Gene. Aus Abb. 14 geht hervor, dass alle *KT-Knock-out*-Linien mindestens 2 oder mehr T-DNA-Insertionen

aufweisen. Für die Linie *ugt2-1* konnte trotz mehrfach wiederholter Versuche kein Ergebnis erhalten werden.

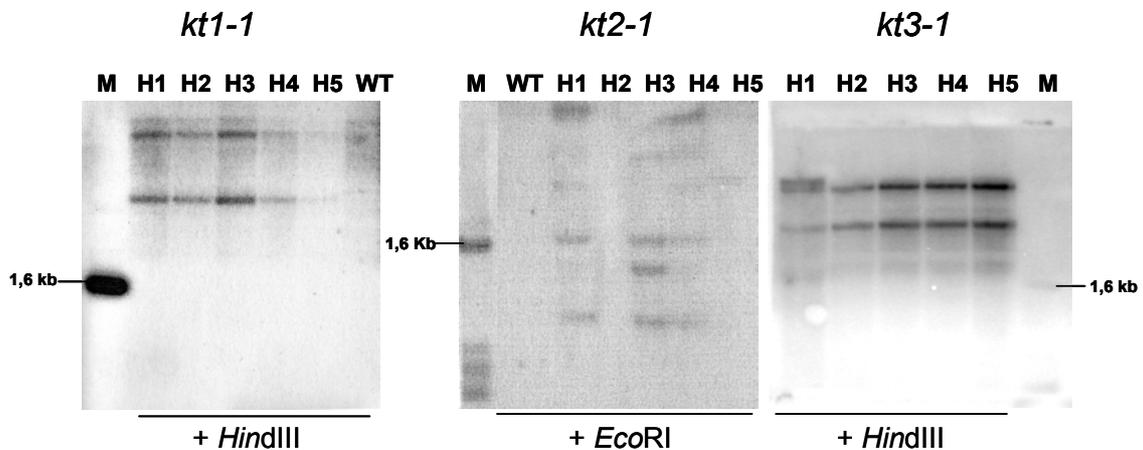


Abb. 14: Southern-Blot-Analyse homozygoter KT-T-DNA-Insertionslinien. Isolierte genomische DNA wurde mit *EcoRI* oder *HindIII* verdaut, einer Agarosegelelektrophorese unterzogen, geblottet und mit einer radioaktiv markierten T-DNA-spezifischen Sonde hybridisiert; H1, H2 usw.: homozygote Pflanze Nummer 1, 2 usw.; WT: Kontrolle Wildtyp ColO; M: DNA-Marker (Invitrogen, siehe Anhang 8.3), dessen 1,6 kb-Bande ebenfalls mit der Sonde hybridisiert

Obwohl die *Southern-Blot-Analyse* das Vorhandensein mehrfacher T-DNA-Insertionen aufzeigte, wurden die Mutanten einer physiologischen Analyse unterzogen, da durch die Komplementation mit den entsprechenden Genkonstrukten der kausale Zusammenhang zwischen dem Ausfall der KT-Proteine und den evtl. zu beobachtenden Phänotypen hergestellt werden kann.

3.2.3. Phänotypische Charakterisierung von KT-T-DNA-Insertionsmutanten

Sowohl unter den Anzuchtbedingungen im Gewächshaus (siehe 2.2.3.) als auch während der Kultivierung unter Laborbedingungen konnten bei keiner Linie morphologische Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 15). Ebenso gleichen Keimungsverhalten und weitere Entwicklungsprozesse (z.B. Blühzeitpunkt oder Einsetzen der Seneszenz) denen von Wildtyppflanzen. Da beispielsweise *KT1* hauptsächlich in der Wurzel exprimiert wird, wurde das Wurzelwachstum von Pflanzen der Linie *kt1-1* mit dem von Wildtyppflanzen verglichen. Es konnten jedoch keine Unterschiede beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Veränderung metabolischer Parameter muss sich allerdings nicht in sichtbaren Veränderungen der Morphologie und Anatomie manifestieren. Da *UDP-GalT2* für einen Nukleotidzuckertransporter kodiert und deren Bedeutung für die Zusammensetzung der Zellwand diskutiert wird (Bakker *et al.* 2005), wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. R. Tenhaken in Salzburg eine Analyse der Zellwandbestandteile am Beispiel einer Linie (*kt1-1*) durchgeführt (Abb. 16). Die Bestimmung des Anteils verschiedener Zucker ergab aber keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Knock-out*-Pflanzen.

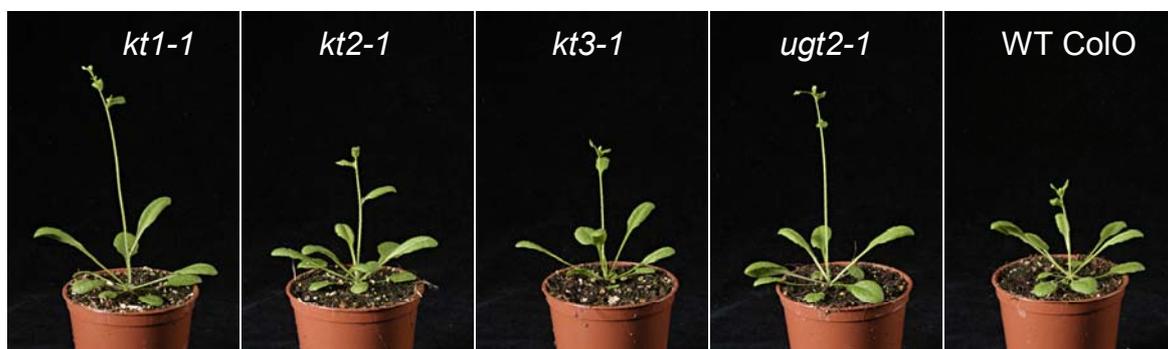


Abb. 15: Vergleichende Darstellung der Phänotypen der *KT-Knock-out*-Linien und des Wildtyps nach Wachstum unter Gewächshausbedingungen. Das Alter der abgebildeten Pflanzen beträgt ca. 4 Wochen. Sichtbare Größenunterschiede sind nicht signifikant.

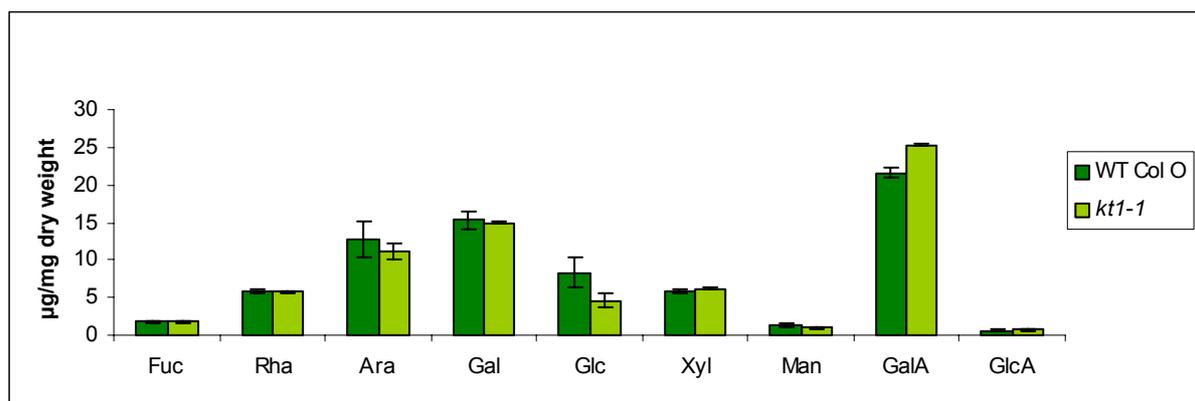


Abb. 16: Analyse der Zellwandbestandteile von Pflanzen der Linie *kt1-1* im Vergleich zu denen des Wildtyps. Das Ergebnis einer von zwei unabhängig durchgeführten Analysen des Blattmaterials von mindestens je 3 Pflanzen pro Linie hinsichtlich des Gehaltes an Fuc: Fucose, Rha: Rhamnose, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Man: Mannose, GalA: Galacturonsäure, GlcA: Glucuronsäure ist gezeigt.

Zusammenfassend konnten bisher keine Differenzen zwischen Pflanzen der *KT*-Linien und des Wildtyps aufgezeigt werden. Daher sollten durch die Analyse der zellulären Lokalisation und durch die Untersuchung der Funktion dieser Proteine nach heterologer Expression und Reinigung weitere Informationen gesammelt werden, um experimentell Anhaltspunkte für die Funktion in *A. thaliana*-Pflanzen zu erhalten.

3.3. Intrazelluläre Lokalisation ausgewählter *KT*-Proteine

Die cDNAs der vier ausgewählten *KT*-Mitglieder wurden jeweils mit der Sequenz des *GFP*-Gens (*Green Fluorescent Protein*) *in frame* fusioniert und in BY2-Protoplasten unter Kontrolle des 35S *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV)-Promotors transient exprimiert. In jedem Fall wurde ein Muster aus kleinen, sehr beweglichen Vesikeln, die unregelmäßig über das ganze Cytoplasma verteilt vorlagen, beobachtet (Abb. 17). Dieses Muster stimmt mit dem des im Golgi-Apparat lokalisierten pflanzlichen GDP-Mannose-Transporters AtGONST1 überein (Baldwin *et al.*, 2001). Als Kontrolle wurde in diesen Experimenten jedoch eine *GFP*-Fusion des Golgi-Markers Sialyltransferase untersucht. Dieses Protein ist hauptsächlich im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu finden, einem Kontinuum aus membranösen und miteinander interagierenden Röhren und Vesikeln an der trans-Seite des Golgi-Apparates (Wee *et al.*, 1998). Im Vergleich der mikroskopischen Bilder sind sehr ähnliche Muster zu erkennen. Weiterhin kann die gleiche Veränderung des Musters nach Einwirkung von Brefeldin A (BFA) festgestellt werden. Die Wirkung dieses Toxins beruht auf der Hemmung von GTP-austauschenden Faktoren, so dass eine Golgi-lokalisierte GTPase keine weiteren Hüllproteine zur Vesikelbildung rekrutieren kann. Infolgedessen kommt es zur direkten Fusion von Golgi-Zisternen mit dem ER sowie der Abtrennung des trans-Golgi-Netzwerkes und dessen anschließender Verschmelzung mit Komponenten des endocytotischen Systems. Es entsteht das sogenannte BFA-Kompartiment bestehend aus aggregierten Tubuli und Vesikeln (Nebenführ *et al.*, 2002; Ritzenthaler *et al.*, 2002). Eben diese Phänomene lassen sich nach BFA-Einwirkung anhand der *KT*-*GFP*-Fluoreszenz verfolgen. Es sind größere, weniger mobile Vesikel sichtbar (Abb. 17, Reihe 4).

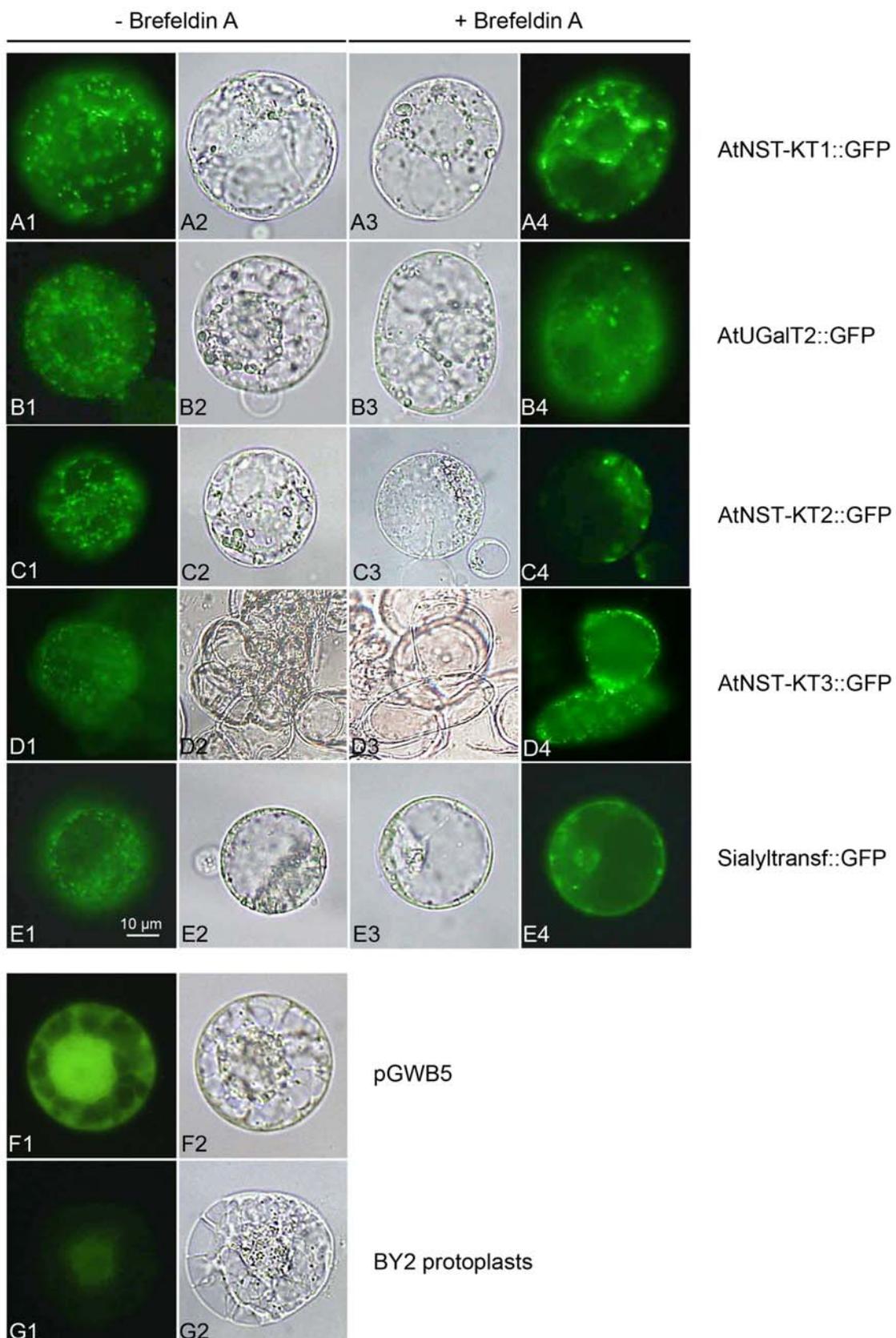


Abb. 17: Intrazelluläre Lokalisation der KT-GFP-Fusionsproteine in BY2-Protoplasten bzw. *A. thaliana*-Zellkultur. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Protoplasten, die transient nebenstehende Konstrukte exprimierten (Spalte 1) und einer einstündigen Brefeldin A-Behandlung unterzogen wurden (Spalte 4) sowie korrespondierende lichtmikroskopische Aufnahmen (Spalte 2 und 3); Reihe E: Positivkontrolle, GFP-Fluoreszenzmuster des Golgi-Markerproteins Sialyltransferase aus Säugern; Reihe F: pGWB5: Leervektor, der nur GFP enthält; Reihe G: BY2-protoplasts: Protoplasten ohne Vektor

Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die Proteine KT1, -2, -3 und UDP-GaIT2 im trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert sind und dort ihre Funktion erfüllen. Im Falle des bereits charakterisierten Nukleotidzuckertransporters UDP-GaIT2 ist diese Lokalisation nur diskutiert worden, war aber bislang nicht belegt (Bakker *et al.*, 2005). Daher wurde die Hypothese bekräftigt, dass neben UDP-GaIT2 weitere Mitglieder der KT-Familie dem Transport von Nukleotidzuckern über die Golgi-Membranen dienen. Dieser Hypothese folgend, sollte die Funktion als Transportprotein für Nukleotidzucker *in vitro* untersucht werden, wozu die heterologe Expression und anschließende Reinigung notwendig ist.

3.4. Heterologe Expression von KT-Proteinen in *S. cerevisiae*

Zur funktionellen Charakterisierung pflanzlicher Transporter wurde in der Arbeitsgruppe Flügge eine Transportmethode unter Verwendung von Liposomen, die heterolog exprimierte, rekonstituierte Transportproteine enthalten, etabliert (Loddenkötter *et al.*, 1993, Eicks *et al.*, 2002). Als Expressionssystem für Pflanzenproteine ist *S. cerevisiae* gut geeignet, während sich die Expression in *E. coli* als problematisch erwies (K. Fischer, persönliche Mitteilung).

Um die Expression in Hefe zu ermöglichen, wurden die cDNAs aller ausgewählten KT-Mitglieder in den Hefeexpressionsvektor pYes-Dest 52 kloniert und diese in den Uracil-auxotrophen Stamm InvSc1 transformiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von Galaktose. Zur Kontrolle der erfolgreichen Überexpression wurde der durch die Klonierung am C-terminalen Ende fusionierte 6x-His-Tag genutzt. Wie in Abb. 18 gezeigt, konnten alle *KT*-Gene im Hefesystem exprimiert werden. Dabei gab es jedoch zum Teil erhebliche Unterschiede in der Expressionsstärke. Während für KT1 und UDP-GaIT2 im *Western Blot* sehr starke Signale detektiert werden konnten, zeigt dieser eine nur schwache Bande für KT2 und -3 an.

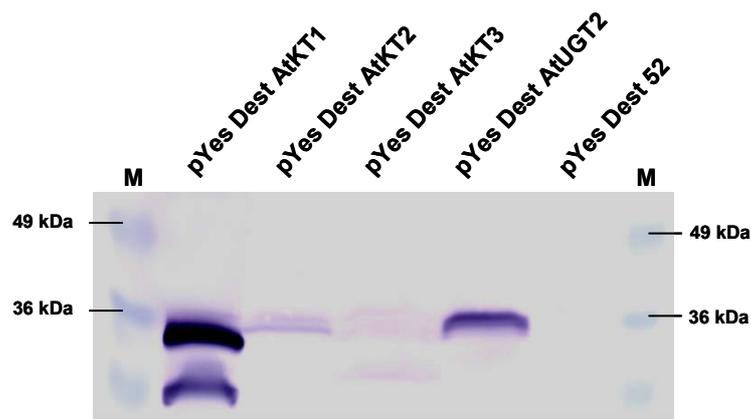


Abb. 18: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der in Hefe heterolog synthetisierten KT-Proteine 1, 2, 3 und UDP-GalT2 (UGT2). Gesamtmembranprotein wurde nach 6-stündiger Induktion der Expression isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Der immunologische Nachweis erfolgte mittels anti-penta-His-Antikörper. M: Protein-Marker (MBI, siehe Anhang 8.3.); pYes-Dest 52: Hefestamm mit leerem Vektor

3.4.1. Aufreinigung der heterolog produzierten KT-Proteine über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Um die Transportaktivität der KT-Proteine ohne den Einfluss von endogenen Hefetransportern bestimmen zu können, wurde eine native Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Die Reinigung aller ausgewählten KT-Proteine gelang trotz geringer Proteinmengen durch den Einsatz von Ni²⁺-NTA-Agarose im *batch*-Verfahren (Abb. 19). Zwar gelang dies nicht bis zur Homogenität (Abb. 19, Spur 4), doch konnte auf diese Weise die Mehrheit der Hefemembranproteine abgetrennt werden. Da die Funktion von UDP-GalT2 bereits bekannt war, wurde dieses Protein nicht aufgereinigt, sondern nur als Bestandteil von Gesamtmembranpräparationen als Positivkontrolle bei Transportversuchen verwendet.

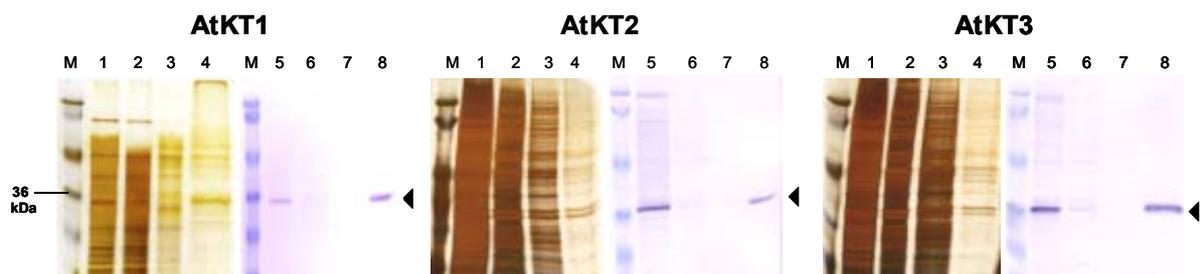


Abb. 19: Affinitätschromatographische Aufreinigung der in Hefe produzierten KT-Proteine 1, 2 und 3. Der Proteinnachweis erfolgte durch Silberfärbung der Gele (Spuren 1-4) und durch einen immunologischen Nachweis mittels anti-penta-His-Antikörper (Spuren 5-8); M: Marker; 1 + 5: Gesamthefemembranextrakt; 2 + 6: Durchflussfraktion; 3 + 7: Waschfraktion; 4 + 8: Elutionsfraktion. Ein schwarzer Pfeil gibt die erwartete Größe der Proteine an.

3.5. Transportexperimente zum Nachweis der Aktivität und zur Analyse der Substratspezifität von KT-Transportern

Wie bereits erwähnt, hat sich in den vergangenen Jahren die Verwendung von Proteoliposomen zur Charakterisierung von Translokatoren als verlässliche Methode erwiesen (Oppedisano *et al.*, 2007; Ozcan *et al.*, 2005; Bouvier *et al.*, 2006). Auch zur Identifizierung von Nukleotidzuckertransportern fand dieser Ansatz bereits erfolgreiche Anwendung (Milla *et al.*, 1992, Puglielli & Hirschberg, 1999). Da aufgrund der schon bekannten Funktion von UDP-GalT2 (Bakker *et al.*, 2005) und der Lokalisation im Golgi-Apparat angenommen wurde, dass auch weitere Mitglieder der KT-Familie Nukleotidzucker transportieren, entschied man sich ebenfalls für Transportversuche mit Proteoliposomen. Dabei wurde die Antiport-Eigenschaft der Nukleotidzuckertransporter genutzt, indem eine Vorbeladung der Liposomen mit einer Reihe von in Pflanzen vorkommenden Nukleotidzuckern erfolgte. Durch Zugabe des korrespondierenden radioaktiv markierten Nukleotidmonophosphats ins Außenmedium sollte erreicht werden, dass dieses im Gegenaustausch zum Nukleotidzucker in die Liposomen eintransportiert und nachweisbar wird. Mit Hilfe dieser Methode sollte ein schnelles und einfaches Testsystem etabliert werden, mit dem eine Vielzahl möglicher Substratpaare überprüfbar ist, die zum Teil nicht käuflich zu erwerben sind.

Für erste Transportversuche wurden Gesamtmembranfraktionen der überexprimierenden Hefestämme in Liposomen rekonstituiert und die Transportraten

bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Liposomen, in die Proteine aus dem Wildtyp-Hefestamm mit leerem Vektor rekonstituiert wurden. Als Positivkontrolle kamen Hefemembranen mit angereichertem UDP-GalT2-Protein zum Einsatz. Weiterhin wurde jeweils ein Ansatz ohne Vorbeladung der Liposomen mitgeführt.

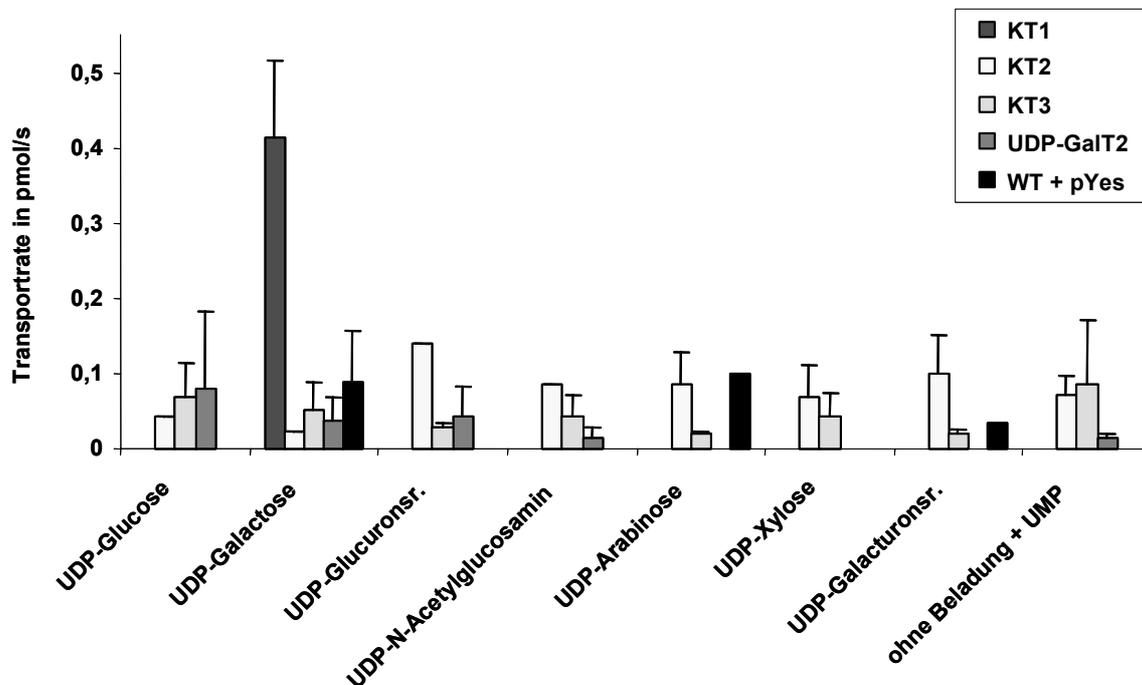


Abb. 20: Transportaktivität für ausgewählte UMP³³-UDP-Zucker-Paare in Proteoliposomen. Es wurden Gesamtmembranfraktionen der die KT-Proteine überexprimierenden Hefestämme in Liposomen rekonstituiert. Die Mittelwerte aus durchschnittlich 3 unabhängigen Experimenten sind gezeigt (Ausnahme WT + pYes).

Wie aus Abb. 20 hervorgeht, konnte nur nach Rekonstitution von KT1 eine signifikante Transportaktivität für das Nukleotidzucker/Nukleotidmonophosphat-Paar UDP-Galactose/UMP nachgewiesen werden. Überraschenderweise konnte keine Aktivität des UDP-GalT2-Proteins detektiert werden. Auch Versuche mit den Substraten UDP-Glucose, UDP-Glucuronsäure und UDP-N-Acetylglucosamin blieben ohne Erfolg. Gleiches gilt für die Proteine KT2 und -3, die trotz der Einbeziehung verschiedener Substrate (UDP-Glucose, UDP-Galactose, UDP-Glucuronsäure, UDP-N-Acetylglucosamin, UDP-Arabinose, UDP-Xylose, UDP-Galacturonsäure, GDP-Mannose, GDP-Fucose (GDP-Zucker nicht gezeigt)) keine signifikanten Transportaktivitäten aufwiesen. Eine Wiederholung der Versuche mit

rekonstituierten aufgereinigten Proteinen führte zu unveränderten Ergebnissen (nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurde auf die Charakterisierung der Transporteigenschaften des KT1-Proteins fokussiert. Die Verifizierung der Versuche nach erneuter Aufreinigung und Rekonstitution ergaben das gleiche Bild (Abb. 21). Eine signifikante Transportaktivität wurde nur für UDP-Galactose, jedoch nicht für andere Substrate

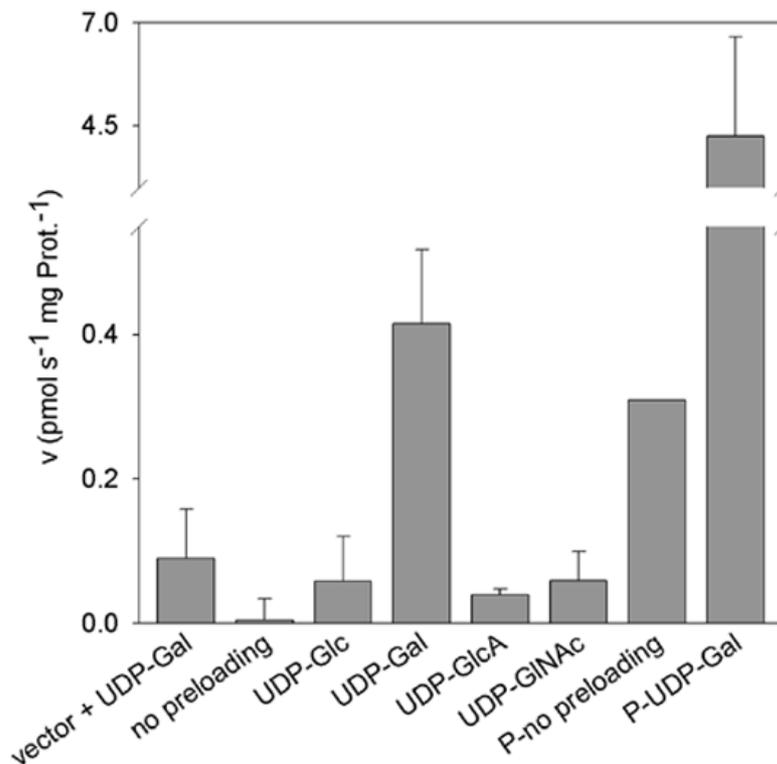


Abb. 21: Bestimmung der Substratspezifitäten von KT1. Gesamtmembranproteine von Hefezellen, die mit pYesDest-AtKT1 oder pYesDest 52 (vector) transformiert wurden, bzw. das aufgereinigte AtKT1-His6-Protein (P-) wurden in Liposomen rekonstituiert. Ohne (no preloading) oder nach Vorbeladung mit den angegebenen Substraten wurde die Aufnahme von radioaktiv markiertem UMP gemessen (n=3, außer aufgereinigtes KT1-Protein enthaltende Liposomen ohne Vorbeladung). UDP-Gal: UDP-Galactose; UDP-Glc: UDP-Glucose; UDP-GlcA: UDP-Glucuronsäure; UDP-GINAc: UDP-N-Acetylglucosamin; P: Einsatz des aufgereinigten KT1-Proteins

beobachtet. Auch die neu einbezogenen Substrate UDP-Glucose, UDP-Glucuronsäure und UDP-N-Acetylglucosamin wurden durch KT1 nicht transportiert. Nach der affinitätschromatographischen Reinigung konnte erwartungsgemäß eine ca. 10fach höherer Aktivität von KT1 gemessen werden.

Die Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei KT1 um einen monospezifischen Nukleotidzuckertransporter handelt, der UMP im strikten Austausch mit UDP-Galactose transportiert. Sowohl ein Uniport von UMP als auch ein Antiport der gezeigten UDP-Zucker außer UDP-Galactose kann nach Abgleich mit den Negativkontrollen (siehe auch Abb. 20) ausgeschlossen werden. Inwieweit dieser neu identifizierte UDP-Galactose-Transporter in seinen Eigenschaften den bereits beschriebenen Nukleotidzuckertransportern entspricht, sollte durch die Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und K_i festgestellt werden.

3.6. Transportexperimente zur Bestimmung kinetischer Parameter für AtKT1

Zur Bestimmung des K_M -Wertes für UMP wurde eine gleichbleibende interne UDP-Galactose-Konzentration von 200 μM eingestellt, während eine Variation der externen UMP-Konzentration im Bereich von 0,5 bis 10 μM erfolgte. Dieser Bereich wurde in Analogie zu bereits charakterisierten Nukleotidzuckertransportern gewählt, die K_M -Werte zwischen 1 und 10 μM für die jeweiligen Substrate aufweisen (Hirschberg *et al.*, 1998). Der Transport von Nukleotidzuckern folgt der Michaelis-Menten-Kinetik, die die Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration in Form einer Hyperbel beschreibt. Der K_M -Wert entspricht hierbei derjenigen Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwerts erreicht.

Durch doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver und Burk lässt sich der K_M -Wert aus dem Schnittpunkt der entstandenen Gerade mit der x-Achse nach *Achsenschnittpunkt* = $-1/K_M$ bestimmen. In Abb. 22 ist ein solches Diagramm für einen Versuch exemplarisch dargestellt. Aus den Daten wurde ein K_M -Wert von 4,6 μM berechnet. Der Mittelwert aus 7 unabhängigen Bestimmungen lag bei $4,2 \pm 1,7$ μM UMP.

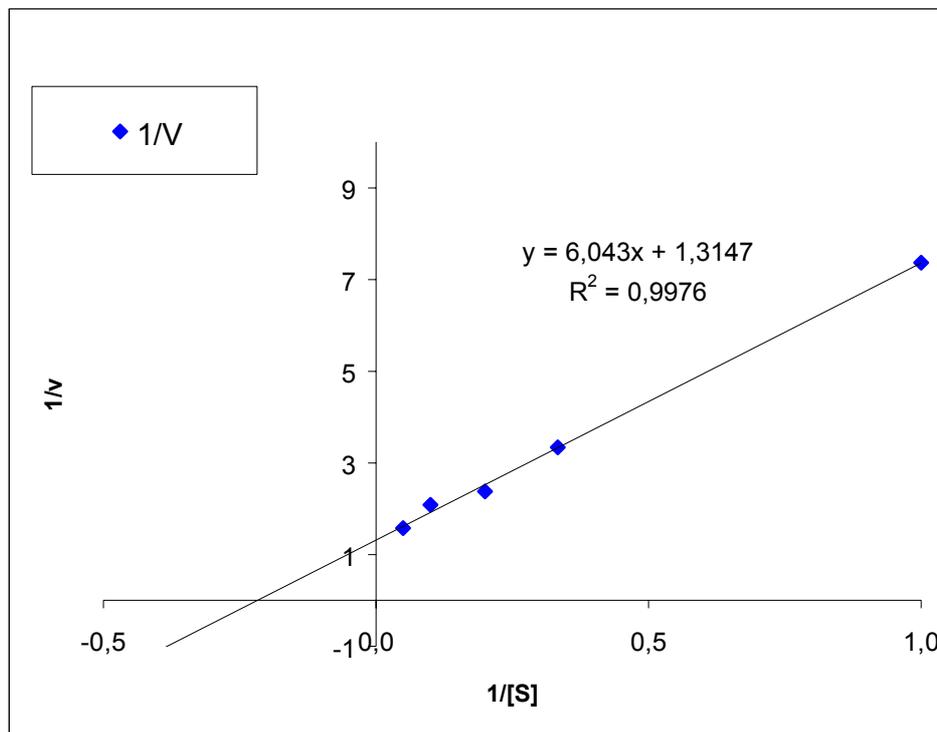


Abb. 22: Bestimmung des K_M -Wertes für UMP für KT1 durch Auftragung im Lineweaver-Burk-Plot. Gezeigt ist das Ergebnis einer von sieben unabhängig durchgeführten Bestimmungen.

Da KT1 als Antiporter für UMP und UDP-Gal fungiert, sollte die Affinität für UMP und den Nukleotidzucker näher charakterisiert werden. Dazu wurde das etablierte Testsystem dahingehend modifiziert, dass neben radioaktiv markiertem UMP auch UDP-Gal bzw. UDP-Gluc als Kompetitoren im Außenmedium angeboten wurden. Diese Experimente sollten den Einfluss des Nukleotid- bzw. Zuckeranteils des Substrats auf dessen Bindung aufzeigen.

Der Zusatz von UDP-Gal sollte zu einer kompetitiven Hemmung und damit zu einer Verschiebung des K_M -Wertes für UMP führen. Sollte für die Bindung des Substrats der Nukleotidanteil entscheidend sein, so sollte allerdings auch der Zusatz von UDP-Gluc eine K_M -Wert-Erhöhung bewirken. Der nicht beobachtete Transport von UDP-Gluc in den vorhergehenden Experimenten würde dann jedoch für die Bestimmung der Transportaktivität durch den Zuckeranteil des Substrats sprechen.

Als Maß für die Hemmung sollte der K_i -Wert für UDP-Gal und UDP-Gluc in Bezug auf den UMP-Transport bestimmt werden. Die Konstante beschreibt die Dissoziation des Enzym-Inhibitor/Kompetitor-Komplexes, während ihr Kehrwert $1/K_i$ die

Affinitätskonstante darstellt. Aus dieser umgekehrt proportionalen Beziehung ergibt sich, dass je kleiner der K_i -Wert ist, desto größer die Affinität des Inhibitors/Kompetitors zum Enzym. Nach doppelt-reziproker Auftragung aller Versuchsreihen erhält man neben dem K_M (Versuchsreihe ohne Kompetitor) weitere apparente K_M -Werte für die Versuchsreihen mit den unterschiedlichen Kompetitorkonzentrationen. Die Ergebnisse sind in Abb. 23A für verschiedene UDP-Galactose-Konzentrationen von 0, 15 und 40 μM und in Abb. 23B für die UDP-Glucosekonzentrationen 0 und 25 μM exemplarisch für je 1 Experiment gezeigt. Beide UDP-Zucker wirken demnach als kompetitive Inhibitoren, die zur Erhöhung des K_M -Wertes führen und keinen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben. Als Mittelwert von zwei (UDP-Glucose) bzw. fünf unabhängigen Experimenten (UDP-Galactose) wurden K_i -Werte von $12,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ für UDP-Glucose und $5,1 \pm 1,7 \mu\text{M}$ für UDP-Galactose über die Beziehung $K_{M(app)} = K_M * (1 + [K]/K_i)$ bestimmt.

Damit hat UDP-Galactose eine höhere Affinität zu KT1 als UDP-Glucose. UDP-Gluc bindet jedoch ebenfalls am aktiven Zentrum, was durch die gleiche maximale Transportgeschwindigkeit angezeigt wird (Abb. 23B). Allerdings ist kein Transport möglich, da der Zuckeranteil des Substrats für die Transporterfunktion ausschlaggebend zu sein scheint.

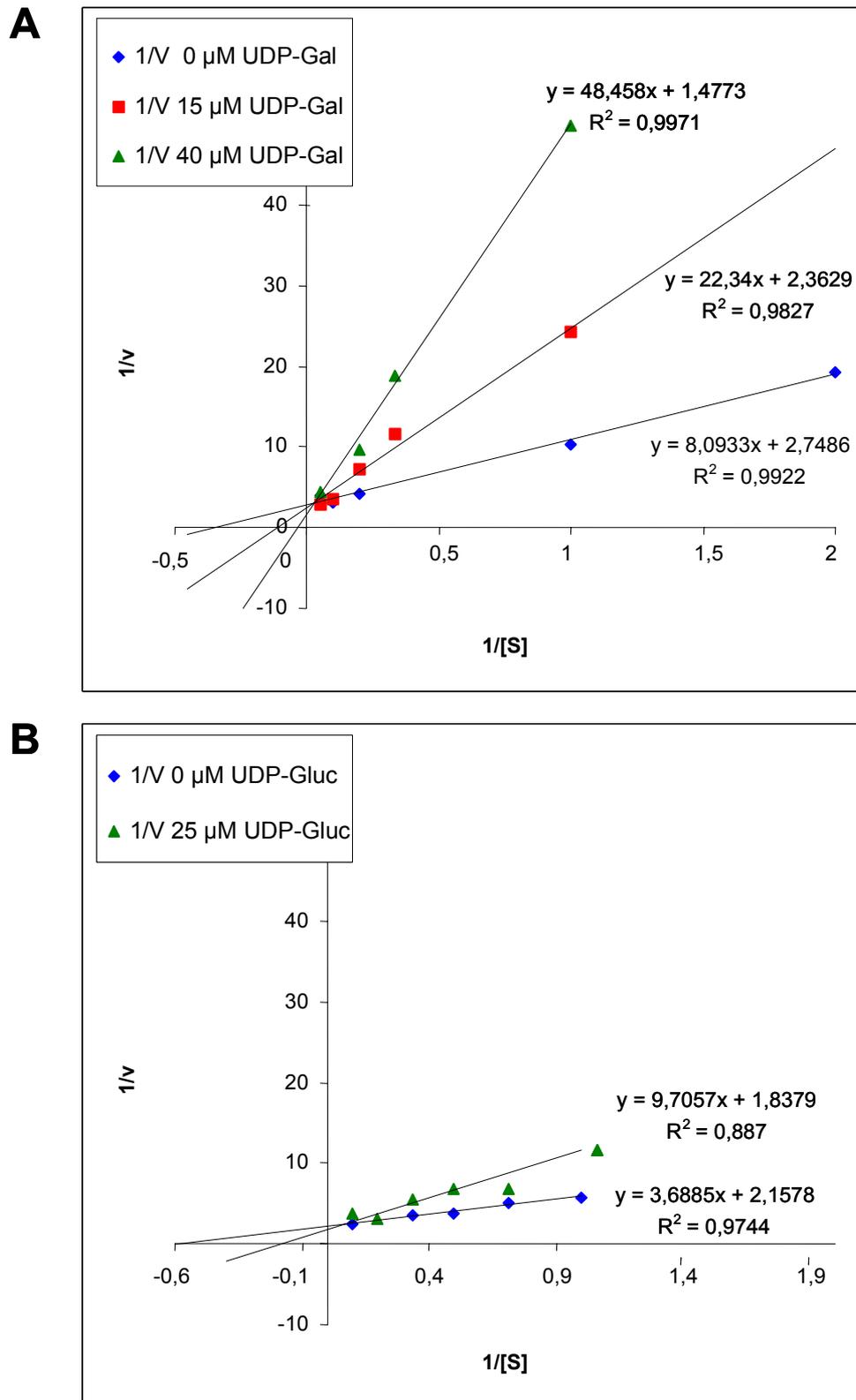


Abb. 23: Lineweaver-Burk-Plot je eines Versuches zur Bestimmung von K_M - und apparenten K_M -Werten für UMP in Abwesenheit (Symbol Raute) und Gegenwart der Kompetitoren UDP-Galactose (15 μM : Symbol Viereck; 40 μM : Symbol Dreieck) (A) oder UDP-Glucose (25 μM : Symbol Dreieck) (B)

4. Funktionelle Charakterisierung der *Bile-Acid-Transporter* (BAT)-Familie in *Arabidopsis thaliana*

Um die Funktion von Gallensäuretransportern in Pflanzen aufklären zu können, erfolgte im zweiten Teil dieser Arbeit die funktionelle Charakterisierung der Mitglieder der BAT-Familie im pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*.

4.1. Expressionsstudien der Mitglieder der *BAT*-Genfamilie

Die *BAT*-Genfamilie in *A. thaliana* besteht aus fünf Mitgliedern: At2g26900 (*AtBAT1*), At1g78560 (*AtBAT2*), At3g25410 (*AtBAT3*), At4g22840 (*AtBAT4*) und At4g12030 (*AtBAT5*). In den folgenden Kapiteln werden zunächst die Ergebnisse von *in silico* Gen- und Proteinsequenzanalysen sowie Resultate von *in planta* Expressionsstudien vergleichend dargestellt.

4.1.1. Sequenzanalysen auf DNA- und Proteinebene

Die Genstrukturen der *BAT*-Gene sind durch eine hohe Diversität gekennzeichnet (Abb. 24). Fast alle Mitglieder weisen eine unterschiedliche Anzahl an Exons in variablen Positionen auf, wobei *AtBAT1* mit 13 Exons im Gegensatz zu den 5-8 Exons der anderen Gene besonders auffällt.

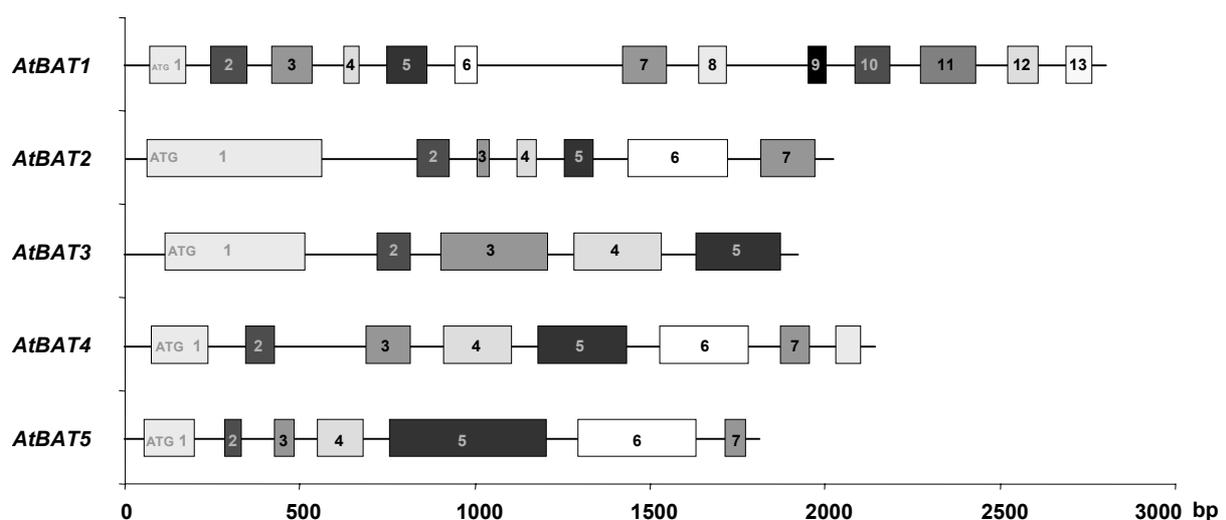


Abb. 24: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur von *BAT* kodierenden Genen in *A. thaliana*. Exon-Sequenzen sind als graue Boxen dargestellt, während Intron-Sequenzen als Verbindungslinien angezeigt werden.

Auf Proteinebene können lediglich 33-45% Sequenzhomologie für die Gesamtsequenzen beobachtet werden. Doch finden sich Bereiche, insbesondere innerhalb der vorhergesagten Transmembrandomänen 4, 5 und 6, sowie zwischen den Transmembranhelices 8 und 9, die deutlich stärker konserviert erscheinen (Abb. 25). Dies wird noch deutlicher, wenn man Sequenzen von Gallensäuretransportern aus Säugern (ISBT bzw. ASBT, NTCP) in den Sequenzvergleich einbezieht. Das charakteristische SBF-Motiv liegt innerhalb der Transmembranspannen 4 und 5 und ist in allen gezeigten Proteinen konserviert.

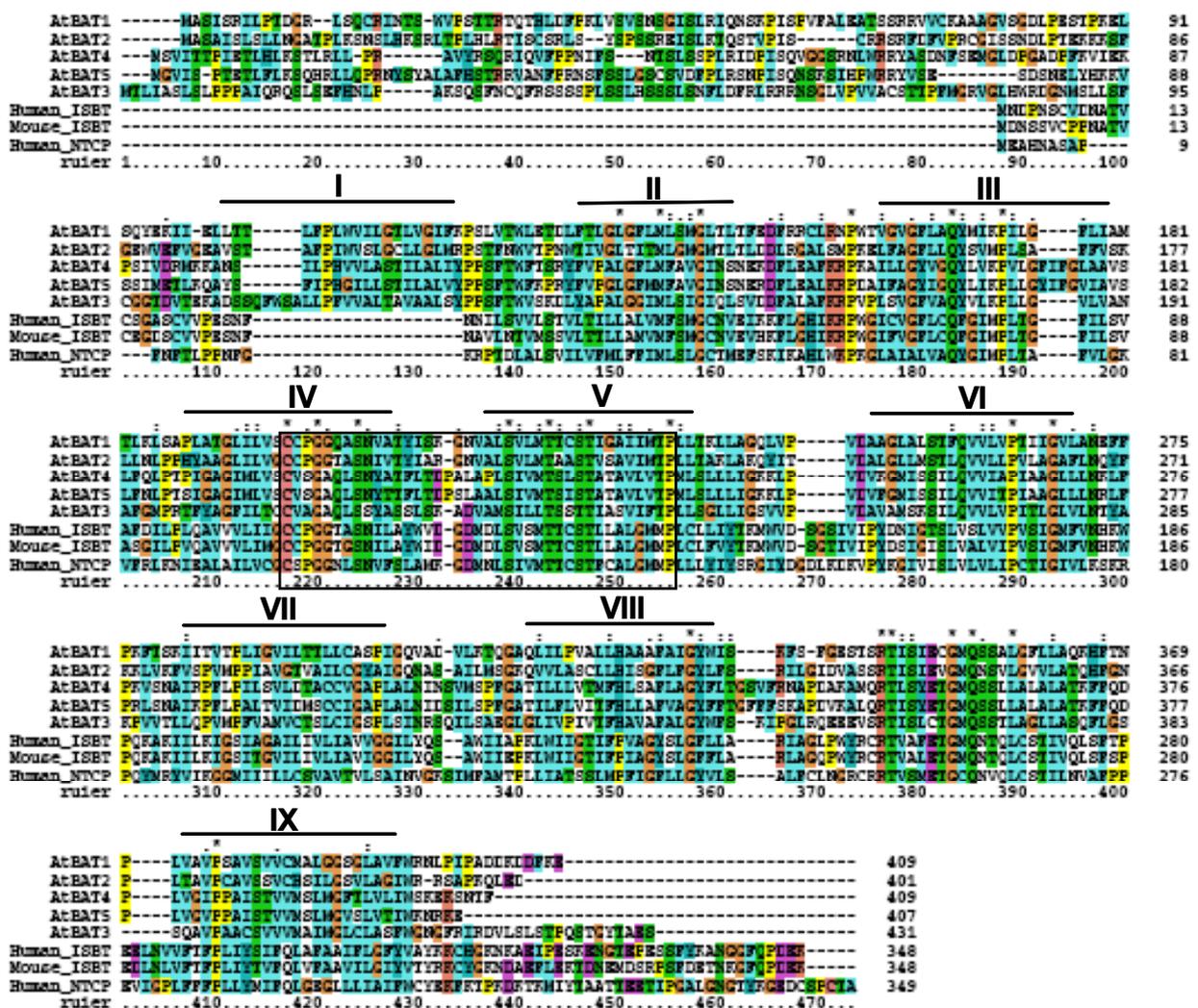


Abb. 25 : Aminosäuresequenzvergleich von Mitgliedern der BAT-Familie aus *A. thaliana* und Säugern. Die Lage der vorhergesagten Transmembrandomänen ist durch Linien gekennzeichnet (I-IX), die der SBF-Domäne durch Einrahmung.

ISBT = *Ileal Sodium Bile Acid Transporter* ⇒ Synonym zu ASBT (NCBI-Accession-Nummer: 2833238); NTCP = *Na⁺ Taurocholate Cotransporting Peptide* (NCBI-Accession-Nummer: 2498046)

Die Abbildung 25 gibt weiterhin Aufschluss über die Anzahl der vorhergesagten Transmembranhelices, die zwischen 8 und 9 liegt, und über das Vorhandensein einer N-terminalen Transitpeptidsequenz in allen *A. thaliana*-BAT-Proteinen. Laut Vorhersage der ARAMEMNON-Datenbank sind die Proteine AtBAT1, -2 und -3 sehr wahrscheinlich plastidär lokalisiert, während es für AtBAT4 und -5 Vorhersagen für eine plastidäre oder mitochondriale Lokalisation gibt. In Tabelle 7 ist eine Zusammenfassung aller vorhergesagten Eigenschaften der BAT-Proteine aus *A. thaliana* aufgeführt.

Tabelle 7: Zusammenstellung von vorhergesagten Charakteristika der BAT-Proteine in *A. thaliana* (Quelle: ARAMEMNON)

Protein	Gesamthomologie auf AS-Ebene in %	Anzahl TMD	Vorhersage der intrazellulären Lokalisation
AtBAT1	—	9	Chloroplasten
AtBAT2	45	9	Chloroplasten
AtBAT3	33	9	Chloroplasten
AtBAT4	33	8	Chloroplasten oder Mitochondrien
AtBAT5	34	9	Chloroplasten oder Mitochondrien

4.1.2. Expression der *BAT*-Gene laut GENEVESTIGATOR

Die in der Datenbank Genevestigator (Zimmermann *et al.*, 2004) zusammengestellten Resultate systematischer Analysen des genomweiten Expressionsmusters in *A. thaliana* unter verschiedenen Bedingungen und in verschiedenen Organen wurden hinsichtlich der *BAT*-kodierenden Gene anhand der Funktion *Meta-Analyzer* abgerufen. Alle Mitglieder der *AtBAT*-Familie werden in allen Organen mehr oder weniger stark exprimiert (Abb. 26). Dabei gibt es Überlappungen der Expressionsmaxima von mindestens zwei Mitgliedern in einzelnen Organen. *BAT2* wird in den Petalen, den Samen, dem Sprossapex, den Blättern und der Wurzel besonders stark exprimiert. Auch für *BAT4* wurde eine starke Expression in einigen Geweben der Wurzel und in Petalen, ferner jedoch auch in Staubblättern, Hochblättern und in seneszenten Blättern beobachtet. *BAT1* weist besonders starke Expression in den Geweben des Sprosses (Pedicel, Stengel, Sprossapex) auf, wird aber auch in jungen Rosettenblättern in hohem Maß exprimiert. Letzteres trifft ebenfalls auf das *BAT3*-Gen zu, dessen Expressionsmaxima außerdem in Pedicel, Schoten und Samen liegen. Im Falle von *BAT5* zeigt sich ein abweichendes, außergewöhnliches Bild, denn dieses Gen wird in allen Organen auf einem basalen Level exprimiert, besonders stark jedoch nur im Bereich der Stengelknoten.

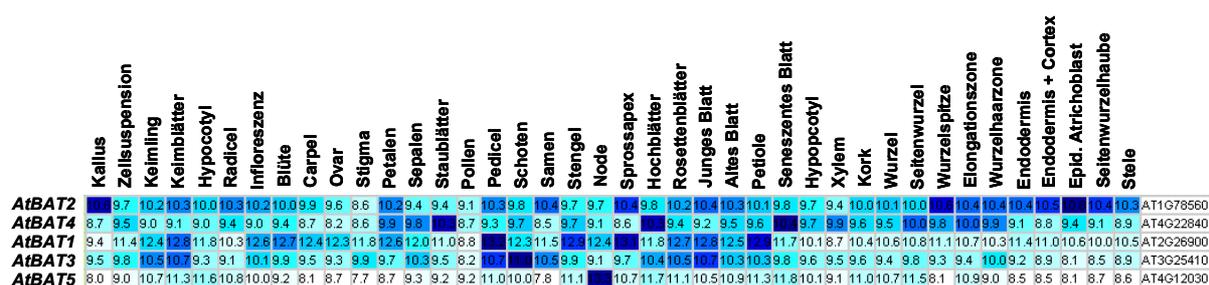


Abb. 26: Daten zur organspezifischen Expression der *BAT*-Gene nach GENEVESTIGATOR (siehe Text). Es wurde die Funktion *Meta-Analyzer* Unterpunkt *Organ Specificity* verwendet. Die Expressionsstärke wird in Blauabstufungen von hell = schwach exprimiert bis dunkel = stark exprimiert dargestellt. Die in den Zellen stehenden Zahlen geben die Signalintensitäten als $\log_2(n)$ an.

4.1.3. Expressionsanalyse mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR

Um die Daten der *Microarray*-Experimente zu verifizieren, wurde aus der Blüte, den Hochblättern, den Rosettenblättern und der Wurzel des Wildtyps ColO RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und als Template für eine PCR eingesetzt. Das konstitutiv exprimierte *Actin2*-Gen wurde zur Kontrolle nachgewiesen. In Abb. 27 lässt sich in allen getesteten Organen die Expression aller Gene detektieren. Doch auch in diesem Ansatz werden Unterschiede in der Expressionsstärke einzelner Gene in bestimmten Organen deutlich. In Übereinstimmung mit den *Microarray*-Daten wird *BAT1* in Wurzeln nur schwach exprimiert. Gleiches gilt für *BAT5*, welches zusätzlich in Blüten ein geringes Expressionslevel aufweist. Für das Gen *BAT3* wurde eine starke Expression in Hoch- und Rosettenblättern bestätigt.

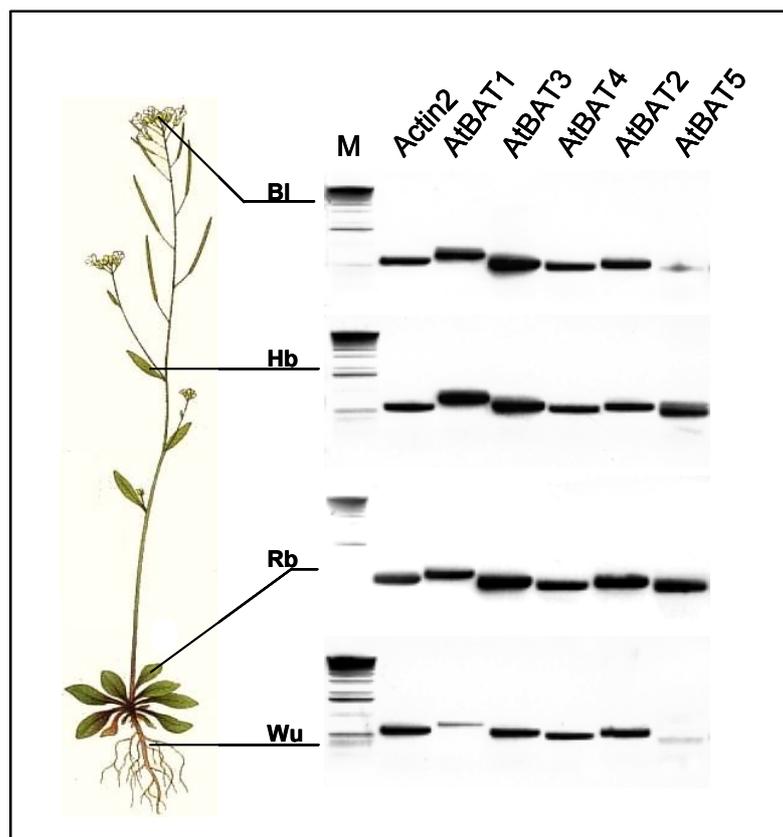


Abb. 27: Semiquantitative RT-PCR zur Analyse der organspezifischen Expression der *BAT*-Gene in *A. thaliana*. Neben den Genen *AtBAT1-5* wurde das konstitutiv exprimierte *Actin2*-Gen als Kontrolle verwendet. Zur Amplifikation wurden 30 PCR-Zyklen gewählt. Bl: Blüte, Hb: Hochblätter, Rb: Rosettenblätter, Wu: Wurzel.

4.1.4. Expressionsanalyse mit Hilfe von Promotor::GUS- Fusionen

Als weiterer experimenteller Ansatz zur Analyse der Expression der *BAT*-Gene in *A. thaliana* wurden Promotor::GUS-Fusionen konstruiert. Dazu wurden vorhergesagte Promotorbereiche (TAIR-Datenbank; <http://www.arabidopsis.org>) einschließlich der 5'-Bereiche der jeweiligen ersten Exons amplifiziert und mittels *Gateway*-System in den Vektor pGWB3 kloniert. Dabei wurden sie *in frame* mit dem *uidA*-Gen aus *E. coli* fusioniert. Die transformierten Pflanzen wurden auf *nptII*-vermittelte Kanamycinresistenz getestet und die Expression der einzelnen *BAT*-Gene durch GUS-Färbung untersucht. Es erfolgte eine Auswahl von mindestens drei unabhängigen Linien je Promotorkonstrukt mit über mehrere Generationen stabilem Expressionsmuster. Die Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Studien ist in Abb. 28 dargestellt. *BAT1* wird demnach stark in Keimblättern, jedoch weniger in Rosettenblättern exprimiert. Die Narbe und die Filamente der Staubblätter innerhalb der Blüte, sowie die Abscissionszone der Schoten, konnten als Organe mit ausgeprägter Expression bestätigt werden, während nur geringe Signalintensitäten in Samen, Stengel und Wurzel zu verzeichnen waren. Sehr hohe Expressionslevel in allen Geweben der Wurzel konnten dagegen für *BAT2* beobachtet werden. Auch die Filamente der Staubblätter, die Narbe und die Sepalen weisen GUS-Aktivität auf. Als Besonderheit fällt die Blaufärbung der Trichome, angezeigt durch die über die Blattoberfläche verstreuten Punkte, auf, wohingegen die Blätter im Allgemeinen weniger intensiv gefärbt sind. Dies trifft auch auf den Stengel und die Schoten zu; die Samen zeigen allerdings durch leichte Blaufärbung ein geringes Maß an *BAT2*-Expression an. *BAT3* ist ein ubiquitär stark exprimiertes Gen. Keim- und Rosettenblätter wie auch viele Gewebe der Blüte, namentlich Narbe, Sepalen und Staubblätter, lassen hohe GUS-Aktivität erkennen. Doch auch die Wurzel und der Schotenansatz sind intensiv gefärbt. Allerdings sind Stengel und Samen als Organe schwacher Expression zu identifizieren. *BAT4* scheint dagegen in allen Organen nur schwach bis gar nicht exprimiert zu sein, da nur in Blättern, dem Schotenansatz und dem Zentralzylinder der Wurzel überhaupt eine schwache GUS-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

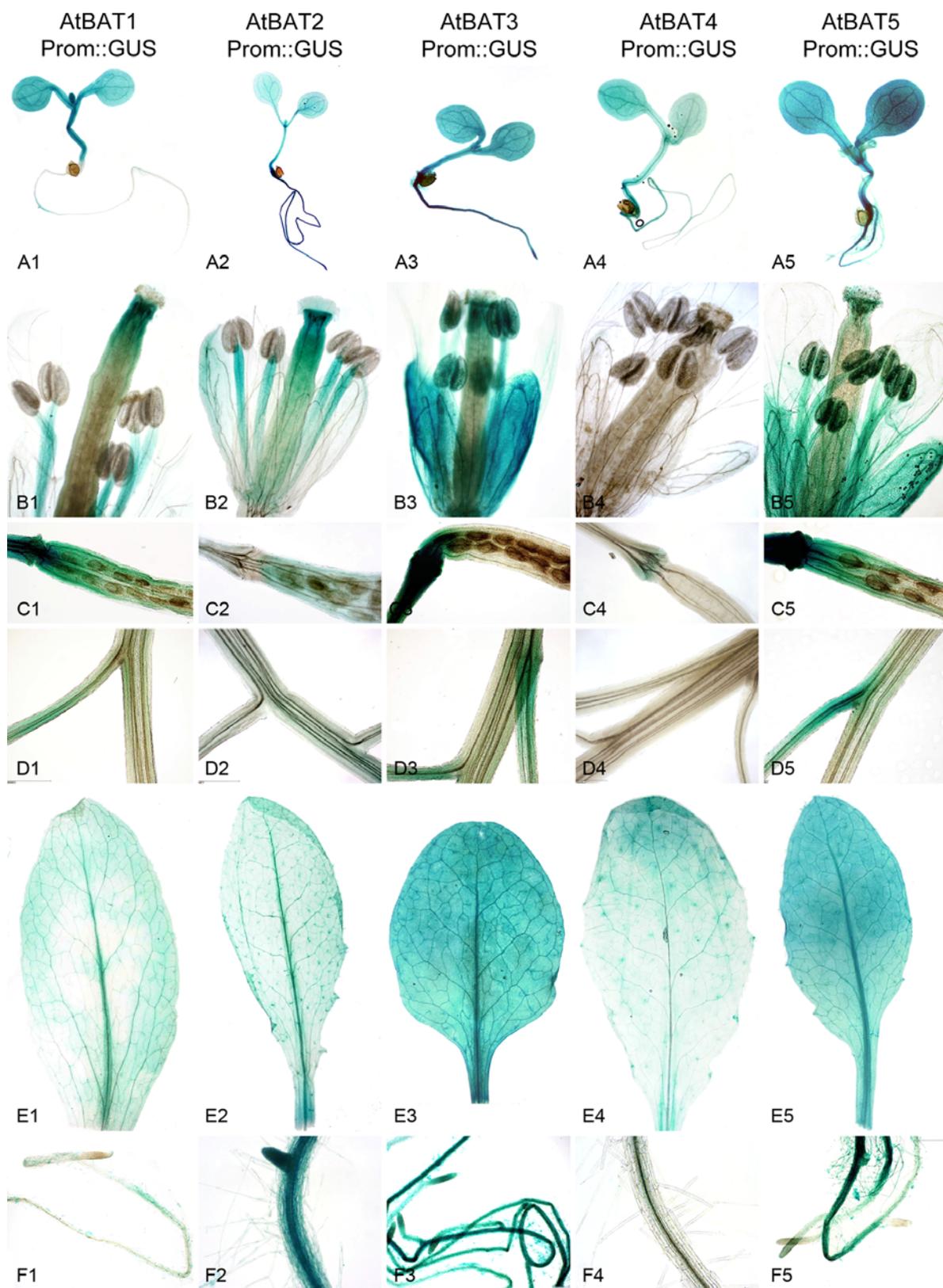


Abb. 28: Vergleichende Darstellung der Organe GUS-gefärbter Pflanzen, die BAT-Promotor::GUS-Konstrukte exprimieren. Reihe A 1-5: Keimlinge im 2 -Blattstadium; Reihe B 1-5: reife Blüte; Reihe C 1-5: Abscissionszone von Schoten inklusive Samen; Reihe D 1-5: junger Stengel; Reihe E 1-5: Rosettenblätter; Reihe F 1-5: junge Wurzeln

Für *BAT5* kann wie für *BAT3* eine ubiquitäre Expression dokumentiert werden. Sowohl Keim- und Rosettenblätter, Sepalen, Staubblätter und Narbe der Blüte als auch Schotenansatz, Stengelknoten und Hauptwurzel weisen hohe GUS-Aktivität auf. Lediglich Samen, Petalen und Seitenwurzeln sind kaum bis gar nicht gefärbt.

Die Ergebnisse für *BAT4* widersprechen den *Microarray*- und RT-PCR-Daten, während die Resultate der Promotor::GUS-Analysen der anderen *BAT*-Gene größtenteils mit den zuvor beschriebenen Daten übereinstimmen.

4.1.5. Analyse der Coexpression von Genen in *A. thaliana*

Häufig weisen Gene, die für Proteine spezifischer Stoffwechselwege kodieren, ähnliche Expressionsmuster auf. Daher kann bei Genen unbekannter Funktion, wie den *BAT*-Genen, die Analyse der Coexpression mit Genen bekannter Funktion Hinweise auf die Transportaktivität liefern. Dank umfangreicher *Microarray*-Datensammlungen und ihrer Verknüpfung durch Applikationen wie dem „*Expression Angler*“ (http://bbc.botany.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi) kann eine solche Suche durchgeführt werden. Für die *BAT*-Gene 1-4 wurden keine eindeutigen Zuordnungen beobachtet. Allerdings stimmt das Expressionsmuster von *BAT5* mit dem einer Reihe von Genen überein, deren Produkte an der Biosynthese aliphatischer Glucosinolate beteiligt sind (Abb. 29A). Diese Coexpression wird durch Daten aus der Datenbank Genevestigator bestätigt (Abb. 29B). Nur das Expressionsmuster von *BAT5* weist große Übereinstimmung mit dem solcher Gene auf, deren Produkte im aliphatischen Glucosinolat-Biosyntheseweg mitwirken. Diese zeichnen sich ebenfalls durch eine starke Expression in den Bereichen der Stengelknoten bzw. Nodien und eine leicht erhöhte Expression in den Keimblättern und dem Hypocotyl aus.

A

Gen	ExK	Genbezeichnung/ Funktion
At4g12030	1,000	Bile acid:sodium symporter family protein
At2g43100	0,894	Aconitase C-terminal domain-containing protein
At1g74090	0,883	Sulfotransferase family protein
At1g16400	0,845	CYP79F2
At4g13770	0,835	CYP83A1
At3g58990	0,819	Aconitase C-terminal domain-containing protein
At1g31180	0,819	3-Isopropylmalat-dehydrogenase
At3g02020	0,786	Aspartate kinase
At3g19710	0,776	Branched-chain Amino acid transferase 4
At5g23010	0,758	MAM1
At3g03190	0,754	Glutathione S-Transferase
At1g31230	0,731	Bifunctional aspartate kinase
At3g01120	0,725	Cystathione-gamma-synthase
At4g03060	0,722	AOP2; Dioxygenase
At2g31790	0,721	UDP-Glucosyl transferase family
At3g49680	0,671	Branched-chain Amino acid transferase 3
At5g07690	0,668	Myb-family transcription factor MYB29

B

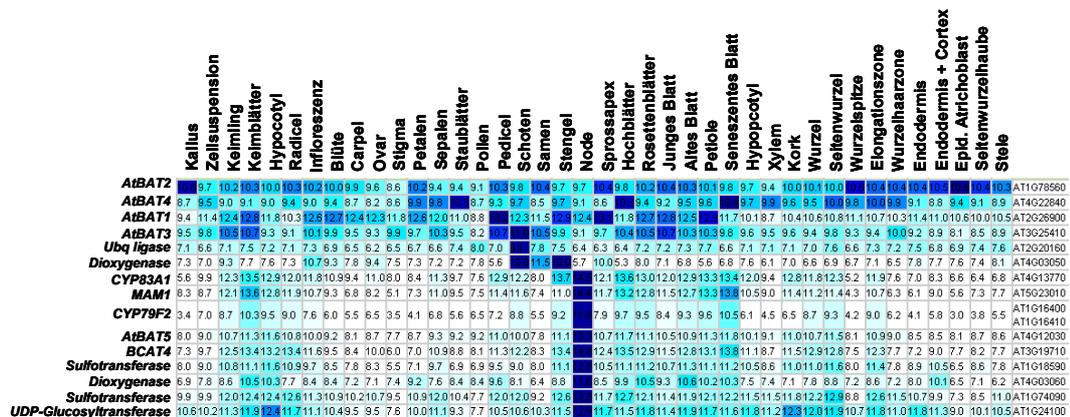


Abb. 29: Coexpressionsanalyse zu *AtBAT5*. **A)** Ausschnitt des Ergebnisses der Korrelationsanalyse für die Expression von *BAT5* mittels *ExpressionAngler*. Neben der Genbezeichnung (Gen) ist der Korrelationskoeffizient (ExK) und die vorgeschlagene Funktion des kodierten Proteins angegeben. Nachgewiesenermaßen an der aliphatischen Glucosinolat-Biosynthese beteiligte Proteine sind hellgrau unterlegt. **B)** Vergleich des organspezifischen Expressionsmusters von *BAT*-Genen und Genen, deren Produkte am Biosyntheseweg von aliphatischen Glucosinolaten mitwirken (siehe Einleitung).

Um diese Ergebnisse durch eine unabhängige Methode zu validieren, wurde ein in der Arbeitsgruppe Flügge etabliertes Cotransformations-Testsystem genutzt (Berger *et al.*, 2007). Hierfür werden Zellen einer *A. thaliana*-Wurzelzellkultur mit einem hochgradig virulenten Agrobakterienstamm inokuliert, welcher zwei Plasmide, ein

Promotor::GUS-Konstrukt des Zielgens und ein Transkriptionsfaktor tragendes Konstrukt, transfiziert. Interagiert der Transkriptionsfaktor mit dem Promotorbereich, erhält man GUS-Aktivität und somit eine Blaufärbung der Zellkultur. Da unter anderem der Transkriptionsfaktor MYB28 die Expression der Biosyntheseenzyme der aliphatischen Glucosinolate reguliert (Gigolashvili *et al.*, 2007, submitted), wurde getestet, ob dieser ebenfalls zur Induktion der Expression von *BAT*-Genpromotoren fähig ist. Diese Versuche wurden von Tamara Gigolashvili und Ruslan Yatusevich unter Verwendung der vorhandenen Promotor::GUS-Konstrukte (siehe 4.1.4) durchgeführt. In Abb. 30 ist erkennbar, dass in Anwesenheit von MYB28 spezifisch die *BAT5*-Expression aktiviert wurde, während keine Induktion der Expression der anderen *BAT*-Gene beobachtet werden konnte.

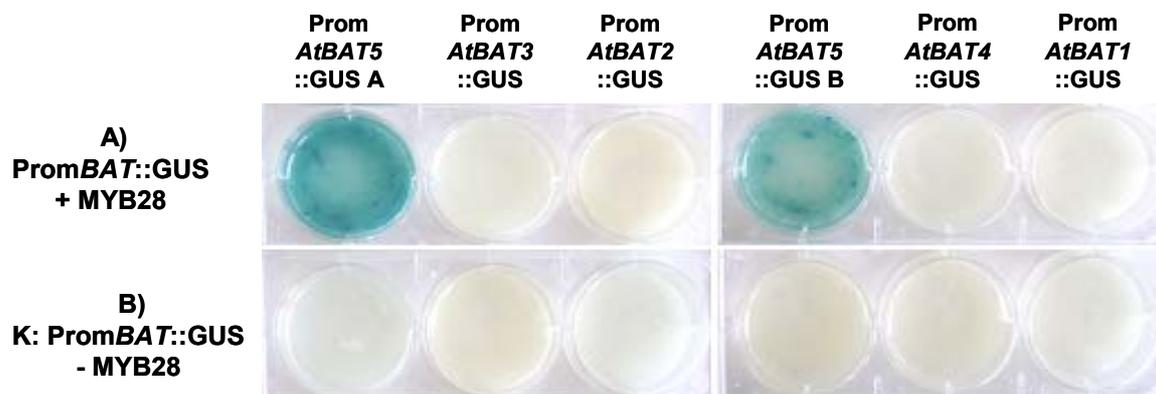


Abb. 30: Cotransformationsassay von MYB28 und *BAT*-Promotor::GUS-Konstrukten. *A. thaliana*-Zellen wurden mit Agrobakterien inkuliert, die zuvor nur mit Prom*BAT*::GUS-Konstrukten (**B**) oder zusätzlich mit einem MYB28-kodierenden Konstrukt (**A**) transformiert worden waren. Nach 48stündiger Inkubation erfolgte die GUS-Färbung.

Die erzielten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass *BAT5* an der Biosynthese von aliphatischen Glucosinolaten beteiligt sein könnte, wohingegen über die Funktion der anderen *BAT*-Proteine in *A. thaliana* bisher keine Aussagen getroffen werden können.

4.2. Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten, die in *BAT*-Genen betroffen sind

Um die Beteiligung von BAT5 im Syntheseweg für aliphatische Glucosinolate zu bestätigen und die Funktionen der anderen BAT-Proteine weiterführend zu untersuchen, sollten T-DNA-Insertionsmutantenlinien identifiziert und charakterisiert werden.

4.2.1. Isolierung homozygoter T-DNA-Insertionsmutantenpflanzen

Für alle *BAT*-Gene konnten *Knock-out*-Linien gefunden werden. Eine Auswahl ist in Tabelle 8 aufgelistet und war Gegenstand detaillierter Untersuchungen.

Tabelle 8: Auswahl von analysierten T-DNA-Insertionslinien, die in *BAT*-Genen betroffen sind.

Protein	At-Nummer	Insertionslinie	Bezeichnung
AtBAT1	At2g26900	SALK_101808	<i>bat1-2</i>
AtBAT2	At1g78560	Gabi-Kat179E05	<i>bat2-2</i>
AtBAT3	At3g25410	Gabi-Kat479D02	<i>bat3-2</i>
AtBAT4	At4g22840	SALK_044369	<i>bat4-2</i>
AtBAT5	At4g12030	SALK_126525	<i>bat5-1</i>

Wie unter 3.2.1. bereits beschrieben, erfolgte zunächst die Isolierung homozygoter Individuen, die für jede Linie erfolgreich abgeschlossen wurde. Der Ort der T-DNA-Insertion sowie der Nachweis der Inaktivierung beider Allele gelang erneut mittels PCR (Abb. 31).

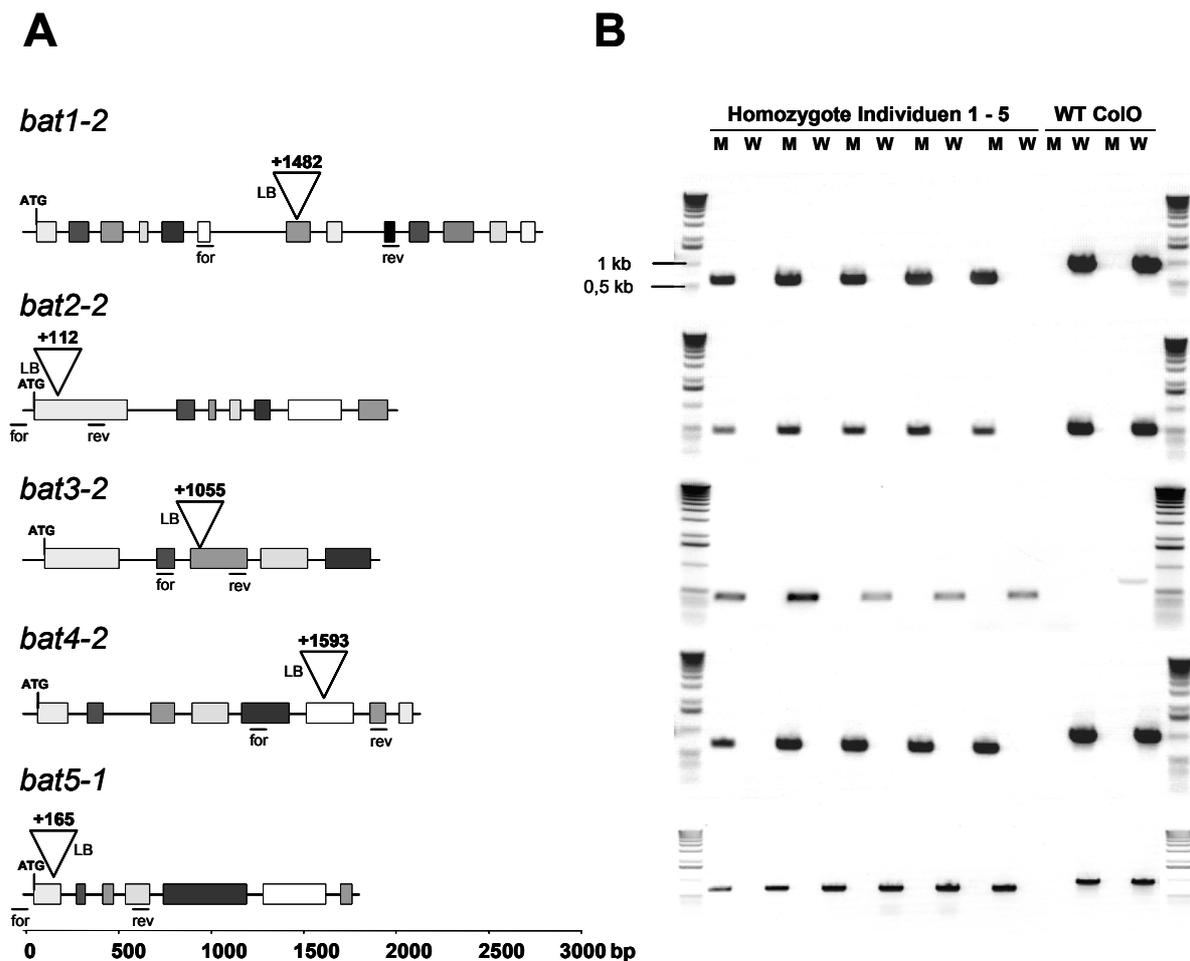


Abb. 31: Identifizierung homozygoter *BAT*-T-DNA-Insertionslinien. **A)** Schematische Darstellung der Genloci mit Exons und Introns sowie identifiziertem Insertionsort relativ zum ATG und Primerbindestellen LB (*left border* der T-DNA), for + rev (genspezifische Primer), **B)** Ergebnis der PCR-Reaktionen für je 5 homozygote Pflanzen und je 2 Wildtyppflanzen (WT ColO), Reaktion M mit Kombination der Primer LB + for bzw. rev, Reaktion W mit Kombination der Primer for + rev

4.2.1. Verifizierung des Genausfalls mittels RT-PCR

Die Verifizierung des Genausfalls in den homozygoten Pflanzen jeder Linie ist essentiell, um die Abwesenheit der mRNA und damit des Proteins sicherzustellen.

Wie in Abb. 32 dargestellt, sind in keiner der ausgewählten Linien, mit Ausnahme der Kontrollen, Transkripte nachweisbar. Somit konnten diese Linien zu weitergehenden Untersuchungen herangezogen werden.

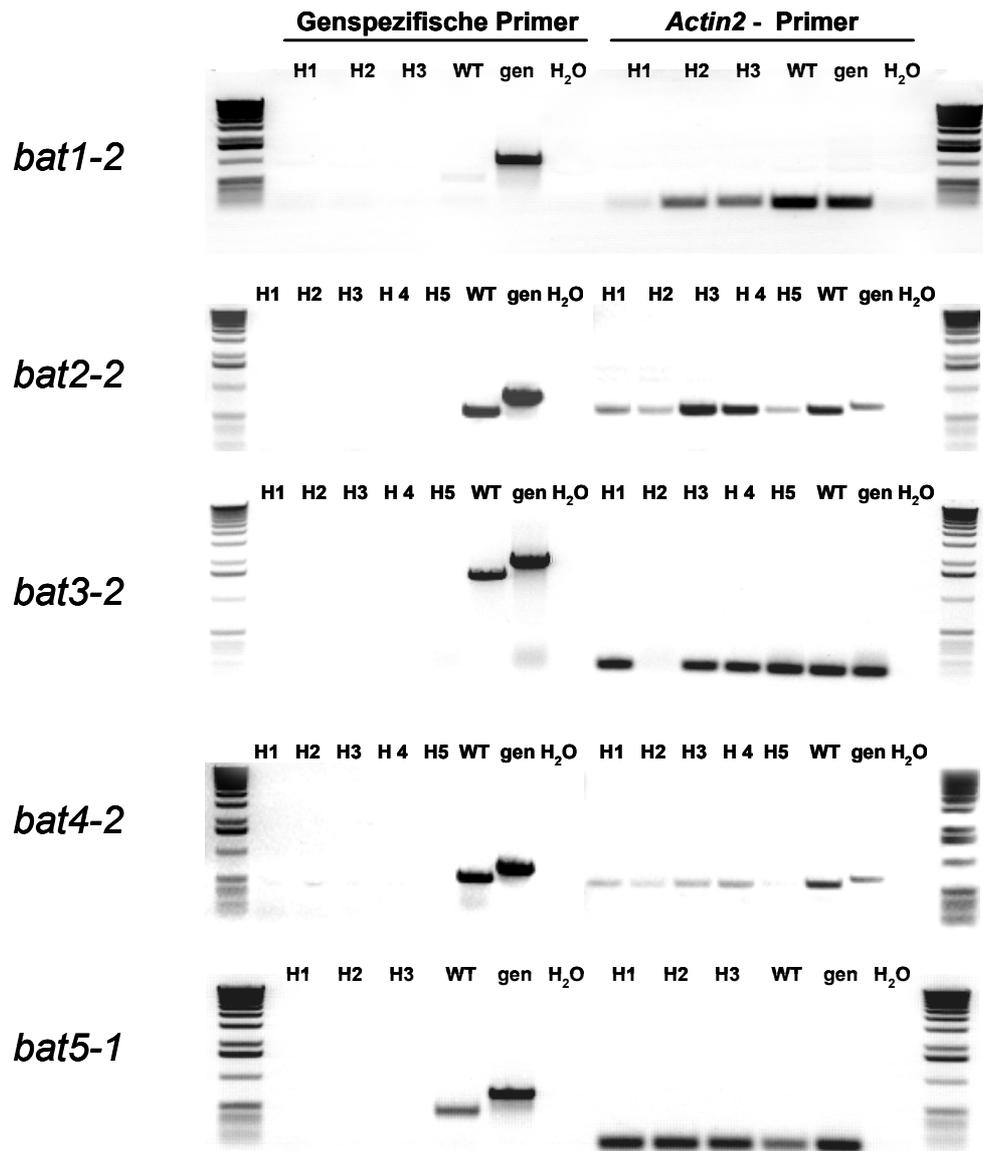


Abb. 32: Überprüfung homozygoter *BAT*-T-DNA-Insertionslinien auf *BAT*-Expression mittels RT-PCR. RNA aus Blattrosetten wurde in cDNA umgeschrieben und diente als Template, das mit den angegebenen Primerkombinationen für jeweils 35 Zyklen amplifiziert wurde. H1, H2 usw.: homozygote Pflanze Nummer 1, 2 usw.; Als Positivkontrolle diente cDNA des Wildtyps ColO (WT) und genomische DNA (gen) sowie H₂O als Negativkontrolle.

4.2.2. Bestimmung der Anzahl der Insertionen mittels *Southern-Blot*-Analyse

Die Bestimmung der Anzahl der T-DNA-Insertionen im Genom der jeweiligen Linie ist von Bedeutung, um abzusichern, dass ein evtl. beobachteter Phänotyp kausal auf nur eine T-DNA-Insertion, nämlich die im gewünschten Zielgen, zurückgeführt werden kann. Werden als Ergebnis der *Southern-Blot*-Analyse jedoch mehrere

Insertionen im Genom gefunden, kann nur eine Komplementation der Mutante mit dem jeweiligen Zielgen den Zusammenhang zwischen Genausfall und Phänotyp belegen.

Im Falle der *BAT-Knock out*-Linien konnte in der Linie *bat3-2* das Vorhandensein nur einer Insertion bestätigt werden, während alle anderen Linien 2 oder mehr T-DNA-Insertionen aufwiesen (Abb. 33).

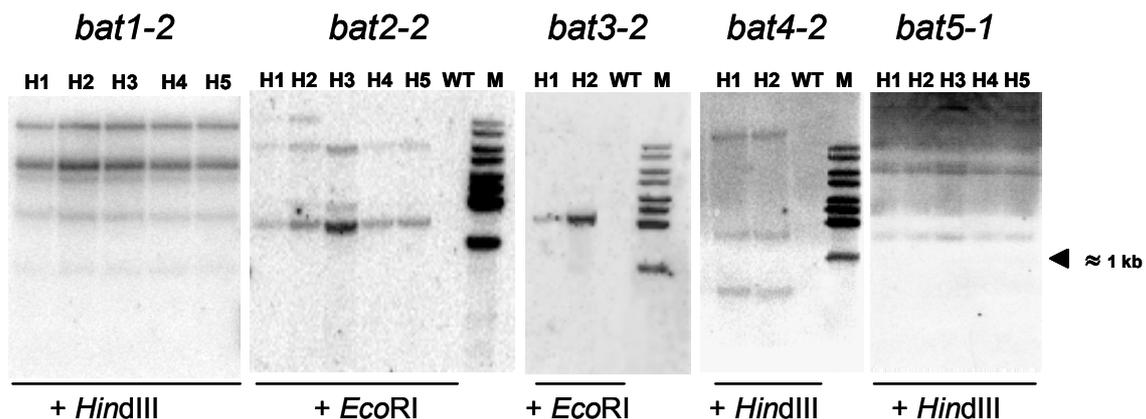


Abb. 33: Southern-Blot-Analyse homozygoter *BAT*-T-DNA-Insertionslinien. Isolierte genomische DNA wurde mit *EcoRI* oder *HindIII* verdaut, einer Agarosegelelektrophorese unterzogen, geblottet und mit einer radioaktiv markierten T-DNA-spezifischen Sonde hybridisiert; H1, H2 usw.: homozygote Pflanze Nummer 1, 2 usw.; WT: Kontrolle Wildtyp ColO; M: DNA-Marker (MBI, siehe Anhang 8.3.), dessen Banden ebenfalls mit der Sonde nachgewiesen werden können.

4.2.4. Phänotypische Charakterisierung von *BAT*-T-DNA-Insertions-Mutantenlinien

Der Ausfall nur eines *BAT*-Gens führte in keinem Fall zu sichtbaren morphologischen Veränderungen im Vergleich zu Wildtyppflanzen (Abb. 38). Es konnten während der gesamten Ontogenese vom Keimungsverhalten über den Blühzeitpunkt bis hin zum Einsetzen der Seneszenz bisher keine Unterschiede zum Wildtyp konstatiert werden. Auch die Linie *bat5-1* ist morphologisch unauffällig (Abb. 38B). Da eine Funktion von *BAT5* im Biosyntheseweg für aliphatische Glucosinolate vermutet wurde, erfolgte die Aufnahme des Glucosinolatprofils für diese Linie in Zusammenarbeit mit Dr. Carolin Müller an der Universität Würzburg. Dabei zeigten

sich Unterschiede im Vergleich zu Wildtyppflanzen, insbesondere ein um etwa 50% geringerer Gehalt der aliphatischen Glucosinolate 3-Methylsulfinylpropylglucosinolat (3MSOP), 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat (4MSOB), 4-Methylthiobutylglucosinolat (4MTB) und 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat (8MSOO), während Mutante und Wildtyp vergleichbare Gehalte an den indolischen Glucosinolaten Indol-3-ylmethylglucosinolat (I3M) und 4-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat (4MOI3M) akkumulieren (Abb. 34).

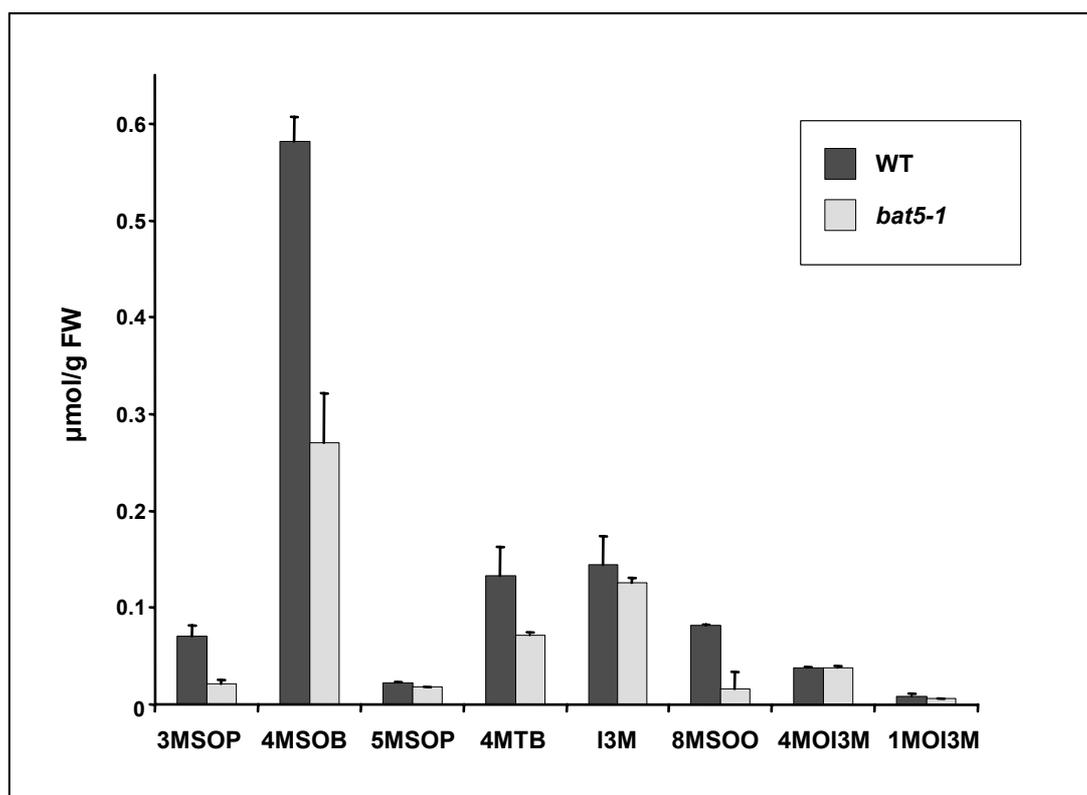


Abb. 34: Analyse der Glucosinolatgehalte des Wildtyps und von Pflanzen der Linie *bat5-1* mittels HPLC. Blattrosetten von je 3 unter Kurztagbedingungen angezogenen Pflanzen pro Linie wurden vor dem Einsetzen der Blüte geerntet und freundlicherweise von Carolin Müller (Universität Würzburg) analysiert. 3MSOP: 3-Methylsulfinylpropylglucosinolat; 4MSOB: 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat; 5MSOP: 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat; 4MTB: 4-Methylthiobutylglucosinolat; I3M: Indol-3-ylmethylglucosinolat; 8MSOO: 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat; 4MOI3M: 4-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat; 1MOI3M: 1-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat

Ausgehend von diesem Ergebnis wurde nachfolgend untersucht, ob die Expression einiger Enzyme der aliphatischen Glucosinolatsynthese in der Mutante *bat5-1* im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls verändert ist (Abb. 35). Während die Expression der

Methylthioalkylmalatsynthase *MAM1*, die den ersten Schritt des Kettenverlängerungszyklus` in den Chloroplasten katalysiert, unverändert war, konnte eine deutlich verminderte Expression aller getesteten *CYP*-Gene in der Mutante detektiert werden. Dazu zählten die Gene *CYP79F1* und *F2* sowie *CYP83A1*, die die ersten beiden Schritte der Synthese der Glucosinolatkernstruktur vollziehen (siehe Abb. 4 und Text in Einleitung).

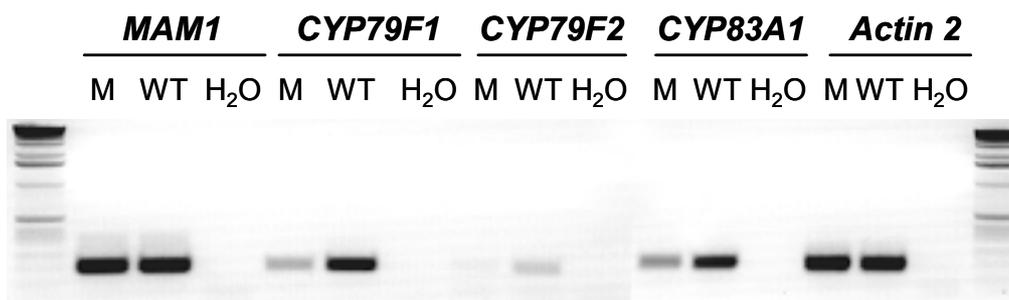


Abb. 35: Vergleich der Expression von Genen, deren Produkte die ersten Schritte der Biosynthese von aliphatischen Glucosinolaten katalysieren, in Wildtyp und *bat5-1*-Mutante mittels RT-PCR. RNA aus Blattrosetten der Mutante *bat5-1* (M) oder des Wildtyps (WT) wurde in cDNA umgeschrieben und diese mit genspezifischen Primerkombinationen für jeweils 35 Zyklen amplifiziert. Als Negativkontrolle diente Wasser (H₂O).

Die Kongruenz des Ausfalls des *BAT5*-Gens in der Mutante und die verringerte Expression der *CYP*-Gene deuteten erneut auf einen funktionellen Zusammenhang hin.

4.2.5. Herstellung von *BAT*-Doppel- und Tripel-*Knock out*-Linien

Da die Einzelmutanten morphologisch keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp aufwiesen, wurden Kreuzungen der Mutantenlinien untereinander vorgenommen. Um den genetischen Hintergrund so überschaubar wie möglich zu halten, erfolgten zunächst die Kreuzungen der zu Beginn der Doktorarbeit isolierten Linien *bat2-2* und *bat4-2* mit der Linie *bat3-2*, für welche nur eine T-DNA-Insertion nachgewiesen wurde. Es konnten in jedem Fall homozygote Individuen isoliert und der Genausfall mittels RT-PCR bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigten auch die

Pflanzen dieser Doppel-*Knock out*-Linien keine Veränderungen im Vergleich zu Wildtyppflanzen.

Aus diesem Grund wurden die doppelt homozygoten Pflanzen der beiden generierten Linien sowohl miteinander als auch mit der Linie *bat1-2* gekreuzt. Wiederum konnten für die Kombinationen *bat2-2 x bat3-2 x bat4-2* sowie *bat1-2 x bat3-2 x bat4-2* dreifach homozygote Pflanzen identifiziert werden (Abb. 36), was für die Kombination *bat1-2 x bat2-2 x bat3-2* bisher nicht gelang.

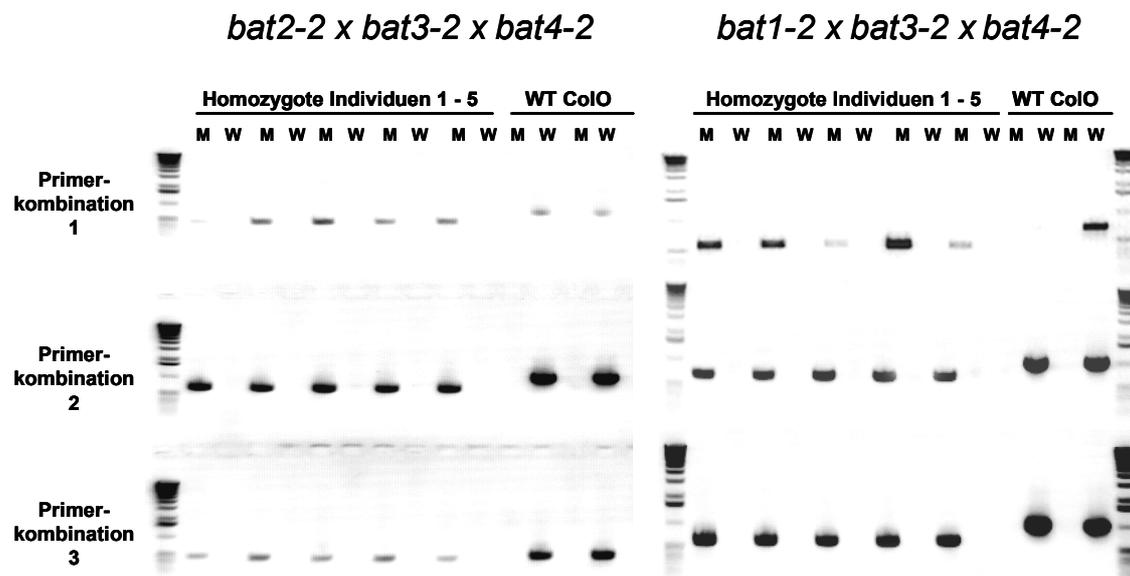


Abb. 36: Identifizierung dreifach homozygoter *BAT-T-DNA*-Insertionslinien. Ergebnis der PCR-Reaktionen unter Verwendung Mutanten-spezifischer Primerkombinationen für je 5 dreifach homozygote Pflanzen und je 2 Wildtyppflanzen (WT CoIo), siehe auch Abb. 31

Für die dreifach homozygot getesteten Pflanzen der beiden Linien wurde ebenfalls der Ausfall aller entsprechenden Gene mittels RT-PCR bestätigt (Abb. 37).

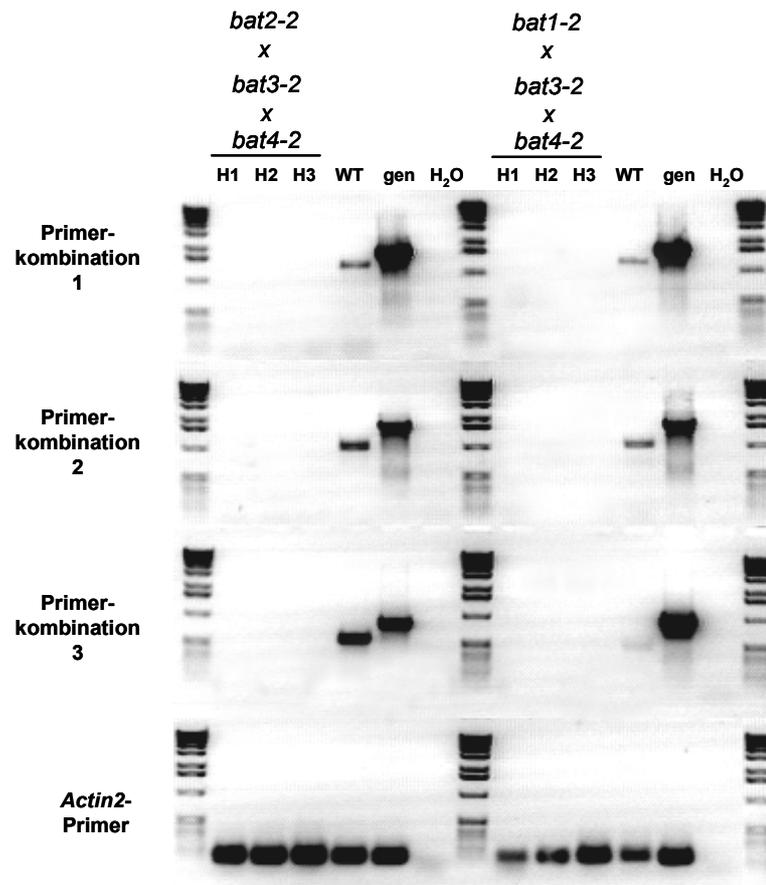


Abb. 37: Überprüfung dreifach homozygoter *BAT*-T-DNA-Insertionslinien auf *BAT*-Expression mittels RT-PCR. Als Template diente cDNA aus Blattrosetten, die mit den angegebenen Primerkombinationen für jeweils 35 Zyklen amplifiziert wurde. H1, H2 usw.: homozygote Pflanze Nummer 1, 2 usw.; WT: Kontrolle Wildtyp ColO-cDNA; gen: genomische DNA, H₂O: Wasserkontrolle

Nach den Kreuzungen standen Linien mit jeweils drei ausgeschalteten *BAT*-Genen zur Verfügung. Aus Zeitgründen konnte jedoch nur eine erste phänotypische Bewertung dieser Mutanten erfolgen. Weiterführend erscheint ihre eingehende physiologische Charakterisierung lohnend.

4.2.6. Phänotypische Charakterisierung von T-DNA-Insertions-Mutantenlinien nach Ausfall mehrerer *BAT*-Gene

Für keine der erzeugten Doppelmutanten konnte ein im Vergleich zum Wildtyp veränderter Phänotyp beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies trifft auch auf die isolierten Tripelmutanten *bat2-2 x bat3-2 x bat4-2* sowie *bat1-2 x bat3-2 x bat4-2* zu (Abb. 38A). Im Verlauf der Ontogenese konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

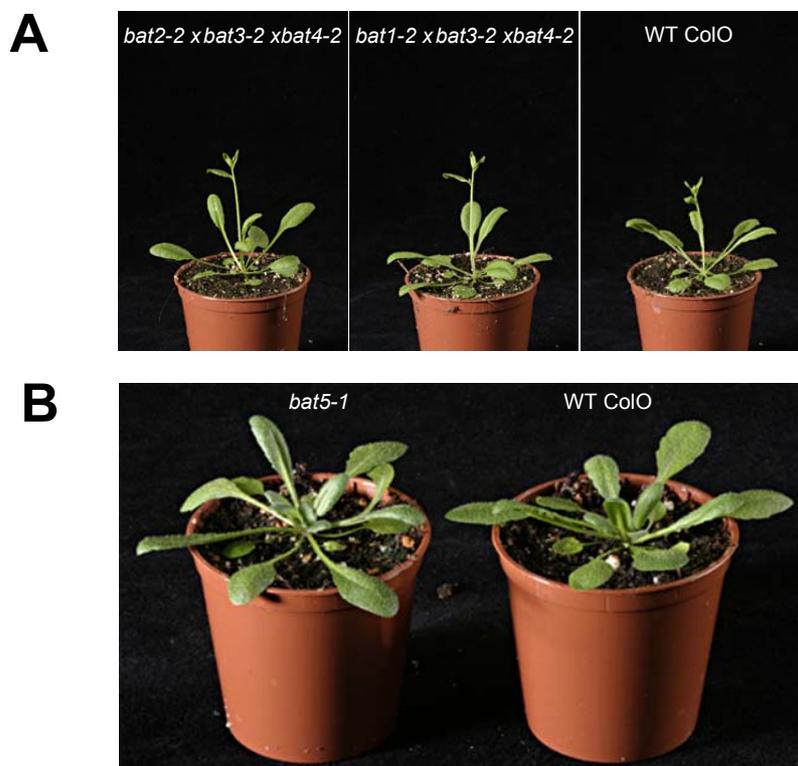


Abb. 38: Vergleich der Phänotypen von *BAT*-Knock-out-Linien mit dem des Wildtyps nach Wachstum unter Gewächshausbedingungen. Die homozygoten Tripelmutantenlinien *bat2-2 x bat3-2 x bat4-2* sowie *bat1-2 x bat3-2 x bat4-2* (**A**) sowie die Mutante *bat5-1* (**B**) wurden nach ca. 4 bzw. 3 Wochen fotografiert.

4.3. Intrazelluläre Lokalisation der BAT-Proteine

Die bisher erhaltenen Ergebnisse weisen auf eine Funktion von BAT5 im Glucosinolatstoffwechsel hin. Da *BAT5* wahrscheinlich für einen Transporter kodiert und innerhalb der Glucosinolatsynthese der Import von Ketomethylthiobutyrat (KMTB) vom Cytosol ins Chloroplastenstroma sowie der Export der kettenverlängerten Produkte ins Cytosol notwendig ist, könnte BAT5 diese Funktion(en) übernehmen. Dazu wäre allerdings die Lokalisation von BAT5 in Chloroplasten notwendig, die in folgenden Experimenten untersucht wurde.

Plasmide mit der kodierenden BAT-Sequenz und der *in frame* fusionierten GFP (*Green Fluorescent Protein*) kodierenden Sequenz wurden konstruiert, in BY2-Protoplasten oder in *A. thaliana*-Wurzelzellen (*AtBAT3*) transformiert und dort unter der Kontrolle des starken 35S-Promotors transient exprimiert. Da BY2-Zellen als Expressionssystem sehr gut geeignet sind, ihre Plastiden jedoch kein Chlorophyll bilden und somit Leukoplasten darstellen, ist eine Identifizierung durch Abgleich mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten in diesem System nicht möglich. Daher wurde als Kontrolle das chloroplastidär lokalisierte TPT::GFP-Protein mitgeführt (Ferro *et al.*, 2002, 2003; Froehlich *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass alle BAT-Proteine in Kompartimenten mittlerer Grösse lokalisieren, die zum Teil um den Zellkern gruppiert sind (Abb. 39). Nach Overlay mit dem Durchlichtbild wird erkennbar, dass diese Kompartimente mit großer Wahrscheinlichkeit Plastiden darstellen. Zusätzlich ergibt der Vergleich der Lokalisierung von BAT::GFP Proteinen und dem TPT::GFP-Protein ein vergleichbares Muster. Somit kann die ermittelte Lokalisation tatsächlich den Plastiden zugeordnet werden. Es besteht dagegen keine Ähnlichkeit zu einer cytosolischen Lokalisation, die eine diffuse Verteilung der GFP-Fluoreszenz über die ganze Zelle zur Folge hätte, wie die Kontrolle mit dem leeren Vektor zeigt (Bezeichnung: GFP). Eine mitochondriale Lokalisation würde ein ähnliches Muster ergeben, jedoch sollten dann die Strukturen deutlich kleiner sein (Murcha *et al.*, 2007).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass alle *A. thaliana*-BAT-Proteine in den Chloroplasten lokalisiert sind. Damit könnte BAT5 tatsächlich die Funktion im Biosyntheseweg für aliphatische Glucosinolate übernehmen.

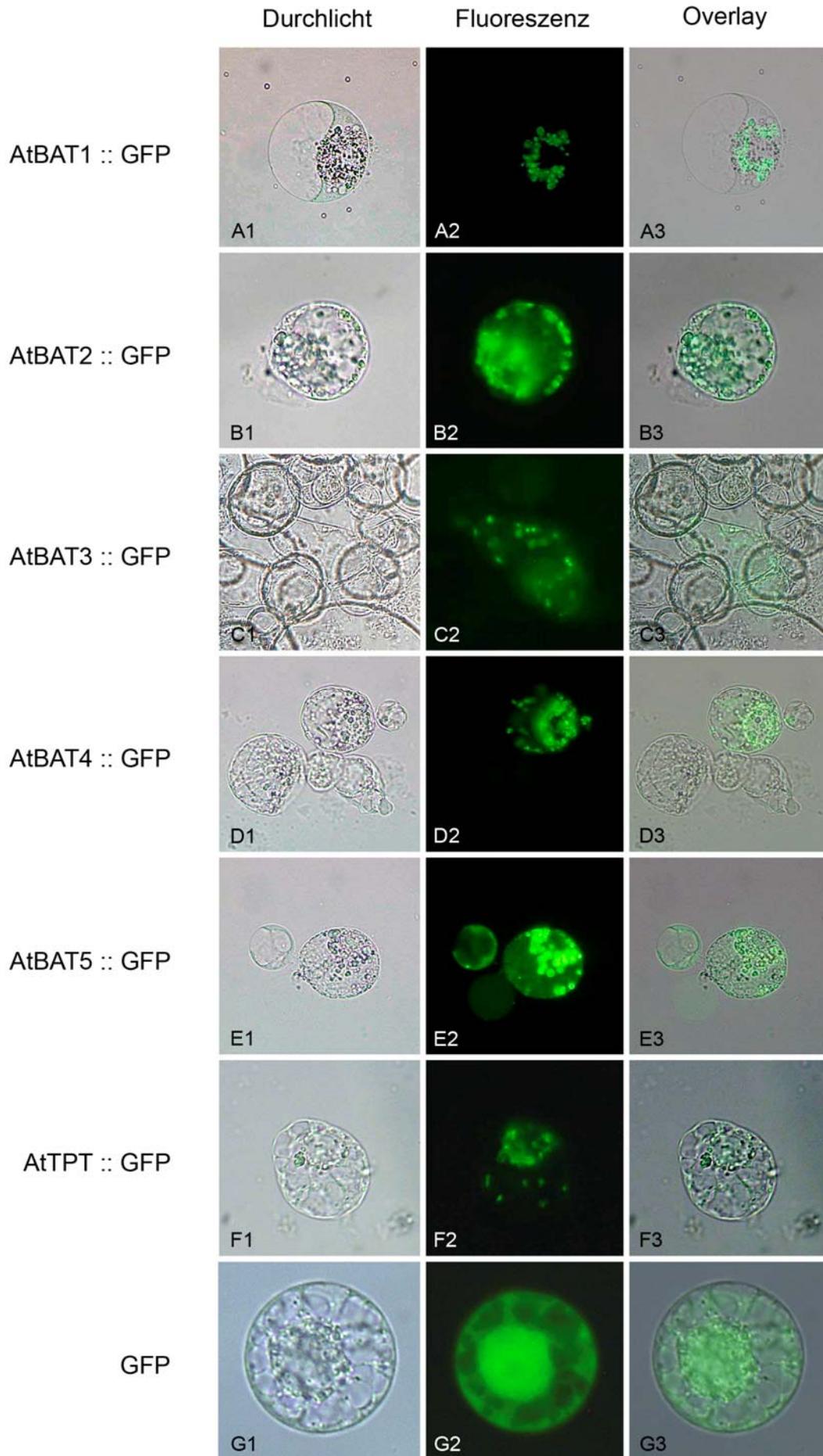


Abb. 39: Intrazelluläre Lokalisation der BAT-GFP-Fusionsproteine in BY2-Protoplasten bzw. *A. thaliana*-Zellkultur. Lichtmikroskopische (Spalte 1), fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Spalte 2) und Überlagerung der Aufnahmen (Spalte 3) von Zellen, die transient nebenstehende Proteine produzierten TPT: chloroplastidär lokalisierter Triosephosphat-Phosphat-Translokator; GFP: cytoplasmatisch lokalisiertes GFP-Protein

4.4. Heterologe Expression von *BAT*-Genen in *S. cerevisiae*

Zur Klärung der Funktion von BAT5 und der anderen BAT-Proteine in *A. thaliana* sollten im Folgenden Transportversuche mit gereinigten und rekonstituierten Proteinen durchgeführt werden. Dazu erfolgte die Synthese von BAT-Proteinen in *S. cerevisiae* nachdem die cDNAs in den Hefeexpressionsvektor pYes-NT kloniert wurden. Dieser Vektor zeichnet sich durch das URA3-Gen als Selektionsmarker, die Induzierbarkeit durch Galactose und das Vorhandensein von N- und C-terminalen 6 x His-Tags aus. Für die *BAT*-Gene wurde eine Fusion mit dem N-terminalen Tag vorgenommen und das endogene Stopcodon der Proteine genutzt. Dabei wurde jeweils nur die das reife Protein kodierende Sequenz verwendet, um eine spätere Lokalisation der überexprimierten Transportproteine in der Plasmamembran der Hefe zu erreichen und Fehlleitungen in schwerer zu isolierende Kompartimente der Hefe zu verhindern. Nach Induktion mit Galactose konnte durch *Western-Blot*-Analyse jedes Protein detektiert werden. Die optimale Induktionszeit betrug 6 Stunden (Abb. 40). Es wird deutlich, dass die Produktion von BAT1, -4 und -5 stärker als die von BAT2 und -3 war. Weiterhin ist der Abbildung zu entnehmen, dass auch ein ca. 37 kDa großes Hefeprotein schwach mit dem verwendeten Anti-His-Antikörper kreuzreagiert, was durch die Detektion dieser Bande in der Kontrolle (pYes-NT) belegt wird. Da die Größe der BAT-Proteine nach Entfernung der jeweiligen Transitpeptidsequenz in jedem Fall bei ca. 36 kDa liegt, waren beide Banden jedoch gut zu unterscheiden.

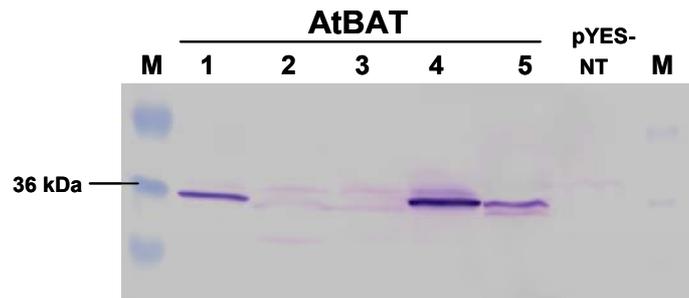


Abb. 40: Western-Blot-Analyse zum qualitativen Nachweis der BAT-Proteine in Hefezellen. Nach 6-stündiger Induktion wurde Hefe-Gesamtmembranextrakt gewonnen und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer auf PVDF-Membranen und der immunologische Nachweis mittels anti-penta-His-Antikörper. M: Marker; AtBAT: WT-Hefestamm transformiert mit *BAT1-5* enthaltendem Vektor pYes-NT; pYes-NT: WT-Hefestamm transformiert mit leerem Vektor

4.4.1. Aufreinigung der heterolog synthetisierten BAT-Proteine über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie

Um die Transportaktivität der BAT-Proteine unabhängig von endogenen Transportern der Hefe zu analysieren, wurde eine Aufreinigung der Proteine über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Die Proteine His-BAT1-4 ließen sich problemlos und nahezu bis zur Homogenität reinigen (Abb. 41). Für His-BAT5 konnten jedoch weder im Silbergel noch im *Western Blot* Signale in den Elutionsfraktionen detektiert werden. Aus diesem Grund wurde *BAT5*-cDNA ohne Transitpeptid kodierende Sequenz in den freundlicherweise von Prof. Sauer (Universität Erlangen) zur Verfügung gestellten Hefeexpressionsvektor pEX-Tag kloniert, der über Genabschnitte verfügt, die eine C-terminale Biotinylierungsdomäne und einen 6xHis-Tag kodieren (Stolz *et al.*, 1995). Damit waren zwei Möglichkeiten der Reinigung gegeben, zum einen über den biotinylierten Tag und dessen sehr spezifische Bindung zu Avidin und zum anderen durch Nutzung des His-Tags, der jetzt jedoch C-terminal weiter verschoben ist und somit besser zugänglich sein sollte. Nur die Aufreinigung mittels Ni^{2+} -NTA führte zum Ziel (Abb. 41). Im Falle von BAT5 konnten zwar nicht alle Hefeproteine abgetrennt werden, doch stellt die prominenteste Bande bei ca. 49 kDa das gesuchte Protein dar. Der Größenunterschied ist auf das Vorhandensein der Biotinylierungsdomäne zurückzuführen.

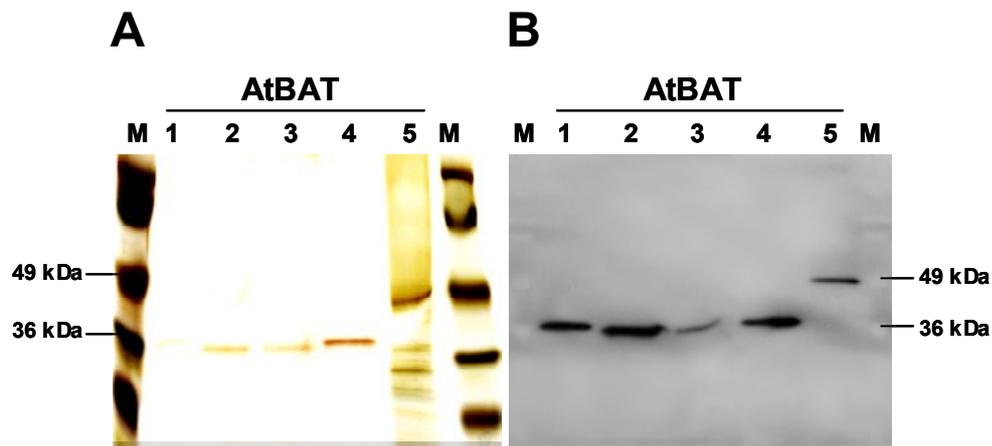


Abb. 41: Aufreinigung der in Hefe synthetisierten BAT-Proteine mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Silber-Färbung (A), der immunologische Nachweis mittels anti-penta-His-Antikörper (B). Es wurde jeweils eine Elutionsfraktion nach Reinigung aufgetragen. M: Marker

4.5. Transportexperimente zur Identifizierung des Substrates pflanzlicher BAT-Proteine

Hierzu wurde wiederum das etablierte Proteoliposomensystem genutzt. Im Gegensatz zu den Transportversuchen mit Nukleotidzuckertransportern standen zu den Substraten und dem Transportmechanismus der BAT-Carrier in Pflanzen allerdings keine gesicherten Informationen zur Verfügung. Anhand der Lokalisation der Enzyme in den Chloroplasten und der aufgezeigten Verbindung zum Syntheseweg der aliphatischen Glucosinolate wurde daher folgende Arbeitshypothese aufgestellt. Im Cytoplasma erfolgt die Synthese von Ketomethylthiobutyrate (KMTB) ausgehend von Methionin. Dieses Intermediat könnte durch einen der untersuchten Transporter, insbesondere BAT5, in die Chloroplasten transportiert werden. Im Stroma erfolgt die Kettenverlängerung von KMTB unter anderem durch die dort lokalisierten Enzyme MAM1 bzw. MAM3, woraufhin die entstehenden Produkte wiederum aus den Chloroplasten exportiert werden müssen. Auch hier könnten BAT-Proteine beteiligt sein. Die im Chloroplastenstroma synthetisierten Ketosäuren weisen unterschiedliche Kettenlängen auf, so dass die Anzahl der möglichen Substrate groß ist. Gleichzeitig sind diese Substrate nicht in radioaktiver Form erhältlich. Das im Cytoplasma anfallende KMTB ist ebenfalls nicht

als radioaktives Substrat verfügbar. Da es sich aber vom Methionin ableitet, sollte die Deaminierung von radioaktivem Methionin zur Herstellung des putativen Substrates KMTB im eigenen Labor durchgeführt werden. Dazu war die Etablierung einer möglichst quantitativen enzymatischen Umsetzung essentiell.

4.5.1. Herstellung von radioaktiv markiertem Ketomethylthiobutyrat (KMTB)

Die Herstellung von KMTB erfolgt prinzipiell durch enzymatische Abspaltung der Aminogruppe vom Methionin. Dies kann über zwei Wege geschehen: zum einen durch Einsatz einer Transaminase (Schuster *et al.*, 2006) und zum anderen durch oxidative Deaminierung, die ebenfalls enzymgetrieben ist, aber einem anderen Reaktionsmechanismus folgt (Ogier *et al.*, 1993). Beide Ansätze wurden verfolgt.

Zur Nutzung einer Transaminierung wurde das für die lösliche Transaminase BCAT4 aus *A. thaliana* kodierende Gen in den Expressionsvektor pDEST17 kloniert und in *E. coli* überexprimiert (Abb. 42A + B, Spur 1). Die Reinigung des mit einem His-Tag versehenen Proteins erfolgte durch Affinitätschromatographie (Abb. 42). Anschließend wurde die Funktionalität in einem Enzymtest nach Schuster & Binder (2005) nachgewiesen. Die Ausbeuten an KMTB waren allerdings gering und von der Qualität der verwendeten Enzymreinigung abhängig.

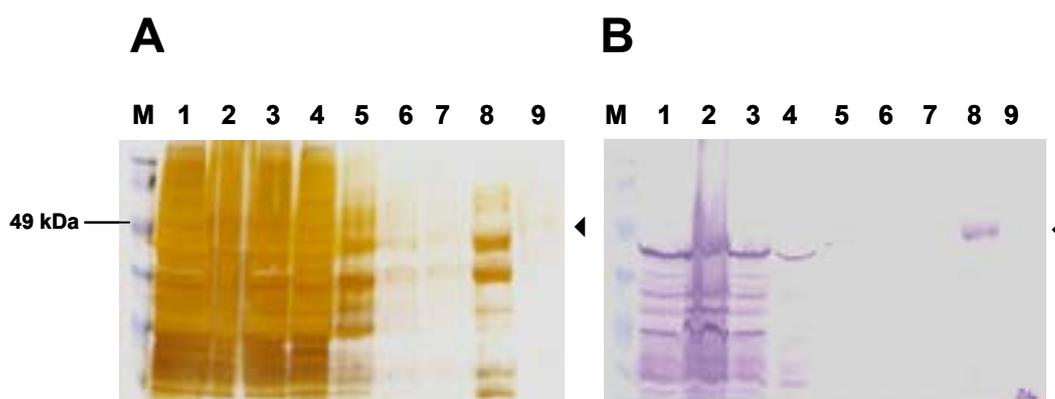


Abb. 42: Synthese in *E. coli* und Aufreinigung mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie der Transaminase AtBCAT4. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Silberfärbung (A) und immunologischen Nachweis mittels anti-penta-His-Antikörper (B). M: Marker; 1: *E. coli* Gesamtproteinextrakt; 2: Membranfraktion; 3: Durchfluss; 4-6: Waschfraktionen 1-3; 7-9: Elutionsfraktionen 1-3

Alternativ wurde daher die Umsetzung von Methionin durch eine Aminosäure-Oxidase einbezogen. Für diese Reaktion konnte die nahezu vollständige Umsetzung des eingesetzten Methionins zu KMTB demonstriert werden. In Abb. 43 ist ein exemplarisches Ergebnis einer solchen Synthese gezeigt. Zunächst fällt auf, dass das eingesetzte Ausgangssubstrat nur einen geringen Teil an Methionin enthielt. Ein Vergleich zwischen Ninhydrinfärbung und Autoradiogramm lässt aber erkennen, dass im Syntheseansatz nach Abtrennung von Methioninresten mittels Kationenaustauschersäule ^{35}S -KMTB vorhanden ist.

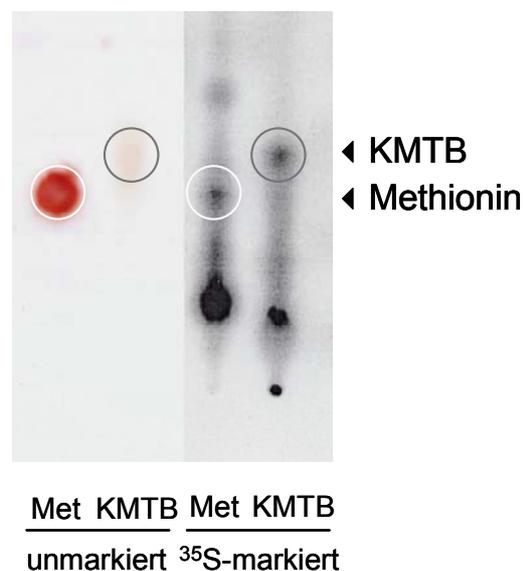


Abb. 43: Dünnschichtchromatographie nach Synthese von KMTB aus Methionin. Der Nachweis erfolgte mittels Ninhydrinfärbung für die unmarkierten Substrate (links) und durch Autoradiographie (rechts) des Ausgangssubstrats ^{35}S -markiertes Met und nach Synthese und Aufreinigung von ^{35}S -markiertem KMTB.

Aufgrund dieser hohen Effizienz wurde diese Strategie für die Herstellung von KMTB als Transportsubstrat aus ^{35}S -markiertem Methionin angewandt.

4.5.2. Transportexperimente mit ^{35}S -KMTB als putativem Substrat pflanzlicher BAT-Proteine

Das hergestellte ^{35}S -KMTB wurde bei Transportversuchen als Tracer im externen Medium eingesetzt. Da über den Transportmechanismus in Pflanzen keine Informationen vorliegen, wurde zunächst der am einfachsten zu messende

Mechanismus getestet: der Transport nur eines Substrats in beide Richtungen. Dazu wurden Liposomen ohne oder nach Vorbeladung mit 25 mM KMTB eingesetzt.

Überraschenderweise konnte eine starke Bindung von ^{35}S -KMTB an leere Liposomen ohne rekonstituierte Proteine beobachtet werden (Abb. 44). Auch nach Rekonstitution von Membranproteinen aus mit leerem Vektor transformierten Wildtyp-Hefezellen wurde eine starke Adsorption bzw. ein Transport gemessen (Abb. 44). Aufgrund dieser hohen Hintergrundaktivität kann die vermutete Aufnahme von KMTB durch in Liposomen rekonstituierte BAT5-Proteine nicht bewertet werden.

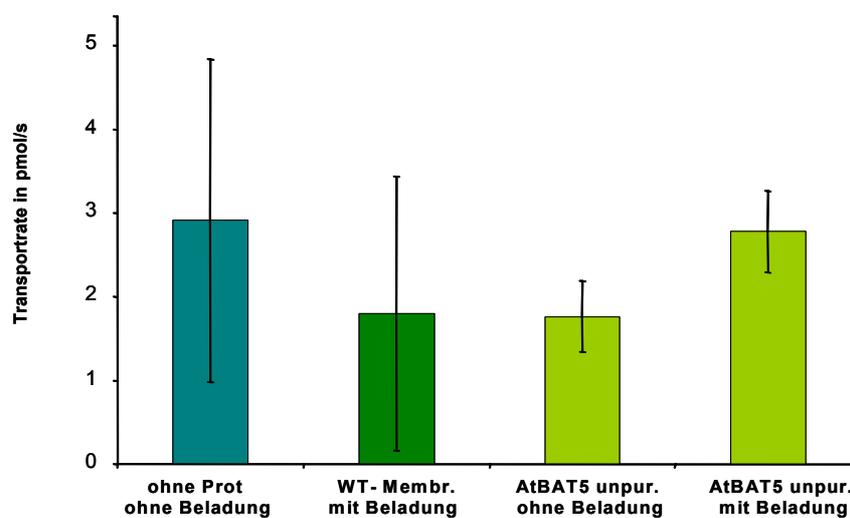


Abb. 44: Aufnahme von ^{35}S -KMTB in Liposomen mit Wildtyp- und BAT5-Gesamtmembranproteinfraktionen. Es wurden Gesamtmembranfraktionen von Wildtyphefen inklusive leerem Vektor (WT-Membr.) und der das BAT5-Protein überexprimierenden Hefen (BAT5 unpur.) in Liposomen rekonstituiert. Vor der Rekonstitution erfolgte die Vorformung der Liposomen mit oder ohne Vorbeladung mit 25 mM KMTB. Es sind die Mittelwerte aus durchschnittlich 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

Da die Aktivität der BAT-Proteine im Gesamtproteinextrakt nicht für die Detektion ihrer Aktivität ausreichen könnte, wurden im Folgenden Transportexperimente mit gereinigtem Protein durchgeführt. In diese Versuche wurden alle BAT-Proteine einbezogen.

Aber auch die Ergebnisse dieser Experimente zeigen ein unverändertes Bild (Abb. 45). Für kein *A. thaliana*-BAT-Protein konnte der Transport von ^{35}S -KMTB unter den gewählten Bedingungen nachgewiesen werden.

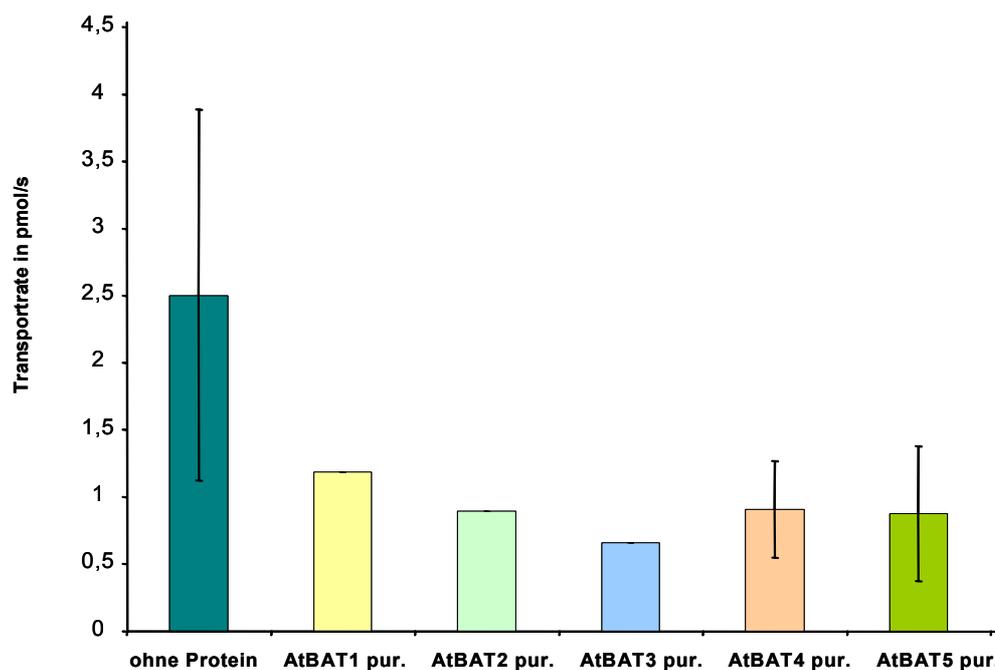


Abb. 45: Aufnahme von ^{35}S -KMTB in Liposomen mit gereinigten BAT-Proteinen. Liposomen ohne Protein bzw. nach Rekonstitution von BAT-Proteinen wurden nach Vorbeladung mit 25 mM KMTB für Transportexperimente genutzt. Es sind mit Ausnahme der Werte für AtBAT1,-2 und -3 die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten dargestellt.

Das Problem scheint in der starken Anhaftung von KMTB an Liposomen zu bestehen. Allerdings kann auch eine Diffusion von KMTB durch reine Liposomenmembranen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Durch die Rekonstitution von Membranproteinen wurden die Eigenschaften der Liposomenmembran offenbar dahingehend verändert, dass die Adhäsion bzw. Diffusion stark verringert wurde.

Abschließend muss konstatiert werden, dass unter den bisher gewählten Bedingungen keine Transportaktivität der BAT-Proteine für die Ketosäure KMTB gemessen werden konnte.

4.6. Untersuchung der Funktion von BAT-Proteinen durch Komplementation von bakteriellen Mutanten

Alternativ zur klassischen Analyse der Funktion von pflanzlichen Transportern durch die Untersuchung von T-DNA-Insertionslinien und die Rekonstitution in Liposomen, sollte aufgrund der vorgeschlagenen Funktion der BAT-Proteine als Gallensäuretransporter die Funktion im bakteriellen System studiert werden. Bakterien können aufgrund des Vorkommens von Gallensäuren im Darm oder im Boden effektive Transportmechanismen aktivieren. In Bakterien wie *Escherichia coli* oder *Corynebacterium glutamicum* sind beispielsweise unspezifische Exporter für die Entgiftung verschiedener Substrate, sogenannte *multi drug exporter* (MDR), bekannt. Allerdings sind ebenfalls Proteinsequenzen beschrieben, die der Klasse der Gallensäuretransporter zugerechnet werden (Mansour *et al.*, 2007). Als bedeutendstes MDR-System in *E. coli* gilt das AcrABToIC-System. Die Deletion des *acrB*-Gens in der sogenannten KAM3-Mutante führt zur Sensitivität von *E. coli*-Zellen gegenüber vielen toxischen Substanzen, einschließlich Gallensäuren bzw. deren Salzen (Ma *et al.*, 1995; Okusu *et al.*, 1996). Durch die Komplementation der KAM3-Mutante mit einem putativen Gallensäuretransporter aus *Bifidobacterium longum* konnte dessen Funktion als Exporter im heterologen System verifiziert werden (Price *et al.*, 2006). Diese Strategie sollte im Folgenden für alle pflanzlichen BAT-Proteine angewandt werden. Weiterhin wurden der BAT-Familie zugeordnete bakterielle Proteine aus *Synechocystis* (Sll1428) sowie drei Proteine aus *Corynebacterium glutamicum* (Cgl1258, Cgl2327, Cgl3042) mitgeführt.

Die Klonierung aller kodierenden Sequenzen erfolgte nach Amplifikation mittels PCR mit genspezifischen Primern in den Vektor pGEMT_{easy}. Als weitere Kontrolle wurde das *acrB*-Gen aus *E. coli* in die Komplementationsansätze einbezogen. Alle klonierten Fragmente wurden durch Sequenzierung überprüft und in KAM3-Zellen transformiert. Nach Überprüfung der Transformanden mittels PCR und Restriktionsanalyse wurde ein Wachstumstest auf LB-Agarplatten mit steigenden Konzentrationen an verschiedenen Gallensalzen, sowie IPTG zur Induktion der Expression, durchgeführt. Die Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt. In Abb. 46 ist exemplarisch das Resultat eines Experiments dargestellt. Während der *E. coli*-Wildtyp auf allen Platten nahezu uneingeschränktes Wachstum zeigte, war für die KAM3-Mutante eine deutliche Sensitivität gegenüber

den eingesetzten Gallensalzen zu beobachten. Zellen, in denen das *acrB*-Gen ektopisch exprimiert wurde, waren viel weniger von der Wachstumshemmung durch alle Gallensalze betroffen. Die Transformation mit den Vektoren zur Expression der pflanzlichen *BAT*-Gene konnte keine Reversion der Wachstumshemmung bewirken, was auch für das aus *Synechocystis* stammende Gen *sll1428* und das aus *C. glutamicum* stammende Gen *Cgl1258* galt. Allerdings führte die Expression von *Cgl2327* aus *C. glutamicum* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Taurodesoxycholat und die Expression von *Cgl3042* zur Steigerung der Resistenz gegenüber allen eingesetzten Gallensalzen.

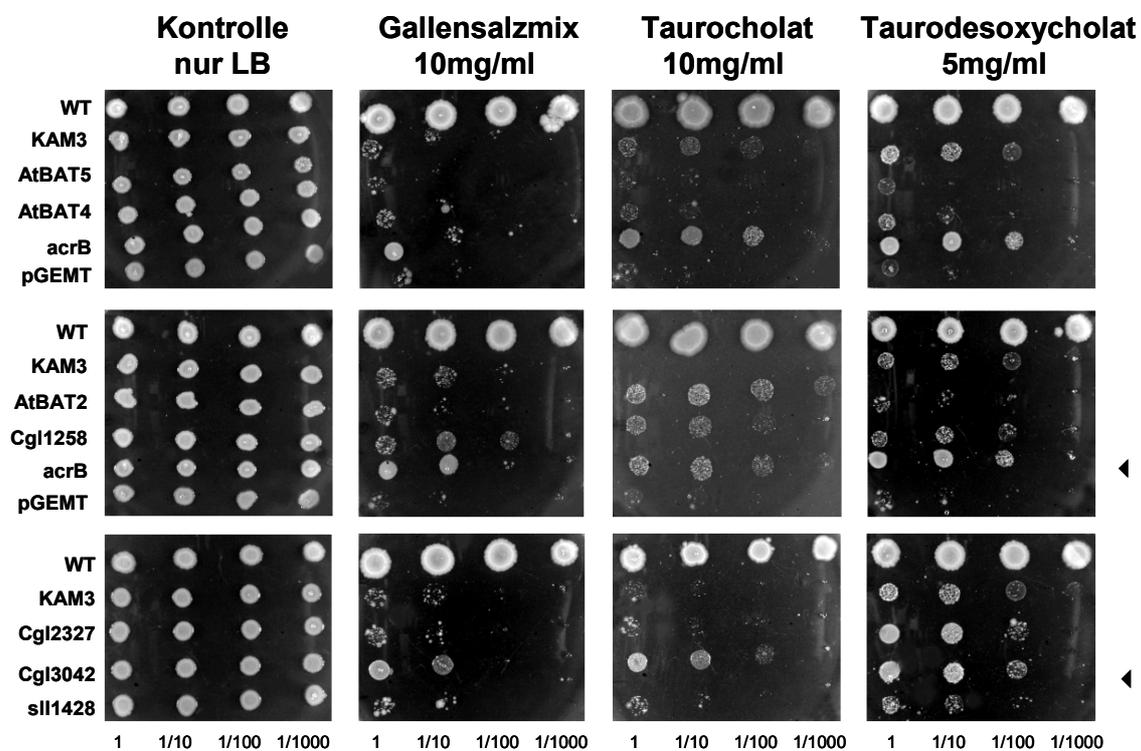


Abb. 46: Funktionelle Analyse von BAT-Proteinen durch Komplementation der *E. coli*-KAM3-Mutante. Wachstumstest von Zellen des *E. coli* Wildtyps MG1655, der von diesem WT abgeleitet, im *acrB*-Gen betroffenen Mutante KAM3 sowie von KAM3-Mutanten, die mit Vektoren zur Expression von *BAT*-Genen transformiert wurden auf LB-Agarplatten ohne und mit Zusatz von Gallensalzen. Nach Übernachtskultur in Gegenwart von IPTG wurden alle Kulturen auf eine OD_{600} von 0,8 eingestellt und 3 x 1:10 verdünnt. Von allen Ansätzen wurden jeweils 2 µl auf die LB-Agarplatten getropft und das Ergebnis nach 24stündiger Inkubation bei 37°C dokumentiert.

Somit konnte durch dieses Screening-System *Cgl3042* als potentieller Gallensäuretransporter identifiziert werden. Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Kay Marin vom Institut für Biochemie an der

Universität zu Köln eine *Knock out*-Mutante und eine Überexpressionsmutante von *Cgl3042* hergestellt. Die Inaktivierung des Gens *Cgl3042* erfolgte durch Insertion einer Kanamycinresistenzgenkassette und die Überexpression mittels des Vektors pEKEX-Strep. Beide erzeugten Mutanten wurden zunächst wiederum auf Agarplatten Wachstumstests unterzogen. Dabei war die *Knock-out*-Mutante auf dem Komplexmedium LB nicht sensitiver als der Wildtyp-Stamm gegenüber den eingesetzten Gallensalzkonzentrationen nach 24 h Inkubation (Abb. 47A). Im Gegensatz dazu wuchs die Überexpressionsmutante bei Zusatz des Gallensalzgemisches nach 48 h auf Vollmedium deutlich besser als Wildtypzellen (Abb. 47B). Allerdings kann dieser Effekt nicht in Anwesenheit von Taurodesoxycholat beobachtet werden.

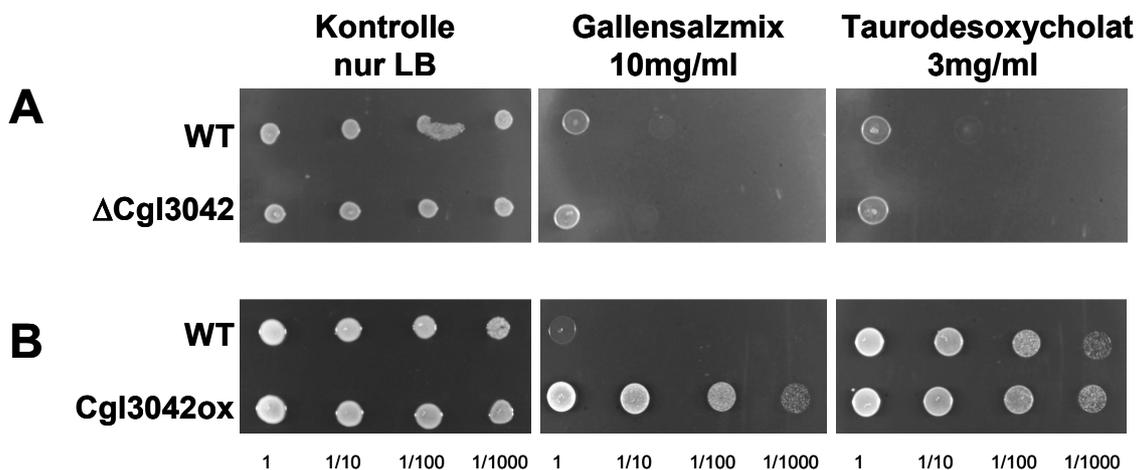


Abb. 47: Wachstum von *C. glutamicum*-Stämmen in Gegenwart von Gallensäuren auf Komplexmedium. Der Wildtyp-Stamm (WT) sowie die $\Delta Cgl3042$ *Knock-out*-Mutante (**A**) und die Überexpressionsmutante *Cgl3042ox* (**B**) wurden auf LB-Agarplatten ohne und mit den indizierten Gallensalzen kultiviert. Nach Vorkultur in flüssigem LB-Medium wurden alle Kulturen auf eine OD_{600} von 1,0 eingestellt und 3 x 1:10 verdünnt. Von den vorbereiteten Verdünnungen wurden jeweils 2 μ l nebeneinander auf LB-Agarplatten getropft. Anschließend erfolgte eine 24 (A) bzw. 48stündige (B) Inkubation der Platten bei 30°C und deren Dokumentation.

Diese ersten Resultate der Charakterisierung der im Gen *Cgl3042* betroffenen *C. glutamicum* Mutante legen nahe, dass es sich bei dem kodierten Protein um einen Gallensäuretransporter handeln könnte. Da LB allerdings ein Komplexmedium darstellt, könnten dessen Inhaltsstoffe zur Beeinflussung der Wachstumseigenschaften in Gegenwart von Gallensalzen führen und somit sekundäre Effekte für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein. Aufgrund

dessen wurde der Wachstumstest in Flüssigmedium unter Verwendung des Minimalmediums MM1 wiederholt. Dazu wurde das Messgerät Fluostar verwendet, das gleichzeitig als Inkubator und Photometer für Messansätze im 96-Well-Format fungiert. Somit war eine *online*-Messung ohne Temperaturschwankungen über einen langen Zeitraum möglich. Es wurden Wachstumskurven des Wildtyps, der Überexpressionsmutante Cgl3042ox und der *Knock-out*-Mutante Δ Cgl3042 in Ab- und Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Gallensalzmixes und von Taurodesoxycholat über einen Zeitraum von 24 Stunden aufgenommen. Je Konzentration und Kultur wurden alle 15 Minuten 2 Parallelen vermessen. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 48 zusammengefasst.

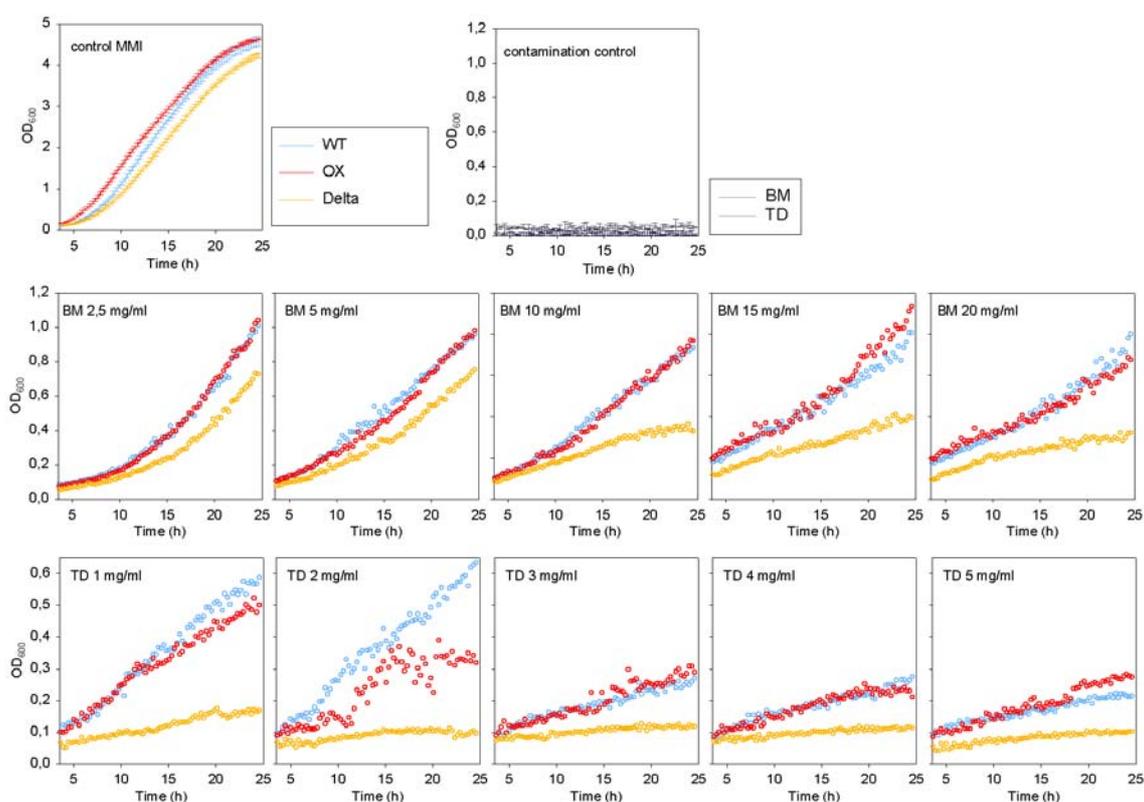


Abb. 48: Wachstum von *C. glutamicum*-Stämmen in Gegenwart von Gallensalzen in Minimalmedium. Der Wildtyp-Stamm (WT) sowie die Δ Cgl3042 *Knock-out*-Mutante (Delta) und die Überexpressionsmutante Cgl3042ox (Ox) wurden nach Übertagkultur in Vollmedium und Übernachtkultur in MM1-Minimalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 einstellt und 1:1 mit den vorbereiteten Testmedien versetzt. Anschließend erfolgte eine 24stündige Inkubation der Mikrotiterplatte bei 30°C unter ständigem Schütteln unterbrochen von Messintervallen im 15-Minuten-Abstand. BM: Bile Mix=Gallensalzmix; TD: Taurodesoxycholat; control1: Wachstum der Kulturen in MM1-Medium ohne Zusätze; control 2: nur MM1-Medium mit Zusätzen

Alle Stämme wachsen unter Kontrollbedingungen nahezu identisch. In Gegenwart steigender Konzentrationen des Gallensalzgemisches wurde das Wachstum der *Knock-out*-Mutante deutlich stärker beeinträchtigt als das der beiden anderen Stämme. Als eine der im Gallensalzmix enthaltenen Komponenten konnte für Taurodesoxycholat eine deutlich stärkere Inhibition des Wachstums der Insertionsmutante beobachtet werden, auch in Konzentrationsbereichen, in denen der Wildtyp und die Überexpressionsmutante noch deutliches Wachstum zeigten. Überraschenderweise führte die Überexpression von Cgl3042 nicht zu einem besseren Wachstum dieser Kultur im Vergleich zum Wildtyp.

Dies erschien aufgrund der Ergebnisse der Plattentests überraschend. Daher wurde die Expression von Cgl3042 mittels *Western-Blot*-Analyse überprüft (Abb. 49). Das Protein Cgl3042 konnte weder in der Gesamtproteinfraktion noch in der Membranproteinfraktion anhand seiner Strep-Tag-Markierung detektiert werden.

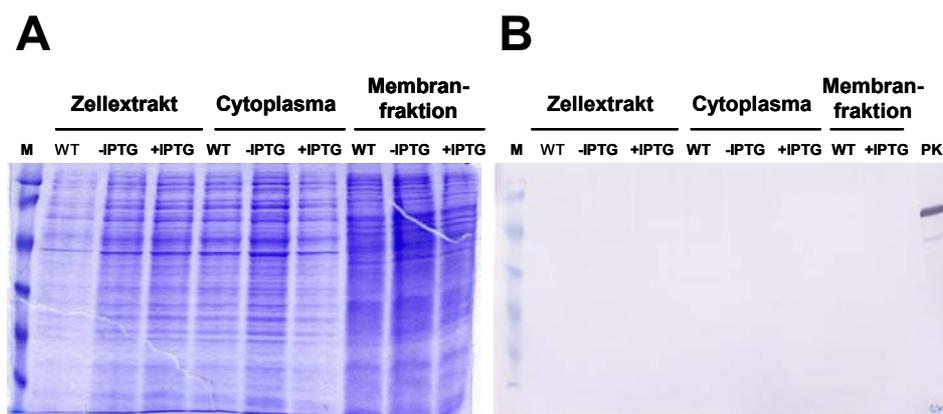


Abb. 49: Überprüfung der Synthese des Strep-getagten Proteins Cgl3042 in *C. glutamicum*-Stämmen. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Coomassie-Färbung (**A**) und durch immunologischen Nachweis mittels Anti-Strep-Antikörper (**B**). Die Fraktionierung von Proben der Kulturen Wildtyp und Überexpressionsmutante mit und ohne Induktion der Expression durch IPTG erfolgte mittels Glasperlenaufschluss und anschließender Ultrazentrifugation. M: Marker; WT: Wildtyp; + IPTG: Zellen der Überexpressionsmutante Cgl3042ox nach Induktion mit IPTG; -IPTG: Zellen der Überexpressionsmutante Cgl3042ox ohne Induktion mit IPTG; PK: Positivkontrolle Glucosylglycerol-Phosphat-Synthase aus *Synechocystis* mit Strep-Tag, freundlicherweise von Jens Novak zur Verfügung gestellt.

Damit wird deutlich, dass die Überexpressionsmutante im Minimalmedium keinen anderen Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp zeigen konnte. Unter diesen definierten Bedingungen konnte allerdings für die *Knock-out*-Mutante eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber den Salzen von Gallensäuren demonstriert werden.

Zusammenfassend lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

Für die Versuche zur Expression von für pflanzliche BAT-Proteine kodierenden Genen muss für zukünftige Ansätze die Synthese als markierte Proteine (His- oder Strep-Tag) und die anschließende Kontrolle der Expression gefordert werden, da ohne einen solchen Nachweis und die fehlende funktionelle Komplementation keinerlei eindeutige Aussagen getroffen werden können.

Für das aus *C. glutamicum* stammende Protein Cgl3042 kann erstmals eine Funktion als Exportsystem auf der Grundlage von initialen experimentellen Befunden vorgeschlagen werden. Zu dessen Substraten zählen wahrscheinlich auch Gallensäuren, insbesondere Taurodesoxycholat.

5. Diskussion

5.1. Funktionelle Charakterisierung von Transportern der AtKT-Familie in *Arabidopsis thaliana*

Das zur KT-Familie gehörende Protein AtNST-KT1 ist ein monospezifischer UDP-Galactose-Transporter.

Mit Hilfe eines neu etablierten Transportassays gelang es, das Protein At-KT1 als UDP-Galactose-Transporter zu identifizieren. Dabei wurden bereits bekannte Informationen zum Transportmechanismus von Nukleotidzuckertransportern genutzt, die seit Mitte der 1990er Jahre in einer ganzen Reihe von Experimenten aufgedeckt werden konnten. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der Transport von Nukleotidzuckern temperaturabhängig und sättigbar ist. Die korrespondierenden Nukleotidmono- und diphosphate wirken als kompetitive Inhibitoren, während nicht aktivierte Monosaccharide, Sulfate und Phosphate keinen Einfluss auf die Transportaktivität ausüben. Zur Energetisierung des Transportes bedarf es weder ATP noch eines pH-Gradienten, da die Zugabe von Ionophoren keine Veränderung der Transportraten zur Folge hat. Um die gemessene 50-100 fache Konzentrierung von Nukleotidzuckern im Lumen von Transportvesikeln im Vergleich zum externen Inkubationsmedium erklären zu können, wurde ein Antiport-Mechanismus postuliert, der durch den Einsatz von radioaktiv markierten Nukleotidmonophosphaten bewiesen werden konnte (Hirschberg, Robbins & Abeijon, 1998; Chiamonte *et al.*, 2001). Nukleotidzuckertransporter sind somit sekundär aktive Transporter, die aktivierte Zucker im Gegentausch mit dem korrespondierenden Nukleotidmonophosphat transportieren, dessen Verlagerung entlang eines Gradienten erfolgt. Transportmessungen zur Identifizierung von Nukleotidzuckertransport-Aktivitäten sind bisher vornehmlich an angereicherten Golgi-Membranvesikeln vorgenommen worden, die nach Inkubation in einer Lösung mit radioaktiv markierten Nukleotidzuckern auf Aufnahme derselben hin untersucht wurden (Gao *et al.*, 2001; Baldwin *et al.*, 2001; Norambuena *et al.*, 2002). Da die Anzahl an kommerziell erhältlichen radioaktiv markierten Substraten jedoch limitiert ist und nicht alle in Pflanzen vorkommenden Nukleotidzucker dazu zählen, sollte eine

alternative Messmethode getestet und etabliert werden. Diese beinhaltet die Verwendung von artifiziellen, aus Phosphatidylcholin bestehenden Liposomen, die mit unmarkierten Nukleotidzuckern vorbeladen wurden. In diese vorgeformten Liposomen werden anschließend heterolog in Hefe überexprimierte pflanzliche Transportproteine rekonstituiert - ein Verfahren, welches für alle plastidären Phosphattranslokatoren bereits erfolgreiche Anwendung fand (Loddenkötter *et al.*, 1993; Kammerer *et al.*, 1998; Eicks *et al.*, 2002; Knappe *et al.*, 2003b). Durch Zugabe des radioaktiv markierten Cosubstrats in Form der ³³P-markierten Nukleotidmonophosphate UMP oder GMP zum externen Medium sollte nachfolgend ein messbarer Influx derselben im Gegentausch mit dem intraliposomalen Nukleotidzucker erfolgen. Auf diese Weise ist die Bestimmung von Transportaktivitäten für alle verfügbaren Nukleotidzucker möglich. Somit bietet diese Verfahrensweise den Vorteil, kosten- und zeitsparend die ganze Bandbreite der in Pflanzen vorkommenden Nukleotidzucker als Substrate für putative Transportproteine zu testen. Im Zuge dessen können auch eventuelle Multisubstratspezifitäten von Transportern aufgedeckt werden. Während man nach der Identifizierung der ersten Transporter dieses Typs noch davon ausging, dass diese jeweils nur ein Substrat transportieren, also monospezifisch sind (Berninsone & Hirschberg, 2000), weisen neuere Befunde darauf hin, dass Multispezifität eher als die Regel und nicht als Ausnahme angesehen werden muss (Handford *et al.*, 2006). Als erster multispezifischer Nukleotidzuckertransporter wurde LPG2 aus dem Flagellaten *Leishmania donovani* charakterisiert, der neben GDP-Mannose auch GDP-Fucose und GDP-Arabinose zu transportieren vermag (Hong *et al.*, 2000; Segawa *et al.*, 2005). Aber auch für mehrzellige Eukaryoten ist die Existenz multispezifischer Transporter dokumentiert; so ist für SQV-7 aus *C. elegans* der Transport von UDP-N-Acetylgalactosamin, UDP-Glucuronsäure und UDP-Galactose beschrieben (Berninsone *et al.*, 2001) und für FRC aus *D. melanogaster* der Transport von UDP-N-Acetylglucosamin und UDP-Glucuronsäure (Goto *et al.*, 2001). Der genaue Mechanismus des Transports mehrerer Substrate ist bisher noch ungeklärt, jedoch gibt es erste Hinweise auf die Möglichkeit einer unabhängigen und simultanen Translokation zweier Substrate anhand von Untersuchungen des aus *C. elegans* bekannten UDP-N-Acetylglucosamin/N-Acetylgalactosamin-Transporters C03H5.2 (Caffaro *et al.*, 2006). Als Gemeinsamkeit für multispezifische Nukleotidzuckertransporter gilt der Transport von Zuckern, die mit demselben

Nukleotidmonophosphat aktiviert sind, also entweder ausschließlich von UDP- oder GDP-Zuckern (Handford *et al.*, 2006). Auch in *Arabidopsis thaliana* wurde mit AtUTR1 ein multispezifischer Nukleotidzuckertransporter nachgewiesen, der die UDP-Zucker von Galactose und Glucose transportiert (Norambuena *et al.*, 2002). Das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Protein AtNST-KT1 transportiert jedoch nur UDP-Galactose, während keine Transportaktivität für UDP-Glucose, UDP-Glucuronsäure und UDP-N-Acetylglucosamin gemessen werden konnte. Eine Multispezifität kann für diesen Transporter noch nicht ausgeschlossen werden, doch wurden mit den oben genannten UDP-Zuckern fast alle in Pflanzen bekannten Cosubstrate getestet. Folglich ist AtNST-KT1 mit großer Wahrscheinlichkeit ein monospezifischer UDP-Galactose-Transporter. Damit reiht sich dieses Protein in die Reihe schon bekannter Transporter für UDP-Galactose in *A. thaliana* ein, von denen neben dem schon genannten AtUTR1 noch drei weitere, ebenfalls monospezifische Transporter beschrieben sind: AtUTR2, AtUDP-GalT1 und AtUDP-GalT2 (Norambuena *et al.*, 2005; Bakker *et al.*, 2005). Diese Transporter wurden über Homologien zum menschlichen UDP-Gal-Transporter UGTrel1 bzw. durch Komplementation einer UDP-Gal-Transport-defizienten Säugerzelllinie gefunden und ihre Substratspezifität durch Transportexperimente unter Verwendung von Vesikeln aus Golgi-angereicherten Membranen untersucht. Detailliertere Analysen zur Bestimmung der kinetischen Parameter dieser Transporter wurden nicht durchgeführt. Für AtNST-KT1 kann festgehalten werden, dass der gemessene apparente K_M -Wert mit $4,2 \pm 1,2 \mu\text{M}$ für UMP mit dem K_M des UDP-Gal-Transporters aus der Rattenleber von $4,2 \mu\text{M}$ für UDP-Gal übereinstimmt (Milla *et al.*, 1992). Die für die menschlichen UDP-Gal-Transporter und das Substrat UDP-Gal bestimmten K_M -Werte betragen jeweils $1,2$ und $2 \mu\text{M}$ (Sun-Wada *et al.*, 1998), was ebenfalls in guter Übereinstimmung zu den Werten von AtNST-KT1 steht. Generell liegen alle bisher gemessenen K_M -Werte von Nukleotidzuckertransportern im Bereich von 1 - $10 \mu\text{M}$ (Hirschberg, Robbins & Abeijon, 1998).

Im Falle von K_i -Werten stehen deutlich weniger Informationen zur Verfügung. Es ist nur bekannt, dass Nukleotidmono- und diphosphate als kompetitive Inhibitoren fungieren und den Transport von Nukleotidzuckern zu einem gewissen Prozentsatz hemmen (Capasso & Hirschberg, 1984; Chiamonte *et al.*, 2001). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass Nukleotidzucker den Transport von Nukleotidmonophosphaten zu hemmen vermögen. Dies lässt sich für AtNST-KT1

bestätigen, indem UDP-Gal mit einem K_i -Wert von $5,1 \pm 1,7 \mu\text{M}$ und UDP-Gluc mit einem Wert von $12,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ als kompetitive Inhibitoren des UMP-Transports ermittelt werden konnten. Der immer noch recht geringe K_i -Wert für UDP-Gluc erscheint vor dem Hintergrund, dass kein Transport für diesen UDP-Zucker gemessen wurde, überraschend, weist aber darauf hin, dass UDP-Gluc zwar gebunden, aber nicht transloziert werden kann. Dies wiederum steht im Einklang mit der Hypothese, dass der Nukleotidbestandteil der Nukleotidzucker für die initiale Erkennung des Substrats durch den Transporter erforderlich ist, während der Zuckerbestandteil bestimmt, ob ein Transport des gesamten Moleküls erfolgt (Berninsone & Hirschberg, 2000).

In diesem Kontext stellt sich ebenfalls die Frage, ob die Identifikation einer zunehmenden Anzahl von UDP-Galactose-Transportern die Ableitung gemeinsamer Sequenzmerkmale zur Vorhersage der Substratspezifität auf Basis ihrer Aminosäuresequenz erlaubt. Seit der Charakterisierung der ersten Nukleotidzuckertransporter und im Zuge der zunehmenden Verfügbarkeit von Genominformationen für verschiedenste Organismengruppen steht diese Frage im Mittelpunkt des Interesses (Berninsone & Hirschberg, 2000; Martinez-Duncker *et al.*, 2003; Handford *et al.*, 2006). Aoki *et al.* näherten sich dieser Fragestellung, indem sie Chimären aus jeweils dem menschlichen CMP-Sialylsäure- und UDP-Galactose-Transporter herstellten und diese auf ihre Transportaktivität untersuchten (Aoki *et al.*, 2003). Dabei stellte sich heraus, dass die N- und C-Termini beider Transporter beliebig austauschbar waren, ohne einen Einfluss auf die Substratspezifität auszuüben. Als essentiell für die CMP-Sialylsäure-Transportaktivität erwiesen sich die Transmembrandomänen 2, 3 und 7 des korrespondierenden Transporters. Dagegen konnte der UDP-Galactose-Transporter seine Funktion nur erfüllen, wenn die Transmembrandomänen 1 und 8 vorhanden waren. Liegen innerhalb dieser Bereiche allgemein gültige Consensus-Sequenzen für UDP-Galactose-Transporter? Ein Vergleich aller bislang verfügbaren Proteinsequenzen von UDP-Gal-Transportern, wie in Abb. 50 dargestellt, sollte näheren Aufschluss über das Vorhandensein solcher Sequenzmotive geben.

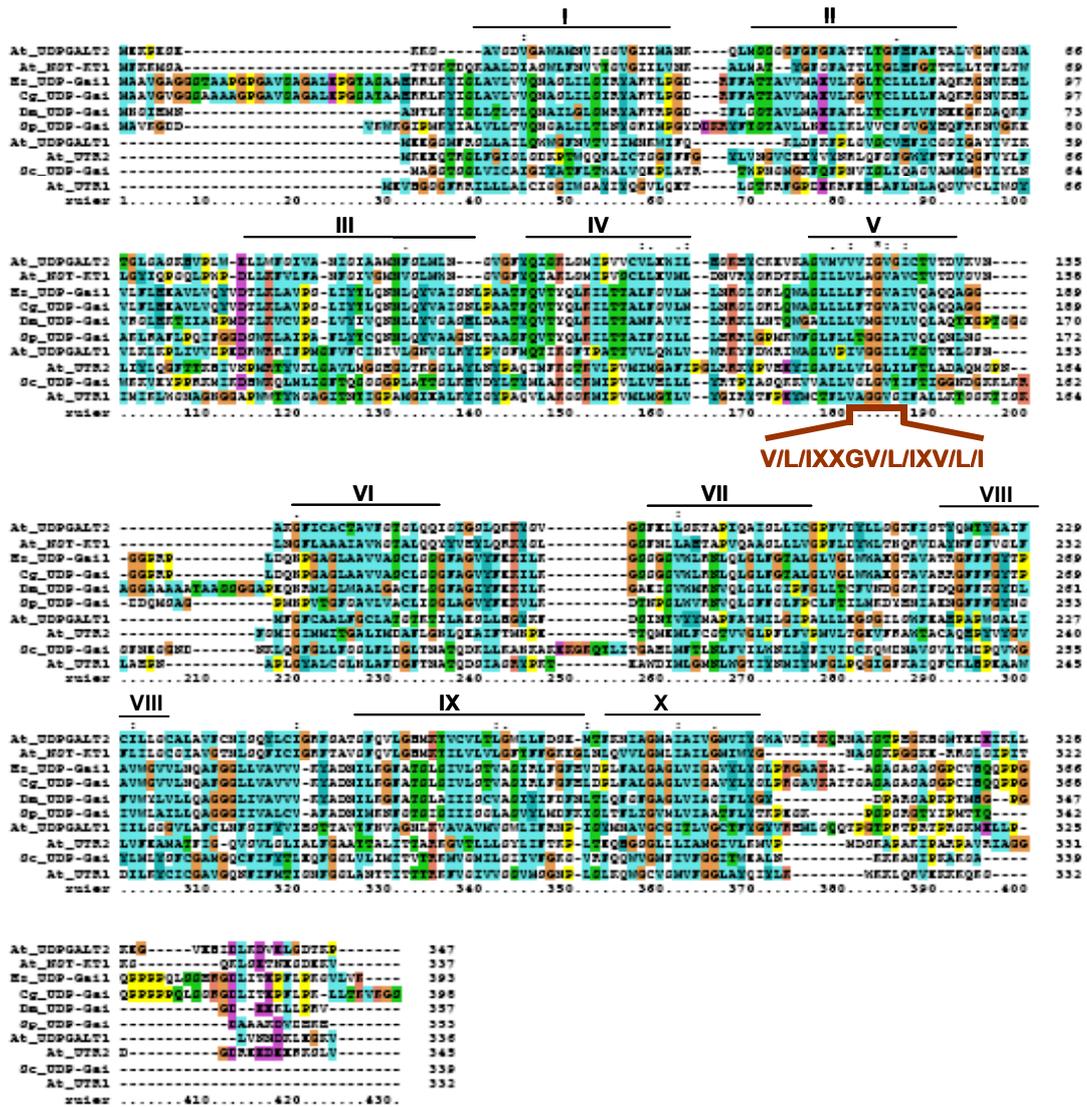


Abb. 50: Aminosäuresequenzvergleich von UDP-Galactose-Transportern. Die Lage der vorhergesagten Transmembrandomänen ist durch Linien gekennzeichnet und mit römischen Zahlen nummeriert (I–X). Das vorgeschlagene Consensus-Motiv aus unpolaren Aminosäuren in der 5. Transmembrandomäne ist rot hervorgehoben.

Es zeigt sich ein sehr heterogenes Bild, welches nur wenige konservierte Aminosäuren aufweist. Diese liegen vornehmlich in Bereichen vorhergesagter Transmembrandomänen, wobei für die Helices Nummer 1 und 8 keine außergewöhnliche Folge konservierter Reste festgestellt werden kann. Auffallend dagegen ist die Häufung konservierter Aminosäuren innerhalb der 5. Transmembrandomäne. Hier lässt sich sogar eine Art Consensus-Motiv ableiten, das aus einer Reihe ausgeprägt unpolarer Aminosäuren besteht: **VL/IXXGV/L/IXV/L/I**. Ob

das vorgeschlagene Consensus-Motiv wirklich als für UDP-Gal-Transporter spezifisch gelten kann, sollte durch einen Vergleich dieser Proteinsequenzen mit denen von Transportern anderer Nukleotidzucker überprüft werden. In Abb. 51 ist der betreffende Ausschnitt eines solchen Sequenzvergleichs wiedergegeben.

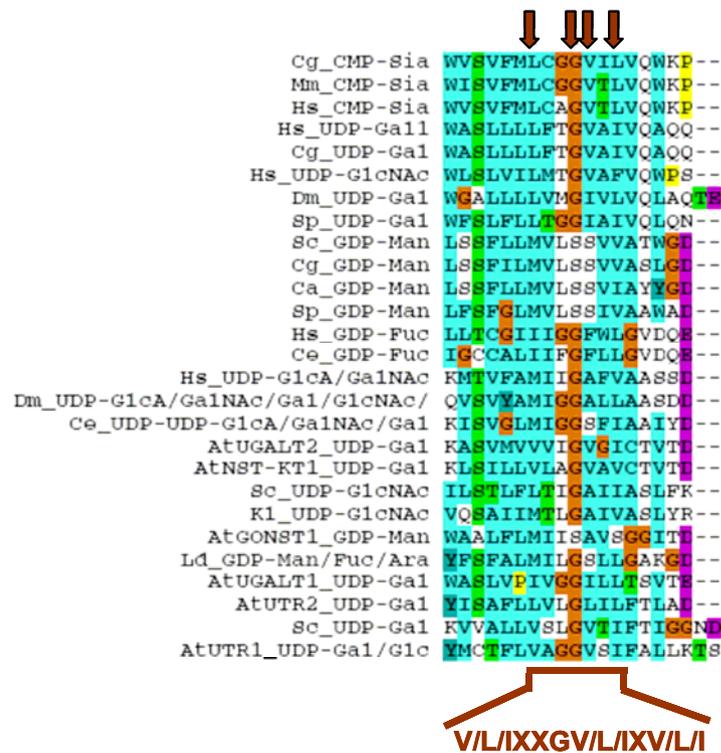


Abb. 51: Ausschnitt eines Aminosäuresequenzvergleichs von Transportern, die verschiedene Nukleotidzucker transportieren. Das vorgeschlagene Consensus-Motiv aus unpolaren Aminosäuren in der 5. Transmembrandomäne ist rot hervorgehoben sowie die Lage der Aminosäuren mit Pfeilen gekennzeichnet.

Zunächst ist feststellbar, dass die Transporter für die GDP-Zucker Mannose und Fucose sich deutlich unterscheidende Sequenzen in dem ausgewählten Bereich aufweisen. Für UDP-N-Acetylglucosamin-, UDP-N-Acetylgalactosamin- und multispezifische Transporter sind ähnliche, doch nicht vollständig gleiche Sequenzmotive erkennbar. Überraschenderweise stimmt das Sequenzmotiv für CMP-Sialylsäure-Transporter genau mit dem in UDP-Galactose-Transportern gefundenen überein. Damit kann zu diesem Zeitpunkt kein für UDP-Galactose-Transporter spezifisches Consensus-Motiv angegeben werden. Bisher gelang nur im Fall von GDP-Mannose-Transportern die Identifizierung eines charakteristischen Motivs nahe des C-Terminus` an der Schnittstelle zwischen dem 4. cytosolischen Loop und der vorletzten Transmembrandomäne (Gao *et al.*, 2001). Dieses

sogenannte GALNK-Motiv ist essentiell für die Transportaktivität und hat keinerlei Einfluss auf Proteinstabilität, intrazelluläre Lokalisation oder Oligomerisation des Transporters (Gao *et al.*, 2001). Vor dem Hintergrund, dass für alle anderen Nukleotidzucker-Transporter bisher keine solche Consensus-Sequenzen gefunden werden konnten, lässt sich in Übereinstimmung mit Caffaro & Hirschberg (2006) schließen, dass die Substratspezifität nicht aus der Primärsequenz abgeleitet werden kann.

Auf Grundlage von phylogenetischen Stammbäumen kann die Bildung von Unterfamilien eher den einzelnen Organismengruppen zugrunde liegen, als ihre Substratspezifität anzeigen. In diesem Zusammenhang wurden die Beispiele der menschlichen CMP-Sialylsäure- und UDP-Galactose-Transporter diskutiert (Gerardy-Schahn *et al.*, 2001). Diese transportieren völlig strukturverschiedene Nukleotidzucker, verfügen aber über 43% Sequenzhomologie und bildeten in Stammbäumen eine Unterfamilie. Inzwischen sind weitere Sequenzen von CMP-Sialylsäure- und UDP-Galactose-Transportern bekannt. Ein Sequenzvergleich aller sicher nachgewiesenen Nukleotidzuckertransporter ergab eine Gruppierung, die in Abb. 52 dargestellt ist und einen klaren Trend hin zur Bildung von Unterfamilien basierend auf der Substratspezifität sichtbar macht. Die humanen Transporter für CMP-Sialylsäure und UDP-Galactose gehören zwar immer noch zur gleichen Unterfamilie, doch gruppieren beide Arten von Transportern deutlich mit Transportern gleicher Substratspezifität. GDP-Fucose- und Mannose-Transporter bilden ebenfalls eindeutig abgegrenzte Gruppen. Gleiches trifft auf die multispezifischen Transporter zu, während für UDP-Gal-Transporter die Aufteilung in verschiedene Unterfamilien beobachtet werden kann. Hier fällt besonders eine Aufspaltung der pflanzlichen UDP-Galactose-Transporter in zwei Familien auf. Eine Familie besteht ausschließlich aus pflanzlichen Transportern, die sich alle von den plastidären Phosphattranslokatoren ableiten, während die zweite Familie neben den pflanzlichen Proteinen auch Hefetransporter beinhaltet und insgesamt der tierischen UDP-Gal-Transporter-Unterfamilie näher steht. Die UDP-N-Acetylglucosamin-Transporter lassen sich allerdings nicht eindeutig zuordnen.

Die Identifizierung weiterer Transporter und die noch ausstehende Aufklärung der Struktur von Transportern für unterschiedliche Substrate kann allerdings in der Zukunft zur Definition determinierender Bereiche führen.

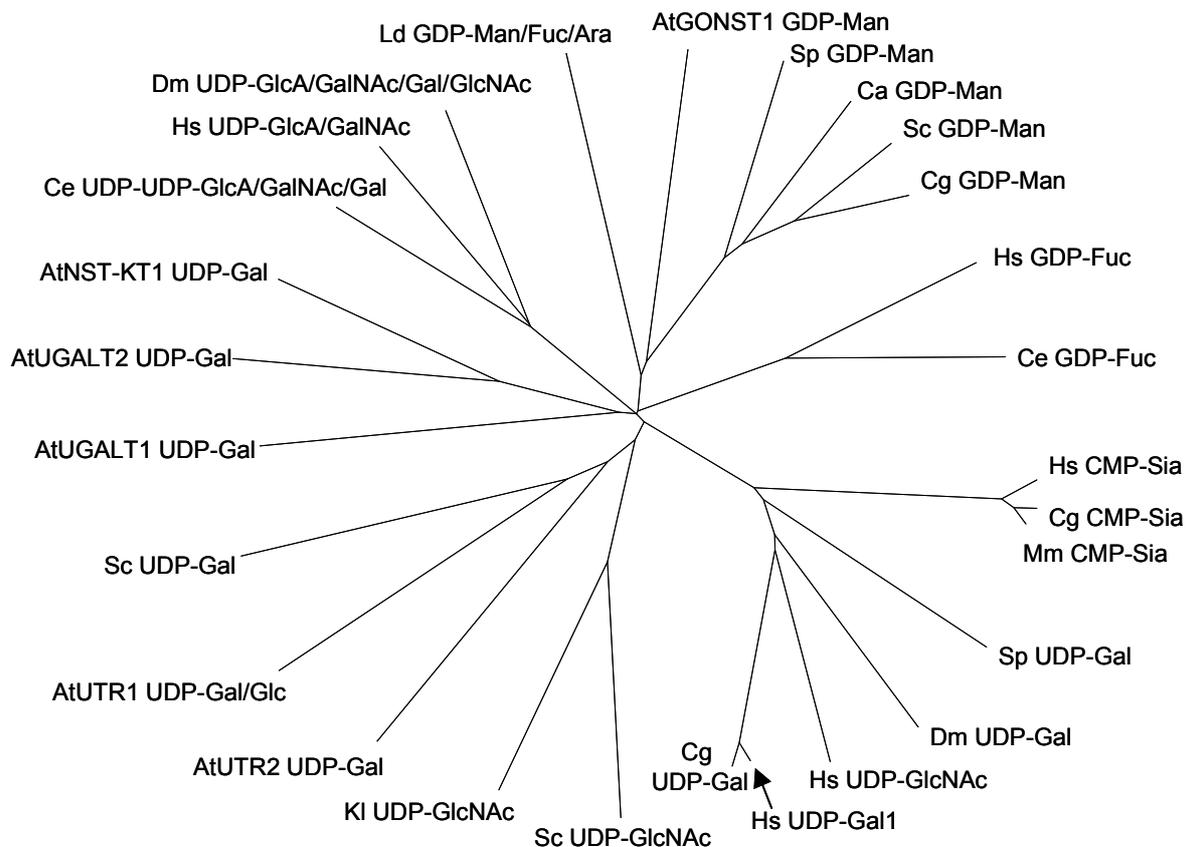


Abb. 52: Phylogenetischer Stammbaum von Nukleotidzucker-Transportern. Primärsequenzen von funktionell charakterisierten Nukleotidzuckertransportern wurden mit Hilfe des Programms ClustalX verglichen und das Ergebnis durch das Programm TreeView veranschaulicht. Hs: *Homo sapiens*; Cg: *Cricetulus griseus*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Sp: *Schizosaccharomyces pombe*; Mm: *Mus musculus*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Ca: *Candida albicans*; At: *Arabidopsis thaliana*; Ld: *Leishmania donovani*; Kl: *Kluyveromyces lactis*

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass aufgrund von Sequenzinformationen bisher keine Vorhersage der Funktion der anderen Transporter der KT-Familie möglich ist. In jedem Fall bedarf es eines funktionellen Nachweises der vermuteten Transportaktivität.

Die Mitglieder der KT-Familie AtKT2 und AtKT3 weisen keine Transportaktivitäten für UDP-Glucose, UDP-Galactose, UDP-Glucuronsäure, UDP-Galacturonsäure, UDP-N-Acetylglucosamin, UDP-Arabinose, UDP-Xylose, GDP-Mannose und GDP-Fucose auf.

Trotz intensiver Bemühungen, einen funktionellen Nachweis für AtKT2 und -3 zu erbringen, konnte mittels des neu etablierten Transportassays keine Transportaktivität für einen der getesteten Nukleotidzucker gemessen werden. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Transportmethode für diese beiden Proteine nicht funktionsfähig und somit nicht anwendbar war. Dies könnte beispielsweise in der Art und Weise der Herstellung der Liposomen begründet sein. So ging die Aktivität des im ER lokalisierten ATP-Transporters nach Rekonstitution in Liposomen über die *freeze-thaw*-Methode nach Kasahara & Hinkle (1977) verloren, während diese nach Herstellung der Liposomen mit Hilfe der Verdünnungsmethode erhalten blieb und charakterisiert werden konnte (Guillen & Hirschberg, 1995). Eine besondere Rolle bei Transportversuchen mit Liposomen spielt weiterhin die Wahl der Lipidzusammensetzung. Während eine Reihe von Nukleotidzuckertransporter-Aktivitäten problemlos mit Hilfe von Liposomen aus Phosphatidylcholin gemessen werden konnten (Hirschberg, Robbins & Abeijon, 1998), ließ sich die UDP-Xylose-Aktivität in Säugergewebe ausschließlich unter Einsatz von Liposomen aus endogenen Golgi-Lipiden bestimmen (Milla *et al.*, 1992). Da bis heute trotz der postulierten physiologischen Notwendigkeit kein Transporter für UDP-Xylose isoliert und charakterisiert werden konnte, liegt der Schluss nahe, dass es neben den robusten Nukleotidzuckertransportern, wie UDP-Gal- oder GDP-Man-Carriern, auch Transporter geben könnte, die empfindlicher auf veränderte Bedingungen, zum Beispiel die Art der Lipidumgebung, reagieren.

In Pflanzen bestehen Golgi-Membranen aus nur etwa 35% Phosphatidylcholin und enthalten einen besonders hohen Anteil an Glycosylceramiden (Brown & DuPont, 1989). Denkbar wäre also, dass die Bestimmung der Transportaktivitäten von AtKT2 und -3 aufgrund einer nicht optimalen Liposomenherstellung und/oder -zusammensetzung nicht gelingen konnte. Weiterhin könnte in der fehlenden Funktionalität der Proteine selbst die Ursache liegen. Die heterologe Expression in Hefe einschließlich eines C-terminalen Tags ist für fast alle funktionell charakterisierten Nukleotidzuckertransporter als völlig problemlos beschrieben (Sun-Wada *et al.*, 1998; Bakker *et al.*, 2005; Norambuena *et al.*, 2005; Segawa *et al.*, 2005), so dass ein Funktionsverlust sehr wahrscheinlich nicht auf der Ebene der Expression erfolgt. Eventuell geht aber die Aktivität im Laufe der Solubilisierung mit einem zu aggressiven Detergenz verloren. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden Triton-X100 und β -Dodecylmaltosid verwendet, zwei nicht-ionische Detergenzien, die

eigentlich zu einer schonenden Solubilisierung führen sollten (Kalipatnapu & Chattopadhyay, 2005). Für AtKT1 und alle plastidären Phosphattranslokatoren ging die Verwendung dieser Detergenzien mit der Erhaltung ihrer Funktionalität einher (Loddenkötter *et al.*, 1993; Kammerer *et al.*, 1998; Eicks *et al.*, 2002). Nichtsdestotrotz kann ein Verlust derselben im Stadium der Rekonstitution nicht ausgeschlossen werden.

Als eher unwahrscheinlich kann dagegen das Fehlen von für den Transport essentiellen zusätzlichen Cofaktoren und/oder Interaktionspartnern gelten. In einer Reihe von Versuchen testeten Segawa und Mitarbeiter den Einfluss von Kationen wie Mg^{2+} und Mn^{2+} auf die Transportaktivität des GDP-Man-Transporters LPG2, stellten jedoch fest, dass nur die nachgeschalteten Glycosyltransferasen dieser Cofaktoren bedürfen, nicht jedoch LPG2 (Segawa *et al.*, 2005). Da ganz generell die mittels Liposomensystem gemessenen Transporteigenschaften von Nukleotidzucker-Transportern wie die Temperaturabhängigkeit, die Sättigbarkeit, die Substratspezifität und die kinetischen Parameter mit denen durch das Microsomen-System ermittelten gut übereinstimmen, geht man davon aus, dass keine Interaktionspartner am Transportprozess beteiligt sind (Caffaro & Hirschberg, 2006).

Nukleotidzuckertransporter operieren als Dimere, für LPG2 ist sogar die Bildung von Hexameren gezeigt worden (Hong *et al.*, 2000). Da der C-Terminus als essentiell für die Oligomerisierung gilt (Gao & Dean, 2000), wäre denkbar, dass ein C-terminaler Tag mit der Dimerisierung interferiert und somit einen Aktivitätsverlust bewirkt. Ein solches Szenario kann für die Transporter VRG4 aus *S. cerevisiae* (Gao *et al.*, 2001), LPG2 aus *L. donovani* (Segawa *et al.*, 2005) und AtUTR2 aus *A. thaliana* (Norambuena *et al.*, 2005) als nicht zutreffend beschrieben werden, denn diese Transporter weisen trotz C-terminaler myc- bzw. His-Tags unveränderte Transportraten auf.

Neben den oben genannten Ursachen für die fehlenden Transportaktivitäten von AtKT2 und -3, die alle davon ausgehen, dass die Proteine nicht funktionell rekonstituiert werden konnten, besteht auch die Möglichkeit, dass die Funktionalität der Proteine erhalten blieb, ihnen jedoch noch nicht das richtige Substrat angeboten wurde. Betrachtet man nun alle im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Informationen, insbesondere bezüglich der Homologien und der Lokalisation von AtKT2 und -3, erscheint es dennoch sehr wahrscheinlich, dass Nukleotidzucker die transportierten Substrate darstellen. In diesem Zusammenhang ist die fehlende Transportaktivität

von AtUDP-GalT2 zu nennen, der als schon charakterisierter UDP-Gal-Transporter als Positivkontrolle mitgeführt wurde. Unter den hier verwendeten Bedingungen konnte im *in vitro*-Transportsystem aber keine Aktivität detektiert werden. Gleiches trifft auch auf UDP-GalT1 und eine Reihe von KVAG-Proteinen zu, für die in unserer Arbeitsgruppe trotz intensiver Bemühungen keine Nukleotidzuckertransport-Aktivität nachweisbar war (Santaella, 2006). Die Gründe hierfür sind ebenfalls unbekannt, könnten aber denen für die nicht messbare Transportaktivität von AtKT2 und -3 entsprechen.

Weitergehende Experimente zur Verifizierung der vermuteten Nukleotidzuckertransport-Funktion von AtKT2 und -3 könnten die Komplementation von Nukleotidzuckertransport-defizienten Mutanten bzw. Mutantenzelllinien beinhalten. So wurden viele bisher aus *A. thaliana* charakterisierten Nukleotidzuckertransporter mit Hilfe solcher *expression cloning*-Ansätze identifiziert. Für die Golgi-lokalisierte GDP-Mannose-Transporter-Familie AtGONST lieferten Komplementationsexperimente mit der *S. cerevisiae* Mutante *vrg4* die ersten Hinweise auf die Art der Transportaktivität (Baldwin *et al.*, 2001; Handford *et al.*, 2004). Durch Komplementation der Säuger-Zelllinien CHO Lec8 und MCDK-RCA^R erhielt man erste Informationen zum transportierten Nukleotidzucker UDP-Galactose von AtUDP-GalT1 und -2 (Bakker *et al.*, 2005) sowie von AtUTR1 (Norambuena *et al.*, 2002). Für AtKT2 und -3 wäre ein derartiger Komplementationsansatz vielversprechend, da eventuelle Schwierigkeiten mit dem *in vitro*-Transportsystem umgangen werden können. Zudem stehen für die meisten Nukleotidzuckertransport-Aktivitäten Mutanten zur Verfügung, die einen morphologisch auffälligen Phänotyp aufweisen (Hirschberg, Robbins & Abeijon, 1998). Dabei lässt sich eine ganze Bandbreite an Phänotypen beobachten, die von einer leicht veränderten Zellform im Fall der *S. pombe* UDP-Gal-Transporter-Mutante *gms1* (Tanaka *et al.*, 2001) bis hin zur Lebensunfähigkeit von Organismen reicht, wie sie für einige Mutantenallele der *S. cerevisiae* *vrg4*-Mutante beschrieben wurde (Gao *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zu Hefen und auch *C. elegans*, in denen die Bedeutung von Glycosylierungen sich in zum Teil drastischen Phänotypen von Nukleotidtransportermutanten ausdrückt (Berninsone *et al.*, 2001; Gerardy-Schahn *et al.*, 2001), konnte für Pflanzen trotz der Kenntnis einiger Nukleotidzucker-Transporter bisher kein Phänotyp einer Mutante beschrieben werden (Handford *et al.*, 2005; Norambuena *et al.*, 2005; Bakker *et al.*, 2005).

Die T-DNA-Insertionen in *KT*-Gene führen zu keinem veränderten Phänotyp im Vergleich zu Wildtyppflanzen.

Auch die T-DNA-Insertionsmutantenlinien, in denen ein Ausfall der jeweiligen *KT*-Gene zweifelsfrei nachgewiesen wurde, weisen keinen morphologisch auffälligen Phänotyp auf. Nachdem die Funktion von AtKT1 als UDP-Gal-Transporter identifiziert werden konnte, erfolgte speziell für die korrespondierende *Knock out*-Linie eine Analyse der Zellwandbestandteile. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Zusammensetzung derselben im Vergleich zu Wildtyppflanzen nachgewiesen werden. Offenbar sind Pflanzen der *Knock out*-Linie in der Lage, die fehlende UDP-Gal-Transportkapazität wieder auszugleichen, was auf einen hohen Grad an Redundanz schließen lässt. Gleiches trifft auch für eine Reihe von AtCESA-Genen zu, die als *cellulose synthase catalytic subunits* eine wichtige Rolle bei der Zellulose-Synthese und somit dem Zellwandaufbau spielen, zu dem wiederum ein wesentlicher Teil der in den Golgi-Apparat transportierten UDP-Galactose-Einheiten herangezogen wird. So zeigte überraschenderweise keine der T-DNA-Insertionsmutantenlinien von *CESA2*, 5, 9 und 10 einen sichtbaren Phänotyp, eine Reduktion des Zellulosegehaltes oder Änderungen der Zellwandzusammensetzung, was ebenfalls durch eine Redundanz der einzelnen Gene erklärt wird (Scheible & Pauly, 2004).

Dies gilt jedoch nicht für alle am Nukleotidzuckerstoffwechsel beteiligten Komponenten in *A. thaliana*. So konnten für eine Mutante, die in der UDP-Glucose-4-Epimerase (*UGE4*) defizient ist, die die reversible Umwandlung von UDP-Glucose in UDP-Galactose katalysiert, morphologische Auffälligkeiten beobachtet werden (Seifert *et al.*, 2004). Die *UGE4-Knock out*-Mutante zeigte einen Wurzelhaardefizienten Phänotyp, der mit einer charakteristischen Zusammenballung von Wurzelepidermiszellen einhergeht. Daher wird diese Mutante auch als *rhd1* für *root hair deficient* bezeichnet. Als Ursache dieser morphologischen Veränderungen konnte eine Reduktion des Zellwand-Galactose-Gehaltes um 24% im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden. Insbesondere die Hemicellulose Xyloglucan und Arabinogalactan TypII erwiesen sich als untergalactosyliert, während sich das Galactolipidprofil unverändert zeigte (Seifert *et al.*, 2002). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden Pflanzen der *Knock out*-Linie von AtKT1 auf einen solchen Wurzelphänotyp hin untersucht. Es konnten jedoch keine morphologischen

Auffälligkeiten der Wurzeln dieser Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen beobachtet werden.

Auch *downstream* der Transportaktivität von Golgi-lokalisierten Nukleotidzuckertransportern sind Mutanten, die einen Phänotyp aufweisen, bekannt. Die *A. thaliana*-Galactosyltransferase MUR3 wirkt an der Synthese der Hemicellulose Xyloglucan mit. Diese besteht aus einem Glucose-Rückgrat, an das Xylosylreste angehängt sind, welche wiederum spezifisch mit Galactosyl- und Fucosylresten verknüpft sind. Fehlt MUR3, so können ganze Fucosylgalactosyl-Seitenketten nicht angehängt werden, was eine signifikante Reduktion der Reißfestigkeit der Zellwand zur Folge hat (Scheible & Pauly, 2004). Die *mur3*-Pflanzen sind dabei äußerlich nicht vom Wildtyp zu unterscheiden und auch die Zug- und Reißfestigkeit des Sprosses ist mit der des Wildtyps vergleichbar. Dies kann damit erklärt werden, dass die Galactosylreste durch eine weitere Galactosyltransferase an anderer Stelle des Xyloglucangerüsts angeknüpft werden, so dass eine teilweise Kompensation erfolgt. Im Hypocotyl etiolierter Keimlinge ist diese Kompensationsmöglichkeit aufgrund der fehlenden zusätzlichen Galactosyltransferase-Aktivität allerdings nicht gegeben. Eine detaillierte Untersuchung solcher Keimlinge ergab daher eine sichtbare Verbreiterung der Hypocotylbasis und einen Verlust der Zug- und Reißfestigkeit des Hypocotyls um 60% im Vergleich zum Wildtyp (Pena *et al.*, 2004).

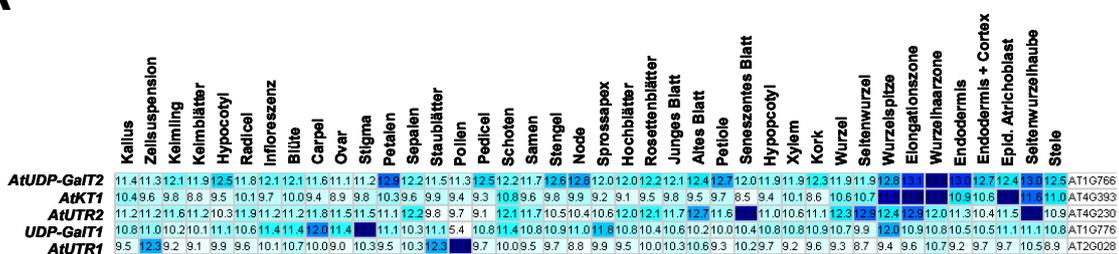
Dieses Beispiel zeigt, dass sich der Effekt einer Mutation bzw. eines Genausfalls auch nur in sehr speziellen Zelltypen zeigen kann und dass es unter Umständen besonderer Methoden bedarf, diese Veränderungen zu entdecken.

Für zukünftige Untersuchungen an den *AtKT*-Mutanten könnten deshalb unterschiedliche Techniken zur Charakterisierung der Zellwandeigenschaften wie die *Fourier-transformed Infrared Spectroscopy* (FTIR)-Technik oder sogenannte *Glycan-Arrays* genutzt werden, um mit Polysaccharid-spezifischen Antikörpern Veränderungen in den Polysaccharidgehalten der Zellwand mit hoher Sensitivität zu detektieren (Scheible & Pauly, 2004). Dabei sollten die Zelltypen und Gewebe besondere Beachtung finden, in denen das betreffende Gen seine Expressionsmaxima aufweist.

Das *AtKT1*-Gen wird ubiquitär und besonders stark in den Geweben der Wurzel exprimiert, während die Gene für *AtKT2* und *-3* hauptsächlich in Staubblättern, Pollen und Schoten bzw. in Pollen und Wurzeln transkribiert werden.

Da als Hauptort der Expression für den UDP-Gal-Transporter *AtKT1* die Wurzel identifiziert wurde, dort aber keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt wurden, könnte der Funktionsverlust durch einen anderen UDP-Gal-Transporter kompensiert werden. In *A. thaliana* wurden bisher die Transporter *AtUTR1* und *-2* (Norambuena *et al.*, 2002, 2005) sowie *AtUDP-GalT1* und *-2* (Bakker *et al.*, 2005) als für UDP-Galactose spezifisch beschrieben. Eine gegenüberstellende Analyse der Expressionsprofile dieser Gene unter Zuhilfenahme von *Microarray*-Daten ergab, dass insbesondere die Expressionsmuster von *AtUDP-GalT2*, *AtKT1* und *AtUTR2* in den Geweben der Wurzel stark überlappen (Abb. 53A). Auch in der zeitlichen Abfolge der Entwicklung wurden zumindest *AtKT1* und *AtUDP-GalT2* als sehr vergleichbar und fortwährend hoch exprimiert identifiziert (Abb. 53B). Dieser Befund kann durch die Ergebnisse der RT-PCR- und Promotor::GUS-Fusions-Experimente bestätigt werden, die aufgrund der Zugehörigkeit zur KT-Familie neben *AtKT1* auch für *UDP-GalT2* durchgeführt wurden (3.1.3. und 3.1.4.). Beide Gene werden demnach ubiquitär, doch besonders stark in der Wurzel exprimiert, wobei *UDP-GalT2* allgemein über ein wesentlich höheres Expressionslevel verfügt, da in der RT-PCR weniger Zyklen zum Erreichen der gleichen Bandenstärke benötigt wurden und die GUS-Färbung der behandelten Gewebe wesentlich schneller eintrat.

A



B

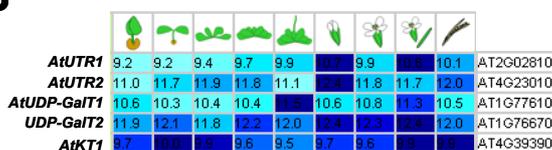


Abb. 53: Expression von UDP-Galactose-Transporter kodierenden Genen als Ergebnis von *Microarray*-Experimenten, die in der öffentlich zugänglichen Datenbank GENEVESTIGATOR zusammengefasst sind. Es wurde die Funktion *Meta-Analyzer* Unterpunkte *Plant Organs (A)* und *Developmental Stages (B)* verwendet. Die Expressionsstärke wird in Blauabstufungen von hell = schwach exprimiert bis dunkel = stark exprimiert dargestellt. Die in den Zellen stehenden Zahlen geben die Signalintensität n als $\log_2(n)$ an.

AtUTR2 und AtUDP-GalT2 könnten also die Funktion von AtKT1 nach dessen Ausfall übernehmen. Da im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine T-DNA-Insertionsmutantenlinie für AtUDP-GalT2 isoliert werden konnte, erscheint eine Kreuzung der beiden *Knock out*-Linien und eine nachfolgende Analyse besonders der Wurzeln vielversprechend. Die Herstellung einer solchen Doppelmutante wurde bereits begonnen und befindet sich im Stadium der Isolierung homozygoter Doppelmutanten.

Alle weiteren charakterisierten UDP-Gal-Transporter-Gene aus *A. thaliana* weisen Expressionsmaxima in anderen Organen bzw. Geweben auf. So wird das *UDP-GalT1*-Gen auffallend stark im Stigma exprimiert, während für das *AtUTR1*-Gen der Pollen als Ort maximaler Expression erkannt werden kann. Das *AtKT2* kodierende Gen wird ebenfalls vornehmlich in Staubblättern und Pollen sowie in Schoten und Samen exprimiert. Im Fall des *AtKT3*-Gens gibt es widersprüchliche Ergebnisse der einzelnen Methoden zur Feststellung der Expressionsorte; die *Microarray*-Datenbank zeigt die Wurzel als Hauptexpressionsort an, die RT-PCR zusätzlich das Hochblatt und im GUS-Assay erscheinen schließlich Wurzel und Pollen deutlich blau gefärbt. Derartige Diskrepanzen sind nicht unüblich und wurden auch für die GONST-Familie festgestellt (Handford *et al.*, 2004). Als Gemeinsamkeit aller Methoden können Wurzel und Pollen als *AtKT3* stark exprimierende Gewebe festgehalten werden. Generell scheint der Pollen ein Gewebe starker Nukleotidzuckertransport-Aktivität zu sein, denn neben den oben genannten Transportern wird laut *Microarray*-Datenbank eine ganze Reihe von pPT-homologen Genen spezifisch in Pollen exprimiert (3.1.1.; Santaella, 2006). Darunter befinden sich sowohl Mitglieder aus der KT- als auch der KVAG- und KD-Familie.

Hinsichtlich der Expressionsorte scheint es also zwischen den Familien keine Abgrenzungen zu geben und auch in funktioneller Hinsicht bestehen diese nachgewiesenermaßen nicht. Für AtUDP-GalT1 als Mitglied der KVAG-Familie und AtUDP-GalT2 sowie AtKT1 als Mitglieder der KT-Familie konnte familienübergreifend mit UDP-Galactose dasselbe Substrat identifiziert werden. Somit sagt die

vorgenommene Gruppierung anhand der Dipeptidfolge KT, K/V/A/G und KD nichts über die Substratspezifität der Mitglieder der einzelnen Familien aus. Eine weitergehende funktionelle Charakterisierung der pPT-homologen-Proteine sollte somit in ihrer Gesamtheit und nicht getrennt nach Familienzugehörigkeit erfolgen. Als Ausgangspunkt hierfür erscheint die Analyse von Mehrfach-*Knock out*-Mutanten für Gene sinnvoll, die ihre Expressionsmaxima in denselben Organen, wie zum Beispiel dem Pollen, aufweisen. In diesem Zusammenhang von großer Bedeutung ist ebenfalls die subzelluläre Lokalisation der Proteine, da das AtUTR1-Gen zwar in Pollen hoch exprimiert wird, aber entgegen ersten Vermutungen nicht im Golgi-Apparat, sondern im ER lokalisiert ist (Reyes *et al.*, 2006).

Die UDP-Gal-Transporter AtNST-KT1 und UDP-GalT2 sowie die putativen Nukleotidzucker-Transporter AtKT2 und -3 sind im trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert.

Eine Lokalisation im Golgi-Apparat konnte bisher in *A. thaliana* auch für die Mitglieder der GONST-Familie und AtUTR2 mittels cDNA::GFP-Fusion und transienter Expression in Pflanzenzellen direkt nachgewiesen werden (Baldwin *et al.*, 2001; Handford *et al.*, 2004; Norambuena *et al.*, 2005). Wie für die KT-Proteine ergab sich ein charakteristisches Punktmuster aus hochbeweglichen, etwa 1 μm großen Organellen, die nach Einwirkung von Brefeldin A aggregierten. Ein solches Muster wird als charakteristisch für das trans-Golgi-Netzwerk angesehen, in dem zum einen die Sortierung und zum anderen die Modifizierung von Proteinen, Lipiden und Polysacchariden stattfindet (Neumann *et al.*, 2003). Letztere werden auch im Golgi-Apparat synthetisiert, eine Funktion, die für Pflanzen von besonderer Bedeutung ist, da ihre Zellwände aus komplexen Polysacchariden aufgebaut sind. Der Hauptbestandteil der Zellwand, die Zellulose, wird an der Plasmamembran synthetisiert. Die Herstellung aller anderen Matrix-Polysaccharide wie Hemicellulosen und Pectine erfolgt jedoch im Golgi-Apparat (Scheible & Pauly, 2004). Hier wird zunächst das Zucker-Rückgrat der Polysaccharide synthetisiert, wofür sogenannte Glycan-Synthasen verantwortlich sind. Diese sind in der Golgi-Membran verankert, ihre Topologie ist jedoch noch ungeklärt. Es werden zwei Szenarien diskutiert. Das erste geht davon aus, dass das katalytische Zentrum ins Cytosol weist, was eine direkte Bindung von Nukleotidzuckern erlaubt, die dann vom Enzym selbst ins

Golgi-Lumen verlagert werden. Das zweite Szenario gründet sich auf die Annahme, dass das katalytische Zentrum sich im Golgi-Lumen befindet und die dort befindlichen Nukleotidzucker als Substrate nutzt (Lerouxel *et al.*, 2006). Daraufhin erfolgt die Anheftung von komplexen Seitenketten an das Rückgrat, die durch Glycosyltransferasen unter Verwendung von Nukleotidzuckern aus dem Golgi-Lumen ausgeführt wird. Diese Glycosyltransferasen durchspannen die Golgi-Membran nur einmal und ihr katalytisches Zentrum weist in das Golgi-Lumen (Keegstra & Raikhel, 2001). In jedem Fall besteht im Golgi-Lumen ein großer Bedarf an Nukleotidzuckern, welcher zusätzlich durch Modifikationen von Proteinen und Lipiden erhöht wird. Die Synthese von Nukleotidzuckern erfolgt jedoch hauptsächlich im Cytosol, was die Funktion Golgi-lokalisierter Nukleotidzucker-Transporter insbesondere für Pflanzen notwendig und essentiell macht. In jüngerer Vergangenheit wird darüber hinaus die Bildung funktioneller Komplexe zwischen Nukleotidzuckertransportern und Glycosyltransferasen postuliert (Seifert, 2004). Mit dem Nachweis einer solchen Interaktion zwischen dem menschlichen UDP-Galactose-Transporter und einer Galactosyltransferase (Sprong *et al.*, 2003) liegen Hinweise zur Bestätigung dieser Hypothese vor. Für Pflanzen ist eine solche Interaktion jedoch noch nicht direkt nachgewiesen worden.

Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Golgi-lokaliserten UDP-Galactose-Transporters AtNST-KT1 ist eine weitere Komponente des komplexen pflanzlichen Stoffwechselweges der Nukleotidzucker identifiziert worden, die zur Klärung noch offener Fragen beitragen kann.

5.2. Funktionelle Charakterisierung der *Bile Acid* Transporter-Familie in *Arabidopsis thaliana*

Im Genom von *A. thaliana* sind fünf Gene kodiert, deren Produkte Ähnlichkeiten zu Gallensäuretransportern aufweisen.

Die Natrium-Gallensäure-Cotransporter-Familie umfasst weit über 50 Mitglieder aus nahezu allen Organismenreichen (Hagenbuch & Dawson, 2004; siehe auch Einleitung). Während eine Reihe von Transportern aus Säugern gut charakterisiert wurde (Hagenbuch & Meyer, 1994; Wong *et al.*, 1994; Geyer *et al.*, 2004), liegen über die Funktion dieser Proteine in Bakterien und insbesondere Pflanzen nur wenige Informationen vor. Das erste pflanzliche Protein wurde mit OsSbf1 im Rahmen einer Suche nach Hypoxie-induzierten Genen in Reis gefunden (Rzewuski *et al.*, 2002). Da sowohl Ethylen als auch Gibberellin eine Induktion des Gens bewirken und die somit ausgelöste Hypoxie-Antwort zu einem beschleunigten Wachstum mit dem Ziel einer ausreichenden Sauerstoffversorgung führt, wurde eine Funktion des Proteins in der Förderung des Sprosswachstums vermutet. In welcher Art und Weise es in die dabei ablaufenden Prozesse eingebunden ist, wurde nicht geklärt, jedoch aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Gallensäuren mit Steroidderivaten eine Transportfunktion für Brassinosteroide vorgeschlagen. Ein möglicher Transport von Gallensäuren in Pflanzen kann durch die Messung von Gallensäuretransportaktivität an isolierten Vakuolen nicht ausgeschlossen werden (Hörtensteiner *et al.*, 1993), erscheint aber durch den fehlenden Nachweis von Gallensäuren in Pflanzen fraglich. Als Substrate für den Transport von Gallensäuren in die Vakuole wurden die konjugierten Gallensäuren Tauro- und Glycocholat verwendet. Die Transportaktivität war strikt Mg^{2+} - und ATP-abhängig. Ein Charakteristikum für die Transporter der BAT-Familie besteht jedoch darin, dass diese durch den Symport von Na^+ -Ionen entlang eines Gradienten energetisiert werden, also zu den sekundär aktiven Transportern zählen (Trauner & Boyer, 2003). Damit war eine Beteiligung von Transportern der BAT-Familie an dieser Transportaktivität auszuschließen. Weitere Studien zur Aufklärung der Natur dieser Transportaktivität ergaben, dass jene auf den ABC-Transporter MRP2 zurückzuführen ist (Lu *et al.*, 1998). MRP2 wurde als ein typisches Mitglied der ABC-Transporter-Familie mit breitem Substratspektrum charakterisiert, das von

Glutathion-Konjugaten bis hin zu Chlorophyllkataboliten reicht. Ein direkter Transport von Taurocholat konnte jedoch nicht gemessen werden, nur dessen inhibitorische Wirkung auf den Transport oben genannter Substrate.

Das Fehlen von Gallensäuren in Pflanzen wird auch dadurch nahegelegt, dass wichtige Enzyme für deren Synthese fehlen (KEGG-Datenbank: http://www.genome.jp/dbget-bin/get_pathway?org_name=ath&mapno=00120).

Allerdings könnte die *de novo* Biosynthese in *A. thaliana* über andere, noch unbekannte Wege ablaufen. Weiterhin könnten Gallensäuren bzw. ihre Salze aus dem umgebenden Substrat in die Pflanze gelangen. Eine für diese Hypothese sprechende Untersuchung wurde kürzlich von Koga und Mitarbeitern veröffentlicht (Koga *et al.*, 2006). Ausgehend von dem lange bekannten Wissen um die pathogenresistenz-fördernde Wirkung von Tierdung erfolgte in dieser Arbeit die Isolierung eines hierfür verantwortlichen Faktors. Überraschenderweise handelt es sich um Cholat, das bereits in sehr geringen Konzentrationen (20 μ M) Elicitorwirkung ausübt und somit zur Erhöhung der Pathogenresistenz von Reis führt. Wie Cholat von der Pflanze sensiert wird und worauf die Wirkung als Elicitor zurückzuführen ist, bleibt jedoch weiterhin ungeklärt. Die Beteiligung der untersuchten BAT-Proteine am Transport von Gallensäuren in *A. thaliana* erscheint aber vor dem Hintergrund der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse eher unwahrscheinlich.

Während das bakterielle Protein Cgl3042 aus *Corynebacterium glutamicum* durch Komplementationsstudien als Gallensäure-Exporter identifiziert werden konnte, gelang dies für die untersuchten Proteine aus *A. thaliana* nicht.

Die *E. coli*-KAM3-Mutante weist eine Deletion des *acrB*-Gens auf, welches für einen Bestandteil des *Multidrug-Resistance-Efflux-Systems* AcrAB-TolC vom RND (*Resistance Nodulation Division*)-Typ kodiert. Dieser Transporter ist das Hauptentgiftungssystem gramnegativer Bakterien und besteht aus drei Komponenten: einem Transportprotein in der inneren Membran (AcrB) zur Bindung des Substrats und dessen Verlagerung in den periplasmatischen Raum, einem akzessorischen Protein im Periplasma (AcrA), welches das Substrat hin zur äusseren Membran geleitet und schließlich einem Proteinkanal in der äußeren Membran (TolC), durch den das Substrat nach außen befördert wird (Piddock, 2006). Fehlt mit AcrB der Transporter in der inneren Membran, so kann kein Export von Substraten

erfolgen. AcrAB-TolC hat ein sehr breites Substratspektrum, das von Antibiotika wie Chloramphenicol und Tetracyclin über Detergenzien wie SDS und Triton X-100 bis hin zu Gallensalzen wie Tauro- und Glycocholat reicht (Ma *et al.*, 1995; Okusu *et al.*, 1996). Damit bietet ein Komplementationssystem auf Basis dieser Mutante ein großes Potential zur Identifizierung einer ganzen Reihe von Transportaktivitäten. So konnte mit NorM ein neuer Typ von *Multidrug-Efflux-System* in *Vibrio parahaemolyticus* gefunden werden (Morita *et al.*, 1998) und auch die Identifizierung des *A. thaliana*-Norfloxacin-Transportsystems AtDTX1 gelang mit Hilfe der KAM3-Mutante (Li *et al.*, 2002). Letzteres Faktum beweist, dass auch pflanzliche Membranproteine in *E. coli* funktionell exprimiert werden können. In jüngster Vergangenheit konnte auch das erste bakterielle Mitglied der BAT-homologen Proteinfamilie auf diese Weise als tatsächlicher Gallensalzexporter identifiziert und charakterisiert werden: Ctr aus *Bifidobacterium longum* (Price *et al.*, 2006). Diese grampositiven Bakterien sind als Bewohner des Säuger-Intestinaltrakts ständig mit hohen Gallensäurekonzentrationen konfrontiert, was die Existenz von Exportsystemen für diese Substanzen notwendig macht. Sind entsprechende Exporter nicht vorhanden oder funktionsunfähig, können Gallensalze sich aufgrund ihres amphiphilen Charakters in Membranen einlagern und diese zerstören, was mit einem Absinken des internen pH-Wertes bis hin zum völligen Zusammenbruch der *pmf* und anderer Ionengradienten einher geht (Kurdi *et al.*, 2006). Da viele Bakterien intestinal vorkommen, sind zwar bereits einige bakterielle Gallensäuretransportsysteme wie CmeABC aus *Campylobacter jejuni* oder AcrAB-TolC aus *Salmonella enterica* bekannt, diese gehören jedoch alle dem beschriebenen RND-Typ von *Multi-Efflux-Systemen* an (Piddock, 2006). Mit Ctr wurde ein neuer Typ von *Multidrug-Transporter* aus *Bifidobacterium longum* charakterisiert, der neben Gallensalzen auch strukturell nicht verwandte antimikrobielle Substanzen wie Tetracyclin und Ethidiumbromid exportieren kann. Als Ergebnis der KAM3-Komplementationsversuche innerhalb dieser Arbeit konnte mit Cgl3042 aus *C. glutamicum* ein weiterer bakterieller Gallensalz-Exporter vom BAT-Typ identifiziert werden. *C. glutamicum* ist zwar ein bodenbürtiges grampositives Bakterium, doch auch in diesem Lebensraum kann es zur Konfrontation mit Gallensalzen kommen. Ein Wachstumstest der Cgl3042 *Knock-out*-Mutante ergab eine deutliche Reduktion der Teilungsrate in Anwesenheit von Gallensalzen im Vergleich zum Wildtyp, was auf den Verlust der Exportfähigkeit

hindeutet. Weitergehende Versuche werden zeigen, ob analog zu Ctr auch andere Substanzen wie die Antibiotika Chloramphenicol und Tetracyclin zu den Substraten von Cgl3042 zählen. In Anbetracht der Verwandtschaft von *Corynebacterien* und hochgradig pathogenen *Mycobacterien* könnte sich hier ein neues Feld zur Entwicklung von neuen Antibiotika erschließen.

Für die Gene, die pflanzliche BAT-Proteine kodieren, konnte keine Komplementation festgestellt werden, jedoch fehlt der Nachweis ihrer Expression in *E. coli*. Zwar ist die Expression von pflanzlichen Genen in Bakterien wie am Beispiel von AtDTX1 gezeigt prinzipiell möglich, doch sollten weitere Untersuchungen der AtBAT-Proteine unbedingt den Nachweis der Expression mit Hilfe von Antikörpern beinhalten. Anschließend wären dann weitere umfangreichere Tests sinnvoll.

Innerhalb dieser Arbeit wurde auf der Grundlage einer vergleichenden Expressionsanalyse weitergehend die mögliche Funktionen der BAT-Proteine in *A. thaliana* als Transporter für Vorstufen von aliphatischen Glucosinolaten untersucht.

Alle BAT-Protein kodierenden Gene werden in *A. thaliana* zeitlich und räumlich mehr oder weniger stark ubiquitär exprimiert.

Die einzelnen Mitglieder besitzen unterschiedliche Expressionsmaxima in den einzelnen Organen, wobei immer eine Überlappung von mindestens zwei exprimierten Genen der Familie je Organ festgestellt werden kann. Generell lieferten die verschiedenen Methoden bzw. Quellen der Expressionsdaten für fast alle BAT-Gene ähnliche und zum Teil redundante Informationen - mit Ausnahme des Gens *AtBAT4* (At4g22840). Dieses Gen sollte laut *Microarray*-Datenbank (Genevestigator) besonders stark in Wurzeln, Blättern und Staubblättern der Blüte exprimiert werden. Die mittels RT-PCR erhaltenen Daten entsprechen diesem Muster, doch das Promotor::GUS-Fusionskonstrukt ließ *in planta* ein völlig anderes Profil erkennen, das eine nur schwache Expression in Blättern und Wurzeln, keinesfalls jedoch in Blüten oder anderen Organen aufweist. Derartig gegensätzliche Ergebnisse können ganz verschiedene Ursachen haben. Für *Microarray*-Daten ist beispielsweise der verwendete Algorithmus zu ihrer Auswertung von entscheidender Bedeutung. Neuere Untersuchungen ergaben, dass eine Verwendung von sechs verschiedenen Algorithmen zur Auswertung desselben Datenpools nur eine Überlappung von etwa 30% besitzen, also nur ein Drittel der von allen Algorithmen als differentiell reguliert

betrachteten Gene übereinstimmten (Millenaar *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde eine Reihe von Genen, die mittels *Microarray* als differentiell reguliert identifiziert worden waren, mittels Real Time RT-PCR als unverändert exprimiert ermittelt.

Auch Promotor::GUS-Konstrukte sind kritisch zu beurteilen, da die für die Transkriptionskontrolle verantwortlichen *cis*-aktiven Elemente inzwischen nicht nur in Promotorbereichen, sondern in allen transkribierten Genabschnitten gefunden wurden. Sowohl die 5` und 3`- untranslatierten Bereiche und Introns können regulatorische Elemente enthalten (Fu *et al.*, 1995; Dickey *et al.*, 1992) als auch die gesamte Länge des kodierenden Bereiches wie im Fall des *superman*-Gens (Ito *et al.*, 2003).

Die Auswahl eines zu kurzen Promotorbereichs für *AtBAT4* könnte somit die Ursache für die Diskrepanz zwischen GUS- und *Microarray*-Ergebnissen sein. Die gleichzeitige Herstellung verschieden langer Promotor/Gen::GUS-Konstrukte für dieses Gen und ihr Test im Vergleich zu den *Microarray*- und RT-PCR-Ergebnissen könnte diese Annahme bestätigen und zur Identifizierung von regulatorischen Elementen innerhalb der *AtBAT4*-Sequenz führen.

Aufgrund der ubiquitären Expression aller Mitglieder der *BAT*-Familie in *A. thaliana* ist keine Zuordnung einer spezifischen Funktion in einem speziellen Organ möglich. Eine zusätzlich durchgeführte Coexpressionsanalyse ergab jedoch zumindest für das Homolog *AtBAT5* erste Hinweise auf eine Mitwirkung des kodierten Proteins in einem bestimmten Biosyntheseweg.

***AtBAT5* wird mit Genen coexprimiert, deren Produkte Enzyme und Regulatoren der Biosynthese aliphatischer Glucosinolate in *A. thaliana* sind.**

Besonders auffällig ist, dass die kodierenden Gene für Enzyme der Glucosinolatsynthese (siehe auch Einleitung) und *AtBAT5* im Bereich der Nodien ein einziges Expressionsmaximum aufweisen. Dies stimmt insofern mit den bisher bekannten Fakten überein, als dass die biosynthetische Kapazität anhand von Promotor::GUS-Studien für einige Enzyme als eng assoziiert mit dem Leitgewebe identifiziert wurde (Grubb *et al.*, 2004; Reintanz *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003). Kürzlich konnte auch die *BCAT4*-Expression als auf die Zellen des Phloems begrenzt ermittelt werden (Schuster *et al.*, 2006). Allerdings traf dies neben dem Phloemgewebe im Spross auch auf selbiges in Blättern und Wurzeln zu. Demnach

scheint das Phloem der Ort der biosynthetischen Aktivität zu sein, die zwar in allen Organen der Pflanze vorkommen kann, aber ganz besonders auf den Bereich der Nodien innerhalb des Sprosses konzentriert zu sein scheint. Mit dem innerhalb dieser Arbeit erstellten Promotor::Reportergen-Konstrukt sollte daher eine detailliertere Studie zur genauen Lokalisation der *AtBAT5*-Expression im Spross zur Untermauerung dieser Annahme durchgeführt werden.

Als gesichert kann dagegen der Phloemtransport von Glucosinolaten gelten, der von reifen, bereits ausdifferenzierten Geweben hin zu sich entwickelnden erfolgt (Chen *et al.*, 2001). Die genauen Mechanismen dieses Transports sind jedoch noch unbekannt. Als Orte hoher Glucosinolatkonzentrationen haben sich reproduktive Organe wie Samen, Schoten und sich entwickelnde Blüten erwiesen (Petersen *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2003), wobei innerhalb des Blütenstandes außergewöhnlich hohe Konzentrationen in speziellen S-Zellen (*Sulfur-rich*) erreicht werden, die zwischen Phloem und Endodermis lokalisiert sind (Koroleva *et al.*, 2000). Dies wiederum lässt ein Szenario als wahrscheinlich gelten, in dem die Glucosinolate nach ihrer Synthese in den Phloemzellen zur Lagerung in die benachbarten S-Zellen exportiert werden (Schuster *et al.*, 2006). Da eine Verletzung der Integrität der Zellen die Abwehrmechanismen des Glucosinolat-Myrosinase-Systems auslöst, erscheint eine Induktion der die Biosyntheseenzyme kodierenden Gene durch Verwundung sinnvoll. Für *BCAT4* und *MAM1* konnte eine Induktion durch Verwundung bestätigt werden, wobei im Falle der *BCAT4*-Promotor::GUS-Pflanzen deutlich stärker gefärbte Blattadern nahe den Verwundungsstellen zu beobachten waren (Schuster *et al.*, 2006). Auch für *AtBAT5* lässt sich dieses Phänomen erkennen (Abb. 54A). Weiterhin ist eine Induktion der Genexpression der Biosynthesegene durch Einwirkung von Jasmonat und eine Reprimierung derselben unter Sulfat-limitierenden Bedingungen beschrieben (Mewis *et al.*, 2005; Hirai *et al.*, 2005). Wie in Abb. 54B vergleichend dargestellt, wird auch die Expression von *AtBAT5* unter diesen Bedingungen induziert bzw. reprimiert. Außerdem kann anhand von *Microarray*-Daten eine spezifische negative Regulation der Biosynthesegene und *AtBAT5* durch bestimmte biotische Stressoren, bei Ethylen- oder Chitinzugabe und unter hohen CO₂-Konzentrationen beobachtet werden, während Saccharose als starker Induktor der Genexpression fungiert. Ferner können einige gemeinsame Regulatoren der Genexpression der anderen *AtBAT*-Gene mit denen festgestellt werden, die für die Enzyme der Biosynthese aliphatischer Glucosinolate kodieren. So bewirkt

beispielweise eine Zugabe der Chemikalien Syringolin und Cycloheximid eine Abschaltung bzw. Reduktion der Expression dieser Gene, wohingegen Hitze und Trockenheit allgemein eine Induktion derselben zur Folge haben.

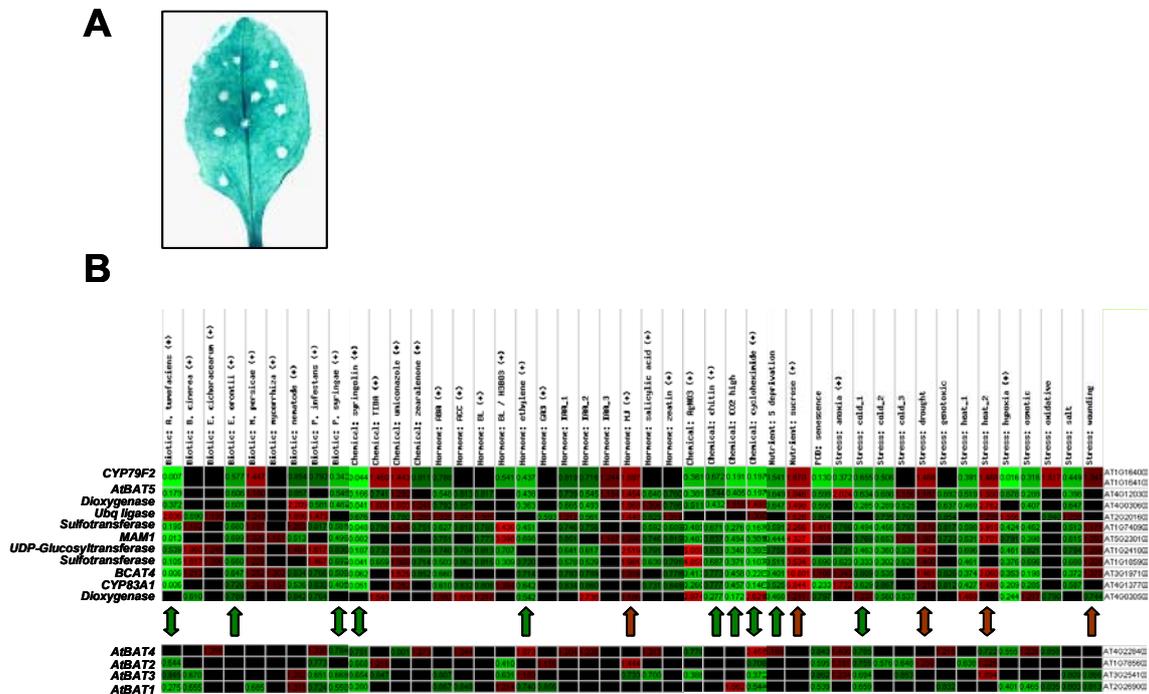


Abb. 54: Expression von *AtBAT5* nach Verwundung in *AtBAT5*-Promotor::*GUS*-exprimierenden Pflanzen (A) und vergleichende Expressionsmuster von *BAT*-Genen mit für Enzyme des Glucosinolatbiosyntheseweges kodierenden Genen als Ergebnis von *Microarray*-Experimenten, die in der öffentlich zugänglichen Datenbank GENEVESTIGATOR zusammengefasst sind (B). Es wurde die Funktion *Meta-Analyzer* Unterpunkt *Stress Response* verwendet. Die Induktionsstärke wird in Rotabstufungen von hell = schwach induziert bis dunkel = stark induziert dargestellt, die Repressionsstärke in entsprechenden Grünabstufungen. Rote Pfeile kennzeichnen gemeinsame Induktoren, grüne gemeinsame Repressoren. Weisen die Pfeile in beide Richtungen, werden sowohl *BAT*-Gene als auch Gene der Glucosinolatsynthese gleichartig reguliert, ansonsten erfolgt eine spezifische Regulation von nur einer Gruppe von Genen. Die in den Zellen stehenden Zahlen geben die Signalintensität n als $\log_2(n)$ an.

Zusammengefasst lassen die genannten Übereinstimmungen der Expressionsmuster von *AtBAT5* mit denen der Biosyntheseenzyme für aliphatische Glucosinolate den Schluss zu, dass *AtBAT5* innerhalb dieses Syntheseweges eine Funktion übernehmen könnte. Eine Analyse des Glucosinolatprofils der zugehörigen *Knock out*-Mutante bestätigt diese Annahme.

Die *AtBAT5*-T-DNA-Insertionsmutante weist um ca. 50 % reduzierte Gehalte an aliphatischen Glucosinolaten im Vergleich zum Wildtyp auf.

Der Gesamtgehalt an Glucosinolaten in Pflanzen der Linie *bat5-1* beträgt etwa nur die Hälfte desjenigen von Wildtyp-ColO-Pflanzen. Dies ist insbesondere auf eine etwa 50%ige Reduktion des Gehalts an dem aliphatischen Glucosinolat 4-Methylsulfinylbutyl (4-MSOB) zurückzuführen, das im Ökotyp Columbia das hauptsächlich akkumulierte Glucosinolat darstellt. Weiterhin sind ebenso die Level der aliphatischen Glucosinolate 3-MSOP, 4-MTB und 8-MSOO um die Hälfte reduziert, während unveränderte Mengen an indolischen Glucosinolaten wie I-3-M, 4-MOI-3-M und 1-MOI-3-M vorliegen. Ganz ähnlich stellt sich das Glucosinolatprofil der *bcat4*-Mutante dar. Auch diese Mutante weist eine Reduktion an aliphatischen Glucosinolaten um ca. 50% auf, wobei wiederum 4-MSOB den Hauptteil ausmacht (Schuster *et al.*, 2006). Dieser Befund deutet darauf hin, dass in beiden Mutanten (*bat5-1*, *bcat4*) der Syntheseweg an nahe beieinander liegenden Schritten unterbrochen ist (Abb. 55).

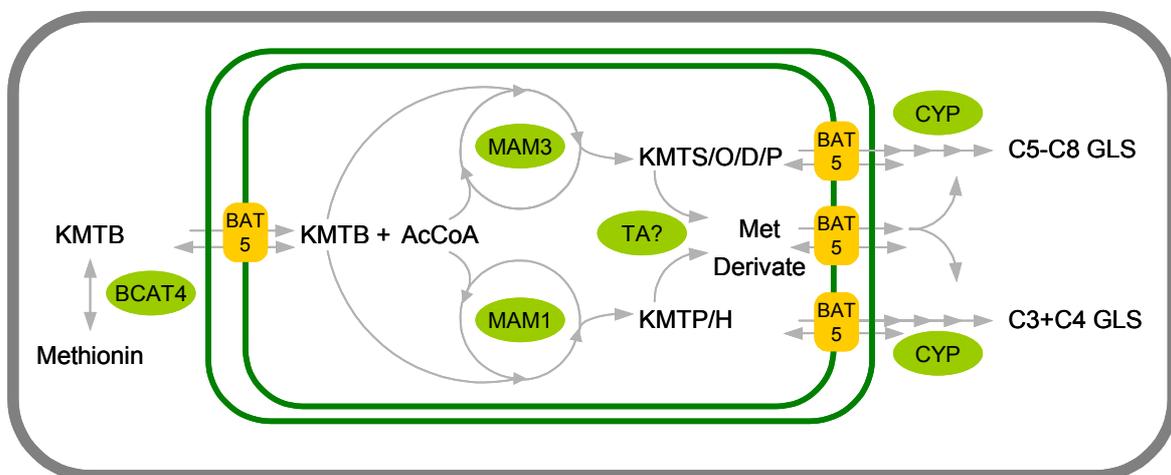


Abb. 55: Vereinfachte schematische Darstellung der Biosynthese aliphatischer Glucosinolate in *A. thaliana* unter besonderer Beachtung der ersten kettenverlängernden Schritte im Chloroplasten. Dargestellt ist eine Pflanzenzelle mit Chloroplast. Enzymaktivitäten sind grün markiert, putative Transportaktivitäten durch gelbe Symbole gekennzeichnet. Alle diese Transportaktivitäten könnten von *AtBAT5* durchgeführt werden, wobei der genaue Transportmechanismus unbekannt ist.

Eine Kreuzung beider Mutanten könnte weitere Hinweise zum von AtBAT5 transportierten Substrat liefern. Denn ist KMTB tatsächlich dieses Substrat, dann sollte die Doppelmutante über ein unverändertes Glucosinolatprofil verfügen. Ist KMTB nicht das Substrat oder nur eines der Substrate, dann sollte eine zusätzliche Blockierung des Transportweges zu einer weiteren Reduktion an Glucosinolaten führen (Abb. 55). Auch eine Kreuzung der *bat5-1*- mit den verschiedenen *mam*-Mutanten könnte den Kreis der möglichen Substrate weiter einzugrenzen helfen. Im Chloroplasten wurden die beiden Enzyme MAM1 und MAM3 (früher MAM-L) als an der Kettenverlängerung von Methionin beteiligt identifiziert (Textor *et al.*, 2004; Field *et al.*, 2004; Textor *et al.*, 2007). MAM1 nutzt KMTB und KMTP als Substrate und ist somit nur an der Synthese von C3- und C4-Glucosinolaten beteiligt (Textor *et al.*, 2004). Dementsprechend ist die *mam1*-Mutante durch ein fast vollständiges Fehlen aller C4-Glucosinolate gekennzeichnet, während der Gehalt an längerkettigen aliphatische Glucosinolaten unverändert bleibt. Ist AtBAT5 auch oder ausschließlich am Export dieser längerkettigen Methioninderivate oder Ketosäuren beteiligt, dann sollte die *mam1 x bat5-1*-Doppelmutante ebenfalls eine deutliche Reduktion längerkettiger Glucosinolate aufweisen (Abb. 55). MAM3 ist ein weniger spezifisches Enzym und grundsätzlich in der Lage, Ketosäuren aller Kettenlängen (C3-C8) zu verwerten (Textor *et al.*, 2007). Dabei steigt die Affinität des Enzyms zum Substrat mit zunehmender Kettenlänge, so dass die Mutante durch ein fast vollständiges Fehlen aller C6, C7 und C8-Glucosinolate auffällt, was durch vermehrte Akkumulation von C4-Glucosinolaten kompensiert wird (Field *et al.*, 2004; Textor *et al.*, 2007). Diese Kompensation könnte in der *mam3 x bat5-1*-Doppelmutante nicht mehr stattfinden, wenn KMTB, KMTP und/oder Di/Homomethionin die Substrate von AtBAT5 darstellten (Abb. 55). Auch weiter *downstream* im Biosyntheseweg für aliphatische Glucosinolate sind Mutanten wie *bushy/superroot* bekannt, die in der CYP79F1-Aktivität defizient sind. Hier zeigt sich neben dem vollständigen Verlust an kurzkettigen aliphatischen Glucosinolaten (C3 + C4) auch ein morphologisch sichtbarer, buschiger Phänotyp. Dieser beruht jedoch auf pleiotropen Effekten dieser Mutation, da auch die Gehalte an IAA und Cytokinin erhöht sind, was auf die Existenz eines komplexen Netzwerks mit Verknüpfungspunkten zwischen Glucosinolat- und Auxinbiosynthese im Cytosol hindeutet (Reintanz *et al.*, 2001; Grubb & Abel, 2006). Alle Mutationen, die den ersten Teil der Biosynthese der

aliphatischen Glucosinolate im Plastiden betreffen, führen dagegen nur zu Veränderungen, die äußerlich nicht sichtbar sind.

Alle AtBAT-Proteine sind in Plastiden lokalisiert.

Eine Voraussetzung für die Funktion von AtBAT5 im Biosyntheseweg von aliphatischen Glucosinolaten ist mit seiner eindeutig nachgewiesenen plastidären Lokalisation erfüllt. Auch alle anderen AtBAT-homologen Transportproteine konnten als in diesem Kompartiment lokalisiert identifiziert werden. Somit stimmt in diesen Fällen die intrazelluläre Lokalisationen mit der vorhergesagten überein. Vor dem Hintergrund, dass die einzelnen Vorhersageprogramme hohe Raten an falsch-positiv (~20%) und falsch-negativ (~50%) vorhergesagten plastidären Lokalisationen aufweisen (Millar *et al.*, 2006), sollten die Vorteile einer vergleichenden Vorhersage, wie in ARAMEMNON für 8 Programme umgesetzt (Schwacke *et al.*, 2003), genutzt werden.

Auch MAM1 und MAM3 werden als plastidär lokalisiert angegeben, während BCAT4 als eindeutig cytosolisches Protein dargestellt wird. Auch diese Vorhersagen ließen sich experimentell belegen (Textor *et al.*, 2004; Textor *et al.*, 2007; Schuster *et al.*, 2006). Aus der Verteilung der Enzymaktivitäten auf das cytosolische und das plastidäre Kompartiment und der sequenziellen Reihenfolge der von ihnen katalysierten Reaktionen ergibt sich die Notwendigkeit einiger Transportprozesse in und aus dem Chloroplasten (siehe auch Abb. 4B, 55). Als Konsequenz dieser Notwendigkeit stellen sich an dieser Stelle eine Reihe von Fragen: ist AtBAT5 für den Import von KMTB verantwortlich? Sind auch andere, kettenverlängerte Ketosäuren Substrate von AtBAT5, eventuell sogar im Gegentausch mit KMTB? Oder existiert in den Chloroplasten eine zusätzliche Transaminase-Aktivität, so dass auch kettenverlängerte Methioninderivate zu den Substraten bzw. Antiportsubstraten zählen? Wie fügen sich die anderen vier BAT-Proteine in dieses Bild ein? Erste Versuche zur Klärung insbesondere der ersten Fragestellung lassen keinen eindeutigen Schluss zu.

Ketomethylthiobutyrat (KMTB) ist ein potentielles Substrat von AtBAT5.

Aufgrund einer hohen Adsorption von KMTB an artifizielle Phosphatidylcholin-Liposomen kann die Verwendung von KMTB als Substrat weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Es wurden zwar in keinem Fall Transportraten gemessen, die über dem starken Hintergrundlevel lagen, doch könnten eventuell vorhandene Raten durch sekundäre Einflüsse wie die beobachtete starke Bindung/Diffusion von KMTB an die Liposomenmatrix überdeckt werden. Generell kann der Transport von Ketosäuren jedoch mit Hilfe des Liposomensystems gemessen werden (Hutson *et al.*, 1990). Wie schon beschrieben, kann die Art der Lipidumgebung von entscheidender Bedeutung für die Transportaktivität sein. Beispielsweise wiesen punktmutierte Varianten des Glycinbetaincarriers BetP aus *C. glutamicum* nach Rekonstitution in Liposomen, die *E. coli*-Lipide beinhalteten, keine Transportaktivität auf, während diese nach Rekonstitution in Liposomen, die der Membranumgebung aus *C. glutamicum* eher ähnelten, aktiv waren (Schiller *et al.*, 2006). Detaillierte Untersuchungen an der Laktose-Permease LacY lassen eine bedeutende Rolle der Phospholipid-Kopfgruppen der Lipide bei der Interaktion mit dem rekonstituierten Transportprotein erkennen (Merino *et al.*, 2005). Die innere Chloroplastenmembran als sehr wahrscheinlicher Ort der Lokalisation der AtBAT-Proteine ist zu großen Teilen aus den Galactolipiden MGDG und DGDG aufgebaut und enthält als Hauptphospholipid Phosphatidylglycerin und nur wenig Phosphatidylcholin (Block *et al.*, 1983). Eventuell ist eine stabilisierend wirkende Kopfgruppe in den artifiziellen Liposomen unterrepräsentiert, was letztendlich zu der fehlenden Transportaktivität des rekonstituierten Proteins führen könnte. Andererseits konnten bereits eine ganze Reihe von plastidären Transportaktivitäten der inneren Envelopmembran erfolgreich unter Verwendung von Phosphatidylcholin-Liposomen identifiziert und charakterisiert werden (Weber, Schwacke & Flüge, 2005).

Als weitere Ursache für den nicht messbaren Transport von KMTB kann ein fehlendes Symport- oder Antiportssubstrat gelten. In Säugern erfolgt die Energetisierung der Aktivität der homologen Transporter mittels Na^+ -Symport (Hagenbuch & Dawson, 2004). In Pflanzen wird die Funktion von Na^+ -Ionen oftmals von H^+ -Ionen übernommen. Könnten Protonen also im Symport mit KMTB vom Cytosol in das Stroma verlagert werden und somit den Transport energetisieren? Da zwischen Cytosol und Stroma so gut wie keine pH-Differenz besteht, erscheint diese

Annahme fragwürdig. Als wahrscheinlicher kann die Existenz eines Antiportsubstrats angenommen werden. Es ergibt sich hier jedoch die Schwierigkeit, dass ein Großteil der in Frage kommenden Ketosäuren und Methioninderivate im Handel nicht erhältlich ist und über eine Eigen- oder Auftragsynthese hergestellt werden müsste. Zuvor wäre es jedoch sinnvoll, an isolierten Chloroplastenhüllmembranen zu testen, ob diese grundsätzlich eine Transportaktivität für KMTB besitzen. Ist dies der Fall, dann sollten zum einen eine Eingrenzung der möglichen Cosubstrate und zum anderen parallel weitere Untersuchungen zum Nachweis der KMTB-Transportfunktion erfolgen. Eine Eingrenzung des Cosubstratpools kann mit Hilfe der oben genannten Doppelmutanten-Analyse vorgenommen werden.

Zur weiteren Analyse der Transportfunktion von AtBAT5 könnten auch Bakterienstämme verwendet werden, die für bestimmte Substrate auxotroph sind oder diese als C- bzw. N-Quelle verwenden können. Dazu wären jedoch einige Vorversuche notwendig. So bleibt zu testen, ob bspw. *E. coli* oder *C. glutamicum* in der Lage ist, KMTB aufzunehmen und zu verstoffwechseln. Sollte dies zutreffen, könnte auf der Basis vorhandener Mutantenbibliotheken ein *Screening* durchgeführt werden. Ferner könnten mit diesem System alle weiteren AtBAT-Proteine auf ihre Transportaktivität für Ketosäuren getestet werden. Es steht zu vermuten, dass AtBAT4, welches eine etwa 80%ige Homologie zu AtBAT5 aufweist, dessen Expression aber nicht durch Regulatoren der Glucosinolatbiosynthese induziert wird, einen konstitutiv aktiven Transporter für das gleiche Substrat(spektrum) darstellt.

Dass jedoch alle BAT-homologen Transporter in *A. thaliana* in den Biosyntheseweg für aliphatische Glucosinolate eingebunden sind, erscheint eher unwahrscheinlich. Da das Vorkommen von Glucosinolaten hauptsächlich auf die Familie der *Brassicaceen* begrenzt ist, BAT-kodierende Gene aber in fast allen Pflanzenfamilien zu finden sind, kommen auch andere, in oder aus Chloroplasten zu transportierende Verbindungen als Substrate in Frage. Vor diesem Hintergrund kann die vermutete Funktion von AtBAT4 und -5 als spezielle Weiterentwicklung der eigentlichen Funktion der pflanzlichen BAT-Transporter innerhalb der Familie der *Brassicaceae* gelten.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, bisher unbekannte Funktionen von Transportern aus *A. thaliana* zu identifizieren und deren Beteiligung an komplexen Stoffwechselwegen zu klären. Im ersten Teil erfolgte die Charakterisierung der Transporter AtKT1 (At4g39390), AtKT2 (At1g21070) und AtKT3 (At5g42420), die sowohl Ähnlichkeiten zu plastidären Phosphattranslokatoren als auch zu im Endomembransystem lokalisierten Nukleotidzuckertransportern aufweisen und aufgrund von konservierten Aminosäuremotiven als Mitglieder der KT-Familie definiert wurden. Um den möglichen Transport von Nukleotidzuckern durch diese Proteine zu charakterisieren, wurde eine neue Methode zur Aktivitätsmessung nach Rekonstitution in artifizielle Liposomen etabliert. Während für AtKT2 und AtKT3 keine Transportaktivitäten nachgewiesen wurden, konnte AtKT1 als monospezifischer UDP-Galactose-Transporter identifiziert werden. Der Transport von UDP-Galactose erfolgt im strikten Austausch mit UMP. Als kinetische Parameter wurden der K_M -Wert für UMP mit $4,2 \pm 1,2 \mu\text{M}$ und die K_i -Werte für UDP-Galactose mit $5,1 \pm 1,7 \mu\text{M}$ sowie für UDP-Glucose mit $12,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ermittelt. Durch RT-PCR und *in planta* Promotor::GUS-Fusionen konnte in Übereinstimmung mit *Microarray*-Expressionsdaten eine besonders starke Expression der AtKT2 und AtKT3 kodierenden Gene im Pollen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde für das AtKT1 kodierende Gen eine ubiquitäre Expression gezeigt, die in der Wurzel besonders stark ausgeprägt war. Für alle Proteine konnte übereinstimmend die intrazelluläre Lokalisation im trans-Golgi-Netzwerk belegt werden. Die Analyse von *Knock out*-Linien, in denen der Ausfall der einzelnen *AtKT*-Gene nachgewiesen wurde, ließ bisher keine Unterschiede im Vergleich zu Wildtyppflanzen erkennen. Auf der Grundlage der erhaltenen Ergebnisse wird für den durch At4g39390 kodierten UDP-Galactose-Transporter die Bezeichnung AtNST-KT1 vorgeschlagen. Seine physiologische Funktion besteht wahrscheinlich in der Bereitstellung von Nukleotidzuckern für die Synthese von Zellwandbestandteilen und anderen Glycokonjugaten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit erfolgte die funktionelle Charakterisierung von fünf Transportproteinen aus *A. thaliana*, die Ähnlichkeiten zu Gallensäuretransportern aufweisen und infolgedessen als AtBAT1-5 bezeichnet wurden. Anhand von Expressionsstudien, die RT-PCR-Experimente sowie Ergebnisse von *in planta*

Promotor::GUS-Fusionen umfassten, konnte in Übereinstimmung mit bekannten *Microarray*-Daten eine Expression jedes *BAT*-Gens in jedem Organ nachgewiesen werden. Für das *AtBAT5*-Gen konnte weiterhin ein Expressionsmuster beobachtet werden, das mit dem von Genen übereinstimmt, die für Enzyme der aliphatischen Glucosinolatbiosynthese kodieren. Der Arbeitshypothese folgend, die eine Beteiligung der/(des) Carrier/(s) am Transport von Vorstufen der Glucosinolatsynthese in oder aus Chloroplasten vorschlug, konnte eine Lokalisation aller *AtBAT*-Proteine in diesen Organellen dokumentiert werden. Des Weiteren wurde für die in *AtBAT5* betroffene *Knock-out*-Linie *bat5-1* eine 50%ige Reduktion des Gehaltes an aliphatischen Glucosinolaten gemessen. Um den putativen Transport der Vorstufe Ketomethylthiobutyrate (KMTB) zu untersuchen, wurde die Synthese der radioaktiv markierten Form dieser Verbindung etabliert. Alle *AtBAT*-Proteine wurden heterolog in Hefe produziert und als Bestandteil von Hefe-Gesamtmembranen sowie in gereinigter Form in artifiziellen Liposomen hinsichtlich ihrer Aktivität analysiert. Unter den bisher gewählten Bedingungen konnte jedoch kein KMTB-Transport nachgewiesen werden. Parallel zu diesen Experimenten sollte die Funktion der pflanzlichen Transporter in einem bakteriellen Expressionssystem untersucht werden, das die Komplementation einer Gallensäuretransport-defizienten *E. coli*-Mutante beinhaltet. Dabei konnte für kein pflanzliches *BAT*-Protein ein Funktionsnachweis geführt werden. Allerdings wurde für das aus *C. glutamicum* stammende Protein Cgl3042 im heterologen System die Funktion als Gallensäuretransporter nahegelegt. In Kombination mit der für die *Cgl3042-Knock out*-Mutante beobachtete Sensitivität gegenüber Gallensalzen konnte Cgl3042 als Exportsystem für diese Substanzen in *C. glutamicum* identifiziert werden.

Über die Funktion der pflanzlichen *BAT*-Proteine können keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, allerdings deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Transportfunktion innerhalb des Biosyntheseweges für aliphatische Glucosinolate in *A. thaliana* hin.

7. Literaturverzeichnis

- (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Abeijon C., Robbins P.W., Hirschberg C.B.** (1996) Molecular cloning of the Golgi apparatus uridine diphosphate-*N*-acetylglucosamin transporter from *Kluyveromyces lactis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5963-5968.
- Aoki K., Ishida N., Kawakita M.** (2003) Substrate recognition by nucleotide sugar transporters. Further characterization of substrate recognition regions by analyses of UDP-galactose/CMP-sialic acid transporter chimeras and biochemical analysis of the substrate specificity of parental and chimeric transporters. *J. Biol. Chem.* 278(25): 22887-22893.
- Bakker H., Routier F., Oelmann S., Jordi W., Lommen A., Gerardy-Schahn R., Bosch D.** (2005) Molecular cloning of two *Arabidopsis* UDP-galactose transporters by complementation of a deficient Chinese hamster ovary cell line. *Glycobiology* 15(2): 193-201.
- Baldwin T.C., Handford M.G., Yuseff M.I., Orellana A., Dupree P.** (2001) Identification and characterization of GONST1, a Golgi-localized GDP-mannose transporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2283-2295.
- Bent A.F.** (2000) *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms and prospects for transformation of other species. *Plant Physiology* 124, 1540-1547.
- Berger B, Stracke R, Yatusevich R, Weisshaar B, Flugge Ul, Gigolashvili T.** (2007) A simplified method for the analysis of transcription factor-promoter interactions that allows high-throughput data generation. *Plant J.* 2007 Apr 8; [Epub ahead of print]
- Berninsone P., Hirschberg C.B.** (2000) Nucleotide sugar transporters of the golgi-apparatus. *Curr. Opinion in Structural Biology* 10: 542-547.
- Berninsone P., Hwang H.Y., Zemtseva I., Horvitz H.R., Hirschberg C.B.** (2001) SQV-7, a protein involved in *Caenorhabditis elegans* epithelial invagination and early embryogenesis, transports UDP-glucuronic acid, UDP-*N*-acetylgalactosamine, and UDP-galactose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3738-3743.
- Birnboim H.C., Doly J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 7: 1513-1523.
- Block M.A., Dorne A.-J., Joyard J., Douce R.** (1983) Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *J Biol. Chem.* 258: 13281-13286.
- Blum H., Beier H., Gross H.J.** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bonin C.P., Potter I., Vanzin G.F., Reiter W.D.** (1997) The *MUR1* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the *de novo* synthesis of GDP-L-fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2085-2090.
- Bouvier F., Linka N., Issner J.-C., Mutterer J., Weber A.P.M., Camara B.** (2006) *Arabidopsis* SAMT1 defines a plastid transporter regulating plastid biogenesis and plant development. *Plant Cell* 18: 3088-3105.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brown D.J., DuPont F.M.** (1989) Lipid composition of plasma membranes and endomembranes prepared from roots of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* 90: 955-961.

- Brown P.D., Tokuhsa J.G., Reichelt M., Gershenzon J.** (2003) Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 62: 471-481.
- Caffaro C.E., Hirschberg C.B.** (2006) Nucleotide sugar transporters of the golgi-apparatus: from basic science to diseases. *Acc. Chem. Res.* 39: 805-812.
- Caffaro C.E., Hirschberg C.B., Berninsone P.** (2006) Independent and simultaneous translocation of two substrates by a nucleotide sugar transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci* 103: 16176-16181.
- Capasso J.M., Hirschberg C.B.** (1984) Effect of nucleotides on translocation of sugar nucleotides and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate into golgi apparatus vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 777: 133-139.
- Chang C., Kwok S., Bleeker A., Meyerowitz E.** (1993) *Arabidopsis ethylene-response gene* ETR1: Similarity of product to two-component regulators. *Science* 262 : 539 – 544.
- Chen S, Petersen BL, Olsen CE, Schulz A, Halkier BA.** (2001) Long-distance phloem transport of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127:194-201.
- Chen S.X., Glawischnig E., Jorgensen K., Naur P., Jorgensen B., Olsen C.E., Hansen C.H., Rasmussen H., Pickett J.A., Halkier B.A.** (2003) CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant J* 33: 923-937.
- Chiaramonte M., Koviach J.L., Moore C., Iyer V.V., Wagner C.R., Halcomb R.L., Miller W., Melançon P., Kuchta R.D.** (2001) Inhibition of CMP-sialic acid transport into Golgi vesicles by nucleoside monophosphates. *Biochemistry* 40: 14260-14267.
- Chung C.T., Miller R.H.** (1993) Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. In R. Wu (ed.). *Methods in Enzymology* 218: 621-627.
- Clough S.J., Bent A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16 (6), 735-743
- Craddock A.L., Love M.W., Daniel R.W., Kirby L.C., Walters H.C., Wong M.H., Dawson P.A.** (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am. J Physiol.* 274: G157-G169.
- Desfeux C., Clough S.C., Bent A.F.** (2000) Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiology* 123, 895-904
- Dickey L.F., Gallo-Meagher M., Thompson W.F.** (1992) Light regulatory sequences are located within the 5' portion of the Fed-1 message sequence. *EMBO J* 11: 2311-2317.
- Eckhardt M., Gotza B., Gerardy-Schahn R.** (1999) Membrane topology of the mammalian CMP-sialic acid transporter. *J. Biol. Chem.* 274(13): 8779-8787.
- Edwards K., Johnston C. and Thompson C.** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR-analysis. *Nucl Acids Res.* 19, 1349.
- Eicks M., Maurino V., Knappe S., Flügge U-I., Fischer K.** (2002) The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiol.* 128: 512-522.
- Ferro M., Salvi D., Brugiére S., Miras S., Kowalski S. et al.** (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell Proteomics* 2: 325-345.
- Ferro M., Salvi D., Riviere-Rolland H., Vermat T., Seigneurin-Berny D. et al.** (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11487-11492.

- Field B., Cardon G., Traka M., Botterman J., Vancanneyt G., Mithen R.** (2004) Glucosinolate and amino acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135: 828-839.
- Fischer K., Arbinger B., Kammerer B., Busch C., Brink S., Wallmeier H., Sauer N., Eckerskorn C., Flügge U-I.** (1994) Cloning and *in vivo* expression of functional triose phosphate/phosphate translocators from C3- and C4-plants: evidence for the putative participation of specific amino acid residues in the recognition of phosphoenolpyruvate. *Plant J* 5: 215-226.
- Fischer K., Kammerer B., Gutensohn M., Arbinger B., Weber A., Häusler R., Flügge U-I.** (1997) A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. *Plant Cell* 9: 453-462.
- Flügge U-I.** (1998) Metabolite transporters in plastids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 201-206.
- Flügge U-I.** (1999) Phosphate translocators in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 27-45.
- Flügge U-I., Fischer K., Gross A., Sebald W., Lottspeich F., Eckerskorn C.** (1989) The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: Nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the *in vitro* synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO J.* 8: 39-46.
- Froehlich J.E., Wilkerson C.G., Ray W.K., McAndrews R.S., Osteryoung K.W. et al.** (2003) Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J Proteome Res.* 2: 413-425.
- Fu H., Kim S.Y., Park W.D.** (1995) A potato Sus3 sucrose synthase gene contains a context-dependent 3' element and a leader intron with both positive and negative tissue-specific effects. *Plant Cell* 7: 1395-1403.
- Gao X.D., Dean N.** (2000) Distinct protein domains of the yeast Golgi GDP-mannose transporter mediate oligomer assembly and export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 275: 17718-17727.
- Gao X.D., Nishikawa A., Dean N.** (2001) Identification of a conserved motif in the yeast Golgi GDP-mannose transporter required for binding to nucleotide sugar. *J. Biol. Chem.* 276: 4424-4432.
- Gerardy-Schahn R., Oelmann S., Bakker H.** (2001) Nucleotide sugar transporters: biological and functional aspects. *Biochimie* 83: 775-782.
- Geyer J., Godoy J.R., Petzinger E.** (2004) Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 316: 300-306.
- Geyer J., Wilke T., Petzinger E.** (2006) The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 372: 413-431.
- Goto S., Taniguchi M., Moraoka M., Toyoda H., Sado Y., Kawakita M., Hayashi S.** (2001) UDP-sugar transporter implicated in glycosylation and processing of Notch. *Nat. Cell Biol.* 3: 816-822.
- Gross A., Brückner G., Heldt H.W., Flügge U-I.** (1990) Comparison of the kinetic properties, inhibition and labelling of the phosphate translocators from maize and spinach mesophyll chloroplasts. *Planta* 180: 262-271.
- Grubb C.D., Abel S.** (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11: 89-100.

- Grubb C.D., Zipp B.J., Ludwig-Müller J., Masuno M.N., Molinski T.F., Abel S.** (2004) *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant J* 40: 893-908.
- Guillen E, Hirschberg C.B.** (1995) Transport of adenosine triphosphate into endoplasmic reticulum proteoliposomes. *Biochemistry*. 34:5472-6.
- Hagenbuch B., Dawson P.** (2004) The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflügers Archiv – Eur. Journal of Physiology* 447: 566-570.
- Hagenbuch B., Lubbert H., Stieger B., Meier P.J.** (1990) Expression of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol. Chem.* 265: 5357-5360.
- Hagenbuch B., Meier P.J.** (1994) Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin. Invest.* 93: 1326-1331.
- Hagenbuch B., Stieger B., Foguet M., Lubbert H., Meier P.J.** (1991) Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc. Natl. Acad. Sci* 88: 10629-10633.
- Halkier B.A., Gershenzon J.** (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 303-333.
- Hallen S., Branden M., Dawson P.A., Sachs G.** (1999) Membrane insertion scanning of the human ileal sodium/bile acid cotransporter. *Biochemistry* 38: 11379-11388.
- Hallen S., Mareninova O., Branden M., Sachs G.** (2002) Organization of the membrane domain of the human liver sodium/bile acid cotransporter. *Biochemistry* 41: 7253-7266.
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-579.
- Handford M., Rodriguez-Furlan C., Orellana A.** (2006) Nucleotide-sugar transporters: structure, function and roles *in vivo*. *Braz. J Med. Biol. Res.* 39: 1149-1158.
- Handford M.G., Sicilia F., Brandizzi F., Chung J.H., Dupree P.** (2004) *Arabidopsis thaliana* expresses multiple Golgi localised nucleotide-sugar transporters related to GONST1. *Mol. Gen. Genet.* 272: 397-410.
- Hata S., Wang P., Eftychiou N., Ananthanarayanan M., Batta A., Salen G., Pang K.S., Wolkoff A.W.** (2003) Substrate specificities of rat oatp1 and ntcp: implications for hepatic organic anion uptake. *Am. J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285: G829-G839.
- Herrmann K.M., Weaver L.M.** (1999) The Shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 473-503.
- Hirai M.Y., Klein M., Fujikawa Y., Yano M., Goodenowe D.B., Yamazaki Y., Kanaya S., Nakamura Y., Kitayama M., Suzuki H., Sakurai N., Shibata D., Tokuhiya J., Reichelt M., Gershenzon J., Papenbrock J., Saito K.** (2005) Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. *J Biol. Chem.* 280: 25590-25595.
- Hirschberg C.B., Robbins P.W., Abeijon C.** (1998) Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulphate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 49-69.
- Hong K., Ma D., Beverley S.M., Turco S.J.** (2000) The *Leishmania* GDP-mannose transporter is an autonomous, multi-specific, hexameric complex of LPG2 subunits. *Biochemistry* 39: 2013-2022.

- Hörtensteiner S., Vogt E., Hagenbuch B., Meier P.J., Amrhein N., Martinoia E.** (1993) Direct energization of bile acid transport into plant vacuoles. *J Biol. Chem.* 268: 18446-18449.
- Hutson S.M., Roten S., Kaplan R.S.** (1990) Solubilization and functional reconstitution of the branched-chain keto acid transporter from rat heart mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci* 87: 1028-1031.
- Ito T., Sakai H., Meyerowitz E.M.** (2003) Whorl-specific expression of the *SUPERMAN* gene of *Arabidopsis* is mediated by *cis* elements in the transcribed region. *Curr. Biol.* 13: 1524-1530.
- Jack D.L., Yang N.M., Saier M.H.Jr.** (2001) The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* 268: 3520-3629.
- Jefferson R.A.** (1987) Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5(4): 387-405.
- Kalipatnapu S., Chattopadhyay A.** (2005) Membrane protein solubilization: recent advances and challenges in solubilization of serotonin1A receptors. *IUBMB Life* 57: 505-512.
- Kammerer B., Fischer K., Hilpert B., Schubert S., Gutensohn M., Weber A., Flügge, U-I.** (1998) Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* 10: 105-117.
- Kasahara M., Hinkle P.C.** (1977) Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 252(20): 7384-7390.
- Keegstra K., Raikhel N.** (2001) Plant glycosyltransferases. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 219-224.
- Knappe S., Flügge U-I., Fischer K.** (2003a) Analysis of the plastidic *phosphate translocator* gene family in *Arabidopsis* and identification of new *phosphate translocator*-homologous transporters, classified by their putative substrate-binding site. *Plant Physiol.* 131: 1178-1190.
- Knappe S., Löttgert T., Schneider A., Voll L., Flügge U-I., Fischer K.** (2003b) Characterization of two functional *phosphoenolpyruvate/phosphate translocator* (*PPT*) genes in *Arabidopsis*: *AtPPT1* may be involved in the provision of signals for correct mesophyll development. *Plant J.* 36: 411-420.
- Koga J., Kubota H., Gomi S, Umemura K., Ohnishi M., Kono T.** (2006) Cholic acid, a bile acid elicitor of hypersensitive cell death, pathogenesis-related protein, and phytoalexin accumulation in rice. *Plant Physiol.* 140: 1475-1483.
- Koroleva O.A., Davies A., Deeken R., Thorpe M.R., Tomos A.D., Hedrich R.** (2000) Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk. *Plant Physiol.* 124: 599-608.
- Krämer R., Aquila H, Klingenberg M.** (1977) Isolation of the unliganded adenosine 5'-diphosphate, adenosine 5'-triphosphate carrier-linked binding protein and incorporation into the membranes of liposomes. *Biochemistry* 16: 4949-4953.
- Kullak-Ublick G.A., Glasa J., Boker C., Oswald M., Grutzner U., Hagenbuch B., Stieger B., Meier P.J., Beuers U., Kramer W., Wess G., Paumgartner G.** (1997) Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 113: 1295-1305.
- Kumamoto K., Goto Y., Sekikawa K., Takenoshita S., Ishida N., Kawakita M., Kannagi R.** (2001) Increased expression of UDP-galactose transporter messenger RNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen-Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants. *Cancer Res.* 61: 4620-4627.
- Kurdi P, Kawanishi K, Mizutani K, Yokota A.** (2006) Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *J Bacteriol.* 188:1979-86.

- Khyse-Andersen J.** (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem. Biophys. Methods* 10(3-4): 203-209.
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lerouxel O., Cavalier D.M., Liepman A.H., Keegstra K.** (2006) Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides – a complex process. *Curr. Opinion in Plant Biol.* 9: 621-630.
- Li L., He Z., Pandey G.K., Tsuchiya T., Luan S.** (2002) Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *J Biol. Chem.* 277: 5360-5368.
- Liu Y.G., Mitsukawa N., Oosumi T. and Whittier R.F.** (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, 8, 457-463.
- Loddenkötter B., Kammerer B., Fischer K., Flügge U-I.** (1993) Expression of the functional mature chloroplast triose phosphate translocator in yeast internal membranes and purification of the histidine-tagged protein by a single metal affinity chromatography step. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2155-2159.
- Lu Y-P., Li Z-S., Drozdowicz Y.M., Hörtensteiner S., Martinoia E., Rea P.A.** (1998) AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell* 10: 267-282.
- Lübke T., Marquardt T., Etzioni A., Hartmann E., von Figura K., Körner C.** (2001) Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. *Nat. Genet.* 28: 73-76.
- Lühn K., Wild M.K., Eckhardt M., Gerardy-Schahn R., Vestweber D.** (2001) The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. *Nat. Genet.* 28: 69-72.
- Ma D., Cook N.D., Alberti M., Pon N.G., Nikaido H., Hearst J.E.** (1995) Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16: 45-55.
- Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook, J.** (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour New York.*
- Mansour N.M., Sawhney M., Tamang D.G., Vogel C., Saier M.H.Jr.** (2007) The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily. *FEBS J.* 274: 612-629.
- Martinez-Duncker I., Mollicone R., Codogno P., Oriol R.** (2003) The nucleotide-sugar transporter family: a phylogenetic approach. *Biochimie* 85: 245-260.
- Meister A.** (1952) Enzymatic preparation of α -keto acids. *J Biol. Chem.* 197: 309-317.
- Merino S, Domenech O, Vinas M, Montero MT, Hernandez-Borrell J.** (2005) Effects of lactose permease on the phospholipid environment in which it is reconstituted: a fluorescence and atomic force microscopy study. *Langmuir.* 21: 4642-4647.
- Mewis I., Appel H.M., Hom A., Raina R., Schultz J.C.** (2005) Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiol.* 138: 1149-1162.
- Milla M.E., Clairmont C.A., Hirschberg C.B.** (1992) Reconstitution into proteoliposomes and partial purification of the golgi-apparatus membrane UDP-galactose, UDP-xylose, and UDP-glucuronic acid transport activities. *J Biol. Chem.* 267: 103-107.

- Millar A.H., Whelan J., Small I.** (2006) Recent surprises in protein targeting to mitochondria and plastids. *Curr. Opinion in Plant Biology* 9: 610-615.
- Millenaar F.F., Okyere J., May S.T., van Zanten M., Voeselek L.A.C.J., Peeters A.J.M.** (2006) How to decide? Different methods of calculating gene expression from short oligonucleotide array data will give different results. *BMC Bioinformatics* 7
- Miura N., Ishida N., Hoshino M., Yamauchi M., Hara T., Ayusawa D., Kawakita M.** (1996) Human UDP-galactose translocator: molecular cloning of a complementary DNA that complements the genetic defect of a mutant cell line deficient in UDP-galactose translocator. *J. Biochem. (Tokyo)* 120(2): 236-241.
- Morita Y., Kodama K., Shiota S., Mine T., Kataoka A., Mizushima T., Tsuchiya T.** (1998) NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 1778-1782.
- Mullis KB, Faloona FA.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50.
- Murashige T., Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15: 473-497
- Murcha M.W., Elhafez D., Lister R., Tonti-Filippini J., Baumgartner M., Philippar K., Carrie C., Mokranjac D., Soll J., Wehlan J.** (2007) Characterization of the preprotein and amino acid transporter gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143: 199-212.
- Nebenfürer A., Ritzenthaler C., Robinson D.G.** (2002) Brefeldin A: Deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol.* 130: 1102-1108.
- Neumann U., Brandizzi F., Hawes C.** (2003) Protein transport in plant cells: in and out of the golgi. *Annals of Botany* 92: 167-180.
- Niewiadomski P., Knappe S., Geimer S., Fischer K., Schulz B., Unte U.S., Rosso M.G., Ache P., Flügge U-I., Schneider A.** (2005) The *Arabidopsis* plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell* 17: 760-775.
- Norambuena L., Marchant L., Berninsone P., Hirschberg C.B.** (2002) Transport of UDP-galactose in plants. Identification and functional characterization of AtUTr1, an *Arabidopsis thaliana* UDP-galactose/UDP-glucose transporter. *J. Biol. Chem.* 277(36): 32923-32929.
- Norambuena L., Nilo R., Handford M., Reyes F., Marchant L., Meisel L., Orellana A.** (2005) AtUTr2 is an *Arabidopsis thaliana* nucleotide sugar transporter located in the Golgi apparatus capable of transporting UDP-galactose. *Planta* 222: 521-529.
- Ogier G., Chantepie J., Deshayes C., Chantegrel B., Charlot C., Doutheau A., Quash G.** (1993) Contribution of 4-methylthio-2-oxobutanoate and its transaminase to the growth of methionine-dependent cells in culture. *Biochem. Pharmacology* 45: 1631-1644.
- Okusu H., Ma D., Nikaido H.** (1996) AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bac.* 178: 306-308.
- Oppedisano F., Pochini L., Gallucio M., Indiveri C.** (2007) The glutamine/amino acid transporter (ASCT2) reconstituted in liposomes: transport mechanism, regulation by ATP and characterization of the glutamine/glutamate antiport. *Biochimica Biophysica Acta* 1768: 291-298
- Ozcan N., Kraemer R., Morbach S.** (2005) Chill activation of compatible solute transporters in *Corynebacterium glutamicum* at the level of transport activity. *Journal of Bacteriology* 187 : 4752-4759

- Pena M., Ryden P., Madson M., Smith A.C., Carpita N.C.** (2004) The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in *Arabidopsis* during growth. *Plant Physiol.* 134: 443-451.
- Petersen B.L., Chen S., Hansen C.H., Olsen C.E., Halkier B.A.** (2002) Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 214: 562-571.
- Piddock L.J.** (2006) Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology* 4: 629-636.
- Price C.E., Reid S.J., Driessen A.J.M., Abratt V.R.** (2006) The *Bifidobacterium longum* NCIMB 702259^T *ctr* gene codes for a novel cholate transporter. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 923-926.
- Puglielli L., Hirschberg C.B.** (1999) Reconstitution, identification and purification of the rat liver golgi membrane GDP-fucose transporter. *J Biol. Chem.* 274: 35596-35600.
- Reintanz B., Lehnen M., Reichelt M., Gershenzon J., Kowalczyk M., Sandberg G., Godde M., Uhl R., Palme K.** (2001) *Bus*, a bushy *Arabidopsis* CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell* 13: 351-367.
- Reyes F., Marchant L., Norambuena L., Nilo R., Silva H., Orellana A.** (2006) AtUTr1, a UDP-glucose/UDP-galactose transporter from *Arabidopsis thaliana*, is located in the endoplasmic reticulum and up-regulated by the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 281(14): 9145-9151.
- Rigaud J.** (2002) Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2D-crystals. *Braz. J of Medical and Biological Research* 35: 753-766.
- Ritzenthaler C., Nebenführ A., Movafeghi A., Stussi-Garaud C., Behnia L., Pimpl P., Staehelin L.A., Robinson D.G.** (2002) Reevaluation of the effects of Brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell* 14: 237-261.
- Rzewuski G., Sauter M.** (2002) The novel rice (*Oryza sativa* L.) gene *OsSbf1* encodes a putative member of the Na⁺/bile acid symporter family. *J Exp. Bot.* 53: 1991-1993.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989) Molecular cloning. *Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour New York.*
- Sanger F., Nicklen S., and Coulson A.R.** (1977). DNA sequencing with chain terminator inhibitors. *Proc Nat Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Santaella-Tenorio M.** (2006) Characterization of proteins homologous to nucleotide sugar transporters in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation Universität zu Köln
- Scheible W-R., Pauly M.** (2004) Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr. Opinion in Plant Biol.* 7: 285-295.
- Schiller D., Ott V., Kramer R., Morbach S.** (2006) Influence of membrane composition on osmosensing by the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem.* 281:7737-7746.
- Schuster J., Binder S.** (2005) The mitochondrial branched-chain aminotransferase (AtBCAT-1) is capable to initiate degradation of leucine, isoleucine and valine in almost all tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* 57: 241-254.
- Schuster J., Knill T., Reichelt M., Gershenzon J., Binder S.** (2006) BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:2664-2679.

- Schwacke R., Schneider A., Van der Graaf E., Fischer K., Catoni E., Desimone M., Frommer W.B., Flügge U.-I.** (2003) ARAMEMNON: a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol.* 131: 16-26.
- Segawa H., Soares R.P., Kawakita M., Beverley S.M., Turco S.J.** (2005) Reconstitution of GDP-mannose transport activity with purified *Leishmania* LPG2 protein in liposomes. *J. Biol. Chem.* 280(3): 2028-2035.
- Seifert G.J.** (2004) Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Curr. Opinion in Plant Biology* 7: 277-284.
- Seifert G.J., Barber C., Wells B., Dolan L., Roberts K.** (2002) Galactose biosynthesis in *Arabidopsis*: genetic evidence for substrate channeling from UDP-D-galactose into cell wall polymers. *Curr. Biol.* 12: 1840-1845.
- Shapiro T.A., Fahey J.W., Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Stephenson K.K., Wade K.L., Ye L.X., Talalay P.** (2006) Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study. *Nutr. Cancer Int. J* 55: 53-62.
- Southern E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol. Biol.* 98: 505-517.
- Sprong H., Degroote S., Nilsson T., Kawakita M., Ishida N., van der Sluijs P., van der Meer G.** (2003) Association of the golgi UDP-galactose transporter with UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase allows UDP-galactose import in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. of the Cell* 14: 3482-3493.
- Stolz J., Darnhofer-Demar B., Sauer N.** (1995) Rapid purification of a functionally active plant sucrose carrier from transgenic yeast using a bacterial biotin acceptor domain. *FEBS Lettr.* 377: 167-171.
- Stomp A.-H.** (1992) Histochemical Localization of β -Glucuronidase. In: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. *Academic Press, Inc. Ed. S. R. Gallagher.*
- Sun-Wada G.H., Yoshioka S., Ishida N., Kawakita M.** (1998) Functional expression of the human UDP-galactose transporters in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem. (Tokio)* 123: 912-917.
- Tanaka N., Konomi M., Osumi M., Takegawa K.** (2001) Characterization of a *Schizosaccharomyces pombe* mutant deficient in UDP-galactose transport activity. *Yeast* 18: 903-914.
- Textor S., Bartram S., Kroymann J., Falk K.L., Hick A., Pickett J.A., Gershenzon J.** (2004) Biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*: recombinant expression and characterization of methylthioalkylmalate synthase, the condensing enzyme of the chain-elongation cycle. *Planta* 218: 1026-1035.
- Textor S., de Kraker J.-W., Hause B., Gershenzon J., Tokuhisa J.G.** (2007) MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. epub*
- Trauner M., Boyer J.L.** (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 83: 633-671.
- Ueguchi-Tanaka M., Motoyuki A., Nakajima M., Itoh H., Katoh E., Kobayashi M., Chow T., Hsing Y., Kitano H., Yamaguchi I., Matsuoka M.** (2005) *Gibberellin Insensitive Dwarf1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: 693-698.
- Wagner R., Apley E.C., Gross A., Flügge U.-I.** (1989) The rotational diffusion of chloroplast phosphate translocator and of lipid molecules in bilayer membranes. *Eur. J. Biochem.* 182: 165-173.
- Ward J.M.** (2001) Identification of novel families of membrane proteins from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* 17: 560-563.

- Weber A., Schwacke R., Flügge U.-I.** (2005) Solute transporters of the plastid envelope membrane. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 133-164.
- Weber A.P.M.** (2004) Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma. *Curr. Opinion in Plant Biol.* 7: 247-253.
- Weber K., Osborn, M.** (1969) The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4409.
- Wee E.G.-T., Sherrier D.J., Prime T.A., Dupree P.** (1998) Targeting of active sialyltransferase to the plant golgi apparatus. *Plant Cell* 10: 1759-1768.
- Weinman S.A., Carruth M.W., Dawson P.A.** (1998) Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic. *J Biol Chem.* 273: 34691-34695.
- Wittstock U., Halkier B.A.** (2002) Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Science* 7: 263-270.
- Wong M.H., Oelkers P., Craddock A.L., Dawson P.A.** (1994) Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol. Chem.* 269: 1340-1347.
- Wong M.H., Oelkers P., Dawson P.A.** (1995) Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J Biol. Chem.* 270: 27228-27234.
- Zhang E.Y., Phelps M.A., Banerjee A., Khantwal C.M., Chang C., Helsper F., Swaan P.W.** (2004) Topology scanning and putative three-dimensional structure of the extracellular binding domains of the apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2). *Biochemistry* 43: 11380-11392.
- Zhang Y., Talalay P., Cho C.G., Posner G.H.** (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2399-2403.
- Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Henning L., Gruissem W.** (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* 136: 2621-2632.

8. Anhang

8.1. Primersequenzen

Tabelle 9: Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer einschließlich ihrer Sequenz in 5'-3'-Richtung und ihrem Verwendungszweck

Gen	Primerbezeichng.	Primersequenz (5' → 3')	Verwendung
<i>AtKT1</i>	At4G39390PromGUS forI	CACCTCTTTAACCAAACGGAACCT	Prom::GUS-Fusion
<i>AtKT1</i>	At4g39390PromGUS revI	GATGATTCCAACGGAAGTAA	Prom::GUS-Fusion
<i>AtKT1</i>	HefeAt4g39390 for	CACCAAAATGTTTAAAAAATGAGTGCT ACT	cDNA::GFP-Fusion; Hefeexpression
<i>AtKT1</i>	HefeAt4g39390 rev	CACCTTTTCATCAGATTTCGTTT	cDNA::GFP-Fusion; Hefeexpression
<i>AtKT1</i>	105535aF	CCGCTATTGCTGTCTGGAGCAC	<i>Knockout</i> -Screening- Primer; RT-PCR
<i>AtKT1</i>	105535aR	TGTCAATGCGTATCACTTTC	<i>Knockout</i> -Screening- Primer; RT-PCR
<i>AtKT2</i>	At1g21070PromGUS forI	CACCGGTCAATTTCTGTTGTGACC	Prom::GUS-Fusion
<i>AtKT2</i>	At1g21070PromGUS revI	TGCTTTCTCCATTTGGATTC	Prom::GUS-Fusion
<i>AtKT2</i>	HefeAt1g21070 for	CACCAAAATGGAGAAAGCAGAGAA	cDNA::GFP-Fusion; Hefeexpression
<i>AtKT2</i>	HefeAt1g21070	TGCTTTATTATTTCCAAGCTCCA	cDNA::GFP-Fusion; Hefeexpression
<i>AtKT2</i>	125196 IaF	TCTACGCTTTTTGGCTTTTCTTCG	<i>Knockout</i> -Screening- Primer; RT-PCR
<i>AtKT2</i>	125196 IaR	GCAGAGTCACTGCCAGATTACCAC	<i>Knockout</i> -Screening- Primer
<i>AtKT2</i>	50a rev III	AGAGTACATGATGGGGGAAA	RT-PCR
<i>AtKT3</i>	At5g42420PromGUS for I	CACCCAAAAGATTACATGCCCAAG	Prom::GUS-Fusion
<i>AtKT3</i>	At5g42420PromGUS rev I	CTCTGGTCAACTGTCACCAC	Prom::GUS-Fusion
<i>AtKT3</i>	Hefe42420 for	CACCAAAATGGCGGCGGAGAATGA	cDNA::GFP-Fusion; Hefeexpression
<i>AtKT3</i>	Hefe42420 rev	ATCTTTTGTGCGGCCAAGT	cDNA::GFP-Fusion; Hefeexpression
<i>AtKT3</i>	134294IaF	TGGTATCAAACGCTACCGGATTCT	<i>Knockout</i> -Screening- Primer; RT-PCR

Gen	Primerbezeichng.	Primersequenz (5` → 3`)	Verwendung
<i>AtKT3</i>	134294IaR	CTAATCTTTTGTGCGGCCAAGTTC	<i>Knockout</i> -Screening-Primer
<i>AtKT3</i>	49a rev II	AGGATCCGATCTCTTGGTTT	RT-PCR
<i>UDP-GalT2</i>	76670PromGUS forI	CACCCACATTGAATTGCGGCATTA	Prom.:GUS-Fusion
<i>UDP-GalT2</i>	76670PromGUS revI	CGATTTCTTCTCGCTCTCC	Prom.:GUS-Fusion
<i>UDP-GalT2</i>	HefeAt1g76670 for	CACCAAATGGAGAAACCGGAGAG	cDNA.:GFP-Fusion; Hefexpression
<i>UDP-GalT2</i>	HefeAt1g76670 rev	TGGTTTAGTGTCACCGAGTTC	cDNA.:GFP-Fusion; Hefexpression
<i>UDP-GalT2</i>	582F05 IaF	TGGTTGTGGTTATCGGTGTTGGGA	<i>Knockout</i> -Screening-Primer; RT-PCR
<i>UDP-GalT2</i>	582F05 IaR	GTGTTTGCCGTGTGGCGTTGACTT	<i>Knockout</i> -Screening-Primer; RT-PCR
<i>AtBAT1</i>	26900PromGUS forI	CACCTGGAGAAGATGAGGGAAGAG	Prom.:GUS-Fusion
<i>AtBAT1</i>	26900PromGUS revI	GGTGTGATTCTGCATTGAC	Prom.:GUS-Fusion
<i>AtBAT1</i>	26900GFP for	CACCATGGCTTCCATTTCCAGAATC	cDNA.:GFP-Fusion
<i>AtBAT1</i>	26900GFP revII	GAAGTCATCCTTGTCATCTGC	cDNA.:GFP-Fusion
<i>AtBAT1</i>	Hefe26900 for	TAGCCCTGTCTTTGCTCTTGA	Hefexpression, KAM3-Komplementation
<i>AtBAT1</i>	Hefe26900 rev	ATGCACGCCCTTGTTTCTAT	Hefexpression, KAM3-Komplementation
<i>AtBAT1</i>	101808IIaF	TGATCAAGCCAATTCTAGGT	<i>Knockout</i> -Screening-Primer
<i>AtBAT1</i>	101808IIaR	AGAGGCGTCACTGTTATGAT	<i>Knockout</i> -Screening-Primer
<i>AtBAT1</i>	BAF 12 IbF	CCAGAATCTTACCAACAGATGGCA	RT-PCR
<i>AtBAT1</i>	BAF 12 IbR	CCAGGGCAGCATGAGACTAGGATA	RT-PCR
<i>AtBAT2</i>	78560PromGUS for	CACCCGAAAATACCCTTCTCGTTT	Prom.:GUS-Fusion
<i>AtBAT2</i>	78560PromGUS rev	CTCCTTGGGCATCGATAAAG	Prom.:GUS-Fusion
<i>AtBAT2</i>	78560GFP for	CACCATGGCGTCGGCGATTTCT	cDNA.:GFP-Fusion
<i>AtBAT2</i>	78560GFP revII	AAGCTGTTTTGGGGCACT	cDNA.:GFP-Fusion
<i>AtBAT2</i>	Hefe78560 for	AGGTTTGACTTCGTTCCCTCGT	Hefexpression, KAM3-Komplementation
<i>AtBAT2</i>	Hefe78560 rev	TGGTCCTGAAAGATGTTGAAA	Hefexpression, KAM3-Komplementation
<i>AtBAT2</i>	1g78560-F	AATTAGAGATCACCGACACATTCC	<i>Knockout</i> -Screening-Primer

Gen	Primerbezeichng.	Primersequenz (5' → 3')	Verwendung
<i>AtBAT2</i>	1g78560-R	GTAGGCAAATCGTTTCGACGAAATG	<i>Knockout</i> -Screening-Primer
<i>AtBAT2</i>	RT 78560 for	GTCGGCGATTTCTCTTTCTCT	RT-PCR
<i>AtBAT2</i>	RT 78560 rev	GGACAGCAACCAACCAATATG	RT-PCR
<i>AtBAT3</i>	25PromGUS for3	CACCACCTGGACCACCATTA	Prom:: <i>GUS</i> -Fusion
<i>AtBAT3</i>	25PromGUS rev3	GGCAGTGAGAGCAACAA	Prom:: <i>GUS</i> -Fusion
<i>AtBAT3</i>	3g25410 ATG for	CACCCAGACCAATATAGAAATGA	cDNA:: <i>GFP</i> -Fusion
<i>AtBAT3</i>	25410 <i>GFP</i> revII	TGATTCAGCGGTGTAGCC	cDNA:: <i>GFP</i> -Fusion
<i>AtBAT3</i>	Hefe25410 for	GAGAAACAGCGGATTGGTTC	Hefexpression, KAM3-Komplementation
<i>AtBAT3</i>	Hefe25410 revII	CCATCCCCTCTAAACCTTATCTTT	Hefexpression, KAM3-Komplementation
<i>AtBAT3</i>	3g25410-F	AATTCAGCTTTCAGTTGACGATTT	<i>Knockout</i> -Screening-Primer
<i>AtBAT3</i>	3g25410-R	CAAATGCTACGGCATGGAATGTAA	<i>Knockout</i> -Screening-Primer
<i>AtBAT3</i>	BAB IbF	GAAATGACTTTAATCGCTTCTCTG	RT-PCR
<i>AtBAT3</i>	BAB IIaR	GATCCAATTAGAAGACCACTAAGC	RT-PCR
<i>AtBAT4</i>	22840PromGUS for	CACCTCTCCTTGATTTGTGTCTTTG	Prom:: <i>GUS</i> -Fusion
<i>AtBAT4</i>	22840PromGUS rev	GTCGATGCGAAGTGGAGA AC	Prom:: <i>GUS</i> -Fusion
<i>AtBAT4</i>	22840 <i>GFP</i> for	CACCATGAGCGTGATCACAACCTCCA	cDNA:: <i>GFP</i> -Fusion
<i>AtBAT4</i>	22840 <i>GFP</i> revII	TGTGTTACTCTTTTCCTTAGACCA	cDNA:: <i>GFP</i> -Fusion
<i>AtBAT4</i>	Hefe22840 for	CGAGGAATTTGTGGCGTAGAT	Hefexpression, KAM3-Komplementation
<i>AtBAT4</i>	Hefe22840 revII	TCAAATGTGGAGTGAAACAAAATCA	Hefexpression, KAM3-Komplementation
<i>AtBAT4</i>	044369 IaF	TCCTCCTCGGTTATGTTGGACAAT	<i>Knockout</i> -Screening-Primer, RT-PCR
<i>AtBAT4</i>	044369 IaR	CACCGTCTGCAAAACAAAACAAAA	<i>Knockout</i> -Screening-Primer
<i>AtBAT4</i>	RT 22840 rev	GTATCCAGCGAGGAAAGCTGA	RT-PCR
<i>AtBAT5</i>	12030PromGUS for	CACCCGCGGATGTATATCATTTTG	Prom:: <i>GUS</i> -Fusion
<i>AtBAT5</i>	12030PromGUS rev	AAGTAGTCCTGCGGCAATAG	Prom:: <i>GUS</i> -Fusion
<i>AtBAT5</i>	12030 <i>GFP</i> for	CACCATGGGTGTGATATCTCCGACT	cDNA:: <i>GFP</i> -Fusion
<i>AtBAT5</i>	12030 <i>GFP</i> revII	CGAGACGCCATTAGAGACA	cDNA:: <i>GFP</i> -Fusion
<i>AtBAT5</i>	12030 -TPNot for	TAGCGCCGCGATGCGCAACTCATTCTCTT	Hefexpression (pEX)
<i>AtBAT5</i>	12030Not rev	TAGCGCCGCTCCTTTCTGTTTTTC	Hefexpression (pEX)
<i>AtBAT5</i>	126525 IaF	AAACCGTAAAGAGGAAAAGAT	<i>Knockout</i> -Screening-Primer, RT-PCR

Gen	Primerbezeichng.	Primersequenz (5` → 3`)	Verwendung
<i>AtBAT5</i>	126525 IaR	AAAAGCCGCAATTTTGTTGAT	<i>Knockout</i> -Screening-Primer
<i>AtBAT5</i>	RT 12030 for1	GGGTGTGATATCTCCGACTGA	RT-PCR
<i>AtBAT5</i>	RT 12030 rev1	TCATGAACCCTAAGCCAGGT	RT-PCR
<i>AtBAT5</i>	Hefe 12030 for	CGCAACTCATTCTCTTCTCTAGG	Hefeexpression (pYesNT); KAM3-Komplementation
<i>AtBAT5</i>	Hefe 12030 rev II	AGCCGACCATAAACAACAGCAAAT	Hefeexpression (pYesNT); KAM3-Komplementation
<i>acrB</i>	<i>acrB</i> for	AAACAGGAGCCGTTAAGACA	KAM3-Komplementation
<i>acrB</i>	<i>acrB</i> rev	TACGCGGCCTTAGTGATT	KAM3-Komplementation
<i>sll1428</i>	Syn_1428_5`	GCTCCCATGGAGTCCAATTT	KAM3-Komplementation
<i>sll1428</i>	Syn_1428_3`	TGACCATGGGTTTGTTACGG	KAM3-Komplementation
<i>Cgl1258</i>	Cg_bile1_5`	CAGTTAGGGAGCACATGAGT	KAM3-Komplementation
<i>Cgl1258</i>	Cg_bile1_3`	AGGAGCGAAGCCTTTTAGGA	KAM3-Komplementation
<i>Cgl2327</i>	Cg_bile2_5`	CGGGCAGCAAATAAGTTAGC	KAM3-Komplementation
<i>Cgl2327</i>	Cg_bile2_3`	CACTAGCACGACCATTTTCAG	KAM3-Komplementation
<i>Cgl3042</i>	Cg_bile3_5`	ATGCTTGAACGCCTCAAACG	KAM3-Komplementation
<i>Cgl3042</i>	Cg_bile3_3`	TGGCTAGCTACTGAGGACTT	KAM3-Komplementation
<i>Cgl3042</i>	Cgbile3_mut_for	CACCACGCCTAGATCCGCTCAT	Herstellung <i>Knockout</i> -Mutante
<i>Cgl3042</i>	Cgbile3_mut_rev	ACCCAACGCCTACATACCT	Herstellung <i>Knockout</i> -Mutante
<i>Cgl3042</i>	Cgl3042üex_for	GCGGATCCATGCTTGAACGCCTCAA	Herstellung Überexpressions-Mutante
<i>Cgl3042</i>	Cgl3042üex_rev	GCGGTACCGCTGACGGCGTTGGCTTTCTGTTC	Herstellung Überexpressions-Mutante

8.2. Klonierungen

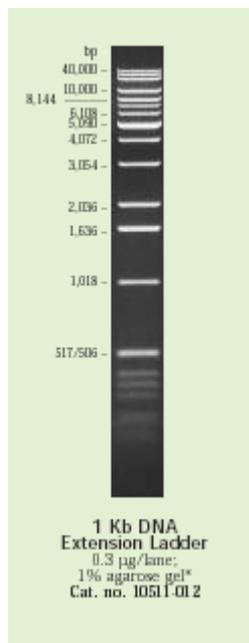
Tabelle 10: Auflistung der Klonierungsschritte

Fragment	Quelle	Zielvektor 1	Klonierungsstrategie	Zielvektor 2
AtKT1Prom	genomische DNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB3
AtKT2Prom	genomische DNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB3
AtKT3Prom	genomische DNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB3
AtUDP-GalT2Prom	genomische DNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB3
AtKT1cDNA	cDNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB5; pYes-Dest 52
AtKT2cDNA	cDNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB5; pYes-Dest 52
AtKT3cDNA	cDNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB5; pYes-Dest 52
AtUDP-GalT2cDNA	cDNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB5; pYes-Dest 52
AtBAT1Prom	genomische DNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB3
AtBAT2Prom	genomische DNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB3
AtBAT3Prom	genomische DNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB3
AtBAT4Prom	genomische DNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB3
AtBAT5Prom	genomische DNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB3
AtBAT1cDNA GFP	cDNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB5
AtBAT2cDNA GFP	cDNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB5
AtBAT3cDNA GFP	cDNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB5
AtBAT4cDNA GFP	cDNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB5
AtBAT5cDNA GFP	cDNA	pENTRY D-TOPO	Gateway-System	pGWB5
AtBAT1cDNA Hefe	cDNA	pGEMTeasy	<i>EcoRI</i>	pYes-NT-A
AtBAT2cDNA Hefe	cDNA	pGEMTeasy	<i>EcoRI</i>	pYes-NT-B
AtBAT3cDNA Hefe	cDNA	pGEMTeasy	<i>NotI</i>	pYes-NT-A
AtBAT4cDNA Hefe	cDNA	pGEMTeasy	<i>EcoRI</i>	pYes-NT-C
AtBAT5cDNA Hefe 1	cDNA	pGEMTeasy	<i>NotI</i>	pYes-NT-B
AtBAT5cDNA Hefe 2	cDNA	pGEMTeasy	<i>NotI</i>	pEX-Tag

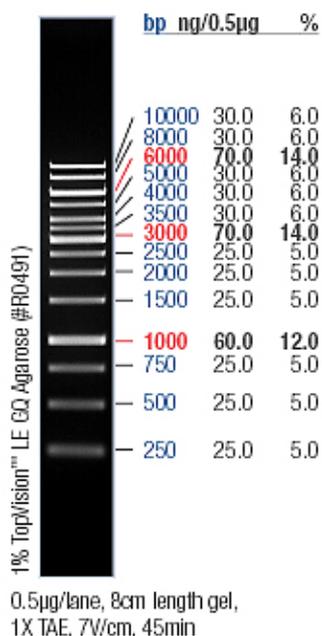
Fragment	Quelle	Zielvektor 1	Klonierungsstrategie	Zielvektor 2
AtBAT1cDNA KAM3	cDNA	pBSC	_____	_____
AtBAT2cDNA KAM3	cDNA	pGEMT	_____	_____
AtBAT3cDNA KAM3	cDNA	pGEMT	_____	_____
AtBAT4cDNA KAM3	cDNA	pGEMT	_____	_____
AtBAT5cDNA KAM3	cDNA	pGEMT	_____	_____
sll1428 KAM3	chromosomale DNA <i>Synechocystis sp.</i>	pGEMT	_____	_____
acrB KAM3	chromosomale DNA <i>E. coli</i>	pGEMT	_____	_____
Cgl1258 KAM3	chromosomale DNA <i>C. glutamicum</i>	pGEMT	_____	_____
Cgl2327 KAM3	chromosomale DNA <i>C. glutamicum</i>	pGEMT	_____	_____
Cgl3042 KAM3	chromosomale DNA <i>C. glutamicum</i>	pGEMT	_____	_____
ΔCgl3042	chromosomale DNA <i>C. glutamicum</i>	pENTRY D-TOPO	_____	_____
Cgl3042ox	chromosomale DNA <i>C. glutamicum</i>	pGEMTeasy	<i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I	pEKEX-Strep

8.3. DNA- und Protein-Marker

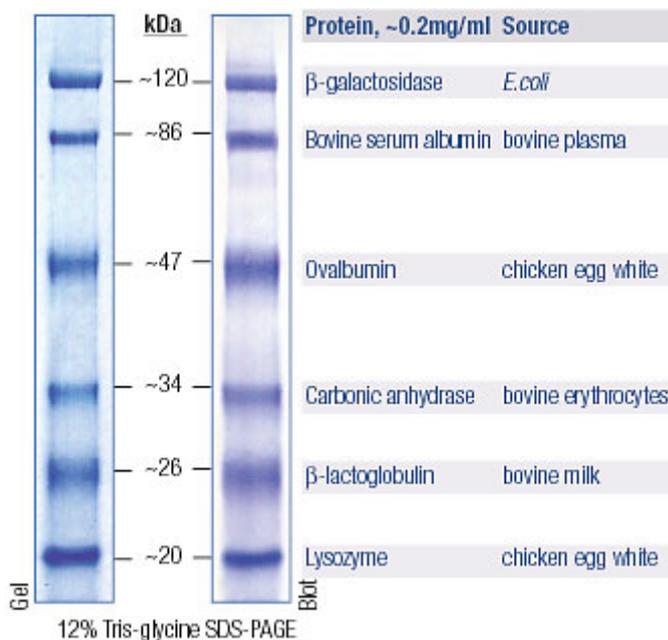
Invitrogen 1 Kb DNA Ladder



MBI GeneRuler™ 1kb



MBI Prestained Protein Molecular Weight Marker



Kurzzusammenfassung

Viele Stoffwechselwege in Pflanzen beinhalten Reaktionen in unterschiedlichen Zellkompartimenten. Während die Enzyme häufig gut charakterisiert sind, ist die Mehrzahl der beteiligten Transporter unbekannt. Zur Analyse der Funktion von drei Membranproteinen, die Ähnlichkeiten zu plastidären Phosphat-Translokatoren und Nukleotidzucker-Transportern des Golgi-Apparates in *A. thaliana* aufweisen, wurde eine neue Methode zur Bestimmung von Transportaktivitäten etabliert. Dadurch gelang die Identifikation und biochemische Charakterisierung eines monospezifischen UDP-Galaktose-Transporters, der als AtNST-KT1 bezeichnet wurde. Wie auch die weiterhin untersuchten Proteine AtKT2 und AtKT3 ist dieser Nukleotidzucker-Transporter im Golgi-Apparat lokalisiert. Das kodierende Gen wird vornehmlich in den Geweben der Wurzel exprimiert, während für *AtKT2* und -3 eine starke Expression im Pollen gezeigt wurde. Der Ausfall keines der entsprechenden Gene führte zu einem morphologisch auffälligen Phänotyp.

Weiterhin wurde die Funktion der putativen Gallensäuretransporter AtBAT1-5 untersucht. Für *AtBAT5* konnten auffällige Übereinstimmungen mit dem Expressionsmuster von Genen, die für Enzyme der Biosynthese aliphatischer Glucosinolate kodieren, festgestellt werden. Aufgrund der nachgewiesenen plastidären Lokalisation aller AtBAT-Proteine und des um 50% reduzierten Gehalts an aliphatischen Glucosinolaten in der *AtBAT5-Knock out*-Linie, wurde insbesondere für AtBAT5 eine Transportfunktion für Intermediate dieses Biosyntheseweges über die Chloroplastenhüllmembran vorgeschlagen. Die Synthese aller AtBAT-Proteine in Hefe und deren Rekonstitution in Liposomen führten bei Einsatz des eigens synthetisierten Substrates Ketomethylthiobutyrate bisher nicht zum Erfolg. Durch funktionelle Komplementationsstudien im bakteriellen System konnte ebenfalls kein Funktionsnachweis erbracht werden, jedoch gelang die Identifikation eines Gallensäureexporters aus dem Bodenbakterium *C. glutamicum*.

Abstract:

Many metabolic pathways in plant cells include conversions in different cellular compartments. Whereas the involved enzymes are frequently known, participating transporters are mostly unknown. In order to characterize the function of three membrane proteins of *A. thaliana* that share structural similarities to plastidic phosphate translocators and nucleotide sugar transporters of the endomembrane system, a new method to measure transport activities was established. By its application a novel monospecific UDP-galactose transporter was identified, biochemically characterized and named AtNST-KT1. As well analyzed members AtKT2, AtKT3 and UDP-GalT2, this nucleotide sugar transporter is located within the Golgi membrane system. The coding gene was found to be mainly expressed in root tissues whereas *AtKT2* and *-3* expression was remarkably high in pollen. The disruption of none of the *KT*-genes resulted in a morphologically visible phenotype.

A second aim of this work was to elucidate the function of the putative bile acid transporters AtBAT1-5 in *A. thaliana*. Interestingly, the expression pattern of *AtBAT5* showed clear similarities to those of genes encoding enzymes of the aliphatic glucosinolate biosynthesis pathway. Since the subcellular localization of all five AtBAT-proteins was shown to be plastidic and because of the drastic reduction of aliphatic glucosinolates in the *AtBAT5* knock out mutant, a transport function of AtBAT5 for intermediates of the aliphatic glucosinolate synthesis across the envelope membranes of chloroplasts was postulated. However, in first transport experiments using heterologously expressed AtBAT-proteins reconstituted in liposomes that were preloaded with self-synthesized ketomethylthiobutyrate (KMTB), no significant transport activity could be measured. By complementation studies using a bacterial system no conclusions could be drawn regarding a bile acid transport activity of plant proteins, but a homologue of the soil bacterium *C. glutamicum* could be identified as a functional bile acid exporter.

Erklärung:

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

Teilpublikationen und Tagungsbeiträge:

Rollwitz I., Santaella M., Hille D., Flügge U.-I., Fischer K. (2006) Characterization of AtNST-KT1, a novel UDP-galactose transporter from *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters 580: 4246-4251

Inga Rollwitz, Diana Hille, Ulf-Ingo Flügge und Karsten Fischer:

Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* proteins homologous to bile acid transporters.

Poster P05-21, Botanikertagung Braunschweig, 5.-10.09.2004

Marcella Santaella-Tenorio, Inga Rollwitz, Ulf-Ingo Flügge und Karsten Fischer:

Molecular characterization of proteins homologous to the plastidic phosphate translocators.

Poster 47, 18. Tagung der Molekularbiologie der Pflanzen Dabringhausen, 1.- 4.03.2005

Marcella Santaella, Inga Rollwitz, Nicole Walczyk, Ulf-Ingo Flügge und Karsten Fischer:
Analysis of new protein families homologous to plastidic phosphate translocators in
Arabidopsis thaliana.

Poster 0218, 17. Internationaler Botanikerkongress Wien, 17.-23.07.2005

Inga Rollwitz, Diana Hille, Ulf-Ingo Flügge, Hans Bohnert und Karsten Fischer:
Functional characterization of *Arabidopsis* proteins homologous to bile acid
transporters.

Poster 0219, 17. Internationaler Botanikerkongress Wien, 17.-23.07.2005

Weitere Publikationen:

Papp T., Pemsel H., Rollwitz I., Schipper H., Weiss D-G., Schiffmann D., Zimmermann R. (2003) Mutational analysis of *N-ras*, *p53*, *p16INK4a*, *p14ARF*, *CDK4* and *MC1R* genes in human dysplastic melanocytic nevi. *Journal of Medical Genetics* 40: E14.

Gutensohn M., Pahnke S., Kolukisaoglu Ü., Schulz B., Schierhorn A., Voigt A., Hust B., Rollwitz I., Stöckel J., Geimer S., Albrecht V., Flügge U-I., Klösgen R-B. (2004) Characterization of a T-DNA insertion mutant for the protein import receptor atToc33 from chloroplasts. *Molecular Genetic and Genomics* 272: 379-396.

Danksagung

Zum guten Schluss möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. U.-I. Flügge möchte ich für das interessante und spannende Thema danken, für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und ganz besonders dafür, dass der Wechsel von Halle nach Köln so schnell und unkompliziert verlaufen konnte.

Herrn Prof. Dr. R. Krämer danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und die Möglichkeit der Entwicklung einer Pflanzen-Bakterien-Schnittstelle.

Bei Herrn Prof. Dr. K. Fischer bedanke ich mich für die vielen mir gegebenen Freiräume und die Tipps und tatkräftige Hilfe bei der Durchführung unzähliger Reihen von Transportversuchen.

Dr. T. Gigolashvili danke ich für die Entdeckung der Beziehung zwischen Gallensäuretransportern und Glucosinolaten, die Durchführung des Cotransformationsassays und die ersten Klonierungsschritte von BCAT4.

Bei Dr. Carolin Müller möchte ich mich für die Messung der Glucosinolatgehalte der *bat5-1*-Mutante bedanken.

Prof. Dr. R. Tenhaken danke ich vielmals für die Durchführung der Analyse der Zellwandbestandteile der *kt1-1*-Mutante.

Bei Prof. Dr. N. Sauer bedanke ich mich für die freundliche Bereitstellung des Vektors pEX-Tag.

Diana Hille danke ich ganz besonders für ihre unschätzbare wertvolle Unterstützung und Hilfe im Labor- und Arbeitsgruppenalltag, für das Pikieren, Screening und Eintüten von Myriaden von Pflanzenmutanten, das selbstlose Überlassen des uralten BotanikII-Parka-Fells im Kühlraum und so manche Plauderstunde bei Transportexperimenten im heimeligen Isotopenlabor.

Allen Mitarbeitern der Gärtnerei, der Werkstatt und Siggie Werth für die freundliche Übernahme vieler Kleinigkeiten die von großer Wichtigkeit sind.

Besonderer Dank gebührt weiterhin Frau Lorbeer und Frau Schwanitz, die es in bewundernswerter Weise schaffen, komplizierte und hochbürokratische Vorgänge in nur eine Unterschrift umzuwandeln.

Ganz besonders danken möchte ich Dr. Marcella Santaella – „Heidi-Marcella“ für ihren Optimismus, ihre vielen Ideen und ihre unerschöpfliche Energie; ob im „P(r)T-Homologues-Team“, beim Bauchtanzlehren, Deutsches-Englisch-ertragen oder bei „la marcha“ in Köln und Wien.

Ein besonders großes DANKESCHÖN gebührt natürlich auch Euch, den Mädels, Kirsten Bell, Bettina Berger, Tanja Löttgert und Esther Grube für viele entspannte tolle Abende und Feiern, aber auch Rat und Lebenshilfe zu jeder Zeit.

Den Fußballtipprundenteilnehmern Dr. Frank Ludewig, Dr. Markus Gierth, Holger Fahnenstich, Christian Greiten und Henning Kunz danke ich für Fußballfachgespräche als willkommene Abwechslung zur Wissenschaft, viele neue Musikeinflüsse und die freitäglichen Minisymposien in der Laube.

Martin Engquist und Ruslan Yatusevich danke vielmals für die spontane Übernahme weiterer AtBAT5-Expressions- und Transportexperimente.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Flügge gilt mein besonderer Dank für ein einmaliges und besonderes Arbeitsklima: Andi, Andre, Anja, Anke, Barbara, Claudia, Daniel, Eric, Iris, Kerstin, Lizhi, Martin, Michael, Nicole, Patrycja, Pia, Rainer Häusler, Rainer Schwacke, Raina Waadt, Ruslan, Silke, Sharis, Sonja, Veena, Vero.

Meinen Freunden aus Schul- und Studientagen danke ich für die vielen aufmunternden Worte und ihr Verständnis für mein ständiges Beschäftigtsein.

Ganz besonders danken möchte ich meinem Vater und meinem Bruder für ihre jahrelange uneingeschränkte Unterstützung jeglicher Art und den festen Glauben an ihre „Kleene“.

Mein besonders besonderer Dank gilt Kay für seine unermüdliche und unschätzbare Unterstützung über den gesamten Zeitraum der Entwicklung dieser Arbeit hinweg, für seine bezwingende Art, den Dingen auf den Grund gehen zu wollen und für seinen Enthusiasmus, mit dem Allem eine positive Seite abzugewinnen ist.

Inga Rollwitz
Klüsserather Str. 7
50969 Köln
Tel.: 0221 / 4470142
Mobil: 0176 / 28024012
ingarollwitz@hotmail.com

LEBENS LAUF

Name: Inga Rollwitz
Geburtsdatum: 12.03.1978
Geburtsort: Güstrow
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

09/1984 – 07/1991 Polytechnische Oberschule Prützen
09/1991 – 07/1996 Gymnasium am Distelberg
Abitur: sehr gut

Studium:

10/1996 – 09/2002 Diplomstudiengang Biologie an der Universität Rostock
Hauptfach: Pflanzenphysiologie
Nebenfächer: Biochemie, Molekularbiologie
Diplomarbeit am Fachbereich Pflanzenphysiologie
Thema: „Charakterisierung GG-produzierender
Kartoffellinien sowie Erzeugung GG-produzierender
Arabidopsis-Linien“
Abschluss: sehr gut

Promotion:

01/ - 05/2003 Annahme einer Doktorandenstelle in Halle / Saale am
Institut für Pflanzenphysiologie, Arbeitsgruppe Prof.
Klößgen
06/2003 – 05/2007 Wechsel an die Universität zu Köln
Wissenschaftliche Angestellte am Botanischen Institut,
Arbeitsgruppe Prof. Flügge
Thema: „Identifikation von Transportern und
Charakterisierung ihrer Rolle im Nukleotidzucker- und
Glucosinolat-Stoffwechsel in *Arabidopsis thaliana*“