

D7

Referent:

PD Dr. Gertrud Lohaus

Korreferent:

Prof. Dr. Hans-Walter Heldt

Tag der mündlichen Prüfung:

06.11.2003

**Aminosäuretransport in Raps unter besonderer  
Berücksichtigung des Entwicklungsstadiums der  
Pflanze und der Stickstoffdüngung**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Jens Tilsner**  
aus Hamburg

Göttingen 2003

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Stickstoff als pflanzliches Nährelement	1
1.2	Assimilation von anorganischem Stickstoff	2
1.3	Ferntransport von Assimilaten und Ionen in der Pflanze	3
1.4	Anatomie des Phloems	5
1.5	Phloem-Beladungsmechanismen	5
1.6	Phloem-Entladung	7
1.7	Verlagerung von Stickstoff in der Pflanze: Source-Sink-Verhältnisse	8
1.8	Identifizierung pflanzlicher Aminosäuretransporter	9
1.9	Familien von Aminosäuretransportern in Arabidopsis	11
1.10	Die Problematik der Stickstoffnutzung bei Raps	15
1.11	Zielsetzung	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Allgemeines	17
2.2	Material	17
2.2.1	Pflanzenmaterial und Anzucht	17
2.2.2	Bakterienstämme	18
2.2.3	Häufig verwendete Nährmedien	19
2.2.4	Plasmide	20
2.3	Feldversuch zur Untersuchung der genetischen Variabilität der Stickstoffnutzung bei Winterraps	20
2.3.1	Bestimmung der Nitratreduktaseaktivität (NRA)	21
2.4	Extraktion von Metaboliten aus Pflanzengeweben	23
2.4.1	Chloroform-Methanol-Extraktion von Blattgeweben	23
2.4.2	Nichtwässrige Fraktionierung	23
2.4.2.1	$\alpha$ -Mannosidase-Test	26
2.4.2.2	Saure Phosphatase-Test	26
2.4.2.3	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-Test	27

2.4.2.4	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Test	27
2.4.3	Extraktion von Apoplastensaft	28
2.5	Metabolit-Messungen	29
2.5.1	Chromatographische Bestimmung von Aminosäuren	29
2.5.2	Chromatographische Bestimmung von Zuckern	31
2.5.3	Chromatographische Bestimmung von Ionen	32
2.6	Methoden zur Isolierung von Proteinen	33
2.6.1	Isolierung von Plasmamembran-Proteinen aus Pflanzen	33
2.6.1.1	Anreicherung von Plasmamembran-Proteinen in einem Zwei-Phasen System	33
2.6.1.2	P-ATPase-Test	36
2.7	Quantitative Proteinbestimmung	37
2.7.1	Proteinbestimmung nach Bradford	37
2.7.2	Proteinbestimmung nach Lowry	38
2.7.3	Proteinbestimmung mit dem „D <sub>C</sub> Protein Assay“	38
2.7.4	Chlorophyllbestimmung	39
2.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	39
2.8.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.8.2	Coomassie-Färbung	42
2.8.3	Silverstain-Färbung	42
2.8.4	KCl-Färbung und Elution von Proteinen aus präparativen SDS-Gelen	43
2.9	Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren	44
2.9.1	Isolation von RNA	44
2.9.1.1	Mini-Präparation pflanzlicher Gesamt-RNA	44
2.9.1.2	Extraktion großer Mengen pflanzlicher Gesamt-RNA	44
2.9.2	Isolation genomischer pflanzlicher DNA	45
2.9.3	Isolation bakterieller Plasmid-DNA	47
2.9.3.1	Plasmid-Mini-Präparation aus <i>E. coli</i>	47
2.9.3.2	Plasmid-Maxi-Präparation aus <i>E. coli</i>	48
2.9.3.3	Plasmid-Mini-Präparation aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
2.9.4	Ethanol-fällung von DNA oder RNA	49
2.9.5	Phenol/Chloroform-Reinigung von DNA oder RNA	49
2.9.6	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	50

2.10	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	50
2.10.1	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	50
2.10.2	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	51
2.11	Hybridisierungsmethoden	52
2.11.1	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten („Random Priming“)	52
2.11.2	Northern Blot	53
2.12	cDNA-Synthese	56
2.13	Auf der Polymerase-Kettenreaktion basierende Methoden	56
2.13.1	Kriterien bei der Ableitung von synthetischen Oligonukleotiden (Primern)	57
2.13.2	Polymerase-Kettenreaktion	59
2.13.3	Kolonie-PCR	61
2.13.4	Amplifikation von cDNA-Enden (RACE)	62
2.13.4.1	Identifizierung des Transkriptions-Endpunktes durch 3' RACE	63
2.13.4.2	Identifizierung des Transkriptions-Startpunktes durch 5'	65
	RACE	67
2.13.5	Amplifikation von Promotoren durch „Genome Walking“	67
2.13.5.1	Herstellung einer „Genome Walker Library“	70
2.13.5.2	„Genome Walking“ PCR	72
2.13.6	DNA-Sequenzierung	74
2.14	Klonierungsmethoden	74
2.14.1	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten	74
2.14.2	Auffüllen von überstehenden Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle	75
2.14.3	Alkalische Phosphatase-Behandlung	75
2.14.4	Ligation von DNA	76
2.14.5	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	
2.14.5.1	Herstellung kompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode	76 77
2.14.5.2	Herstellung kompetenter Zellen nach Inoue <i>et al.</i> (1990)	78
2.14.6	Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	79
2.14.7	Herstellung elektrokompeter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen	80
2.14.8	Elektroporation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	80
2.14.9	Bakteriendauerkultur	80
2.14.10	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	

2.15	Funktionelle Expression von Membranproteinen in <i>Xenopus</i> Oocyten	82
2.16	Nachweis der Promotoraktivität durch einen histochemischen GUS-Test	83
2.17	Immunologische Methoden	84
2.17.1	Herstellung von polyklonalen Antikörpern	85
2.17.2	Western-Blot	87
2.17.3	Immunohistochemischer Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten	89
2.17.3.1	Einbettung von Pflanzengewebe in Methacrylat	89
2.17.3.2	Herstellung von Dünnschnitten	90
2.17.3.3	Behandlung der Schnitte mit Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen	90
2.18	Computergestützte Analyseverfahren	91
2.18.1	Sequenzanalyse von DNA und Proteinen	91
2.18.2	Untersuchungen zur Proteinstruktur	92
2.19	Statistische Auswertung der Experimente	92
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>93</b>
3.1	Feldversuche zur Variabilität der Stickstoffnutzung und -verteilung in <i>B. napus</i>	93
3.2	Aminosäurekonzentrationen in subzellulären Kompartimenten von Mesophyllzellen	99
3.3	Aminosäurekonzentrationen im Apoplasten und Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung in den untersuchten Kompartimenten	103
3.4	Identifizierung von <i>Brassica napus</i> Aminosäuretransportern	107
3.4.1	<i>BnAAP1</i>	108
3.4.2	<i>BnAAP6</i>	109
3.4.3	<i>BnAAP2</i>	111
3.5	Elektrophysiologische Untersuchungen zur Substratspezifität von BnAAP1 und BnAAP6 durch funktionelle Expression in <i>Xenopus</i> Oozyten	113
3.6	Untersuchungen zur Expression von <i>BnAAP1</i> und <i>BnAAP6</i> in der Pflanze	117
3.6.1	Untersuchung einer <i>BnAAP6</i> -Promotor-Reporterfusion	117
3.6.2	Herstellung von BnAAP6-spezifischen polyklonalen Antikörpern	119

3.6.3	Expression von <i>BnAAP1</i> und <i>BnAAP6</i> in verschiedenen Blattaltersstufen	123
3.6.3.1	<i>BnAAP1</i>	123
3.6.3.2	<i>BnAAP6</i>	125
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>127</b>
4.1	Variabilität der Stickstoffeffizienz bei Winterraps	127
4.2	Subzelluläre Konzentrationen und Phloembeladung von Aminosäuren in Raps	130 134
4.3	Charakterisierung von Aminosäuretransportern aus Raps	137
4.4	Expression von <i>BnAAP1</i> und <i>BnAAP6</i> in der Pflanze	140
4.5	Expression von <i>BnAAP1</i> und <i>BnAAP6</i> während der Blattentwicklung	
4.6	Möglichkeiten zur gentechnischen Verbesserung der Stickstoffeffizienz von Raps	141 <b>146</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>149</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>152</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>172</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>172</b>
8.1	Verteilung der Markerenzyme bei der nichtwässrigen Fraktionierung	174
8.2	cDNA- und Aminosäuresequenz von <i>BnAAP1</i>	176
8.3	cDNA- und Aminosäuresequenz von <i>BnAAP6</i>	178
8.4	Nukleotidsequenz des <i>BnAAP6</i> -Promotors	180
8.5	Partielle cDNA- und Aminosäuresequenz von <i>BnAAP2</i>	181
8.6	Vektorkarten	

## 1. Einleitung

### 1.1 Stickstoff als pflanzliches Nährelement

Über die Fixierung von Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) in der Photosynthese sind Pflanzen in der Lage, ihren Bedarf an Kohlenstoff (C) aus der Luft zu decken. Die Aufnahme aller weiteren zum Aufbau organischer Substanz und zur Aufrechterhaltung ihrer biologischen Funktionen benötigten Nährelemente erfolgt dagegen fast ausschließlich über die Wurzel aus der Bodenlösung. Nach dem quantitativen Bedarf der Pflanze an diesen Elementen werden sie in Makronährelemente (in der Reihenfolge der benötigten Mengen: N, K, Ca, Mg, P, S) und Mikronährelemente (Cl, B, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) eingeteilt. Die Elemente Na, Si, und Co sind in geringen Mengen wachstumsfördernd, aber nicht (oder nur für einige Spezies) essentiell („beneficial elements“) (Marschner 1995). Stickstoff (N) ist das quantitativ bedeutendste Makronährelement und stellt in den meisten natürlichen Ökosystemen den wachstumslimitierenden Faktor dar (Ellenberg 1977, Foyer & Ferrario 1994). Dagegen sorgt in intensiv bewirtschafteten Agrarsystemen der Mensch durch hohe Gaben mineralischer Stickstoffdünger für eine weitgehende Stickstoffsättigung des pflanzlichen Stoffwechsels, um maximale Erträge zu erwirtschaften. Diese anthropogenen N-Einträge gelangen letztlich in globale Stoffkreisläufe und führen zu erheblichen Schädigungen vieler Ökosysteme, z.B. durch Nährstoffungleichgewichte (Schulze 1989), Rückgang der Biodiversität (Ellenberg 1986), Stickstoffausträge ins Grundwasser (Durka *et al.* 1994) und verstärkte Freisetzung des Treibhausgases  $\text{N}_2\text{O}$  aus Böden (Granli & Bøckman 1994).

Im Boden tritt Stickstoff hauptsächlich anorganisch als Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) und Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) auf, aber auch in organischen Verbindungen, z.B. Aminosäuren. Nitrat ist leicht löslich, wogegen Ammonium meist in gebundener Form vorliegt. Pflanzen können alle diese Stickstoff-Formen nutzen, wobei in der Regel Nitrat die hauptsächliche N-Quelle darstellt. Ammoniumaufnahme dominiert in Böden, in denen durch einen niedrigen pH-Wert oder Staunässe die Nitrifikation gehemmt ist, z.B. in Nadelwäldern, Reisfeldern und der arktischen Tundra. Die Aufnahme organischer Stickstoffverbindungen spielt wahrscheinlich nur bei Pflanzen borealer und arktischer Regionen eine quantitative Rolle in der Stickstoffversorgung (Chapin *et al.* 1993, Näsholm *et al.* 1998). Transportproteine für die Aufnahme all dieser Stickstoffverbindungen aus dem Boden wurden inzwischen charakterisiert (Williams & Miller 2001, Desimone *et al.* 2002, Glass *et al.* 2002, Liu *et al.* 2003). Neben der Aufnahme aus dem Boden sind weitere Möglichkeiten der Stickstoffbeschaffung für eine Pflanze u.a. die



Symbiose mit N<sub>2</sub> reduzierenden Bakterien (Mylona *et al.* 1995), Carnivorie (Ellison & Gotelli 2002) oder Parasitismus (Taylor & Bruns 1997).

## 1.2 Assimilation von anorganischem Stickstoff

Im pflanzlichen Organismus wird Stickstoff als Bestandteil von Aminosäuren und Proteinen, Nukleotiden und Nukleinsäuren, sowie zahlreichen Sekundärstoffwechsel-Produkten benötigt. Der überwiegend in anorganischer Form aus dem Boden aufgenommene Stickstoff muß dazu unter Energieaufwand assimiliert, d.h. reduziert und in organische Verbindungen eingebaut werden. Nitrat wird in zwei Stufen zunächst zu Ammonium reduziert. Im ersten Schritt wird Nitrat durch eine Zwei-Elektronen-Übertragung zu Nitrit reduziert. Dies geschieht im Zytoplasma durch den Enzymkomplex Nitratreduktase (NR) (Solomonson & Barber 1990). Nitrit wird danach durch die Nitritreduktase (NiR) in einer Sechs-Elektronen-Übertragung in Ammonium überführt (Siegel & Wilkerson 1989). Die benötigte Reduktionsenergie stammt in den Chloroplasten grüner Blätter aus der Lichtreaktion der Photosynthese und wird über Ferredoxin übertragen. In den Leukoplasten der Wurzel stellt der oxidative Pentosephosphatweg die benötigten Reduktionsäquivalente zur Verfügung.

Aus dem Boden aufgenommenes sowie bei der Nitratreduktion oder der Photorespiration gebildetes Ammonium (Leegood *et al.* 1995) wird durch die Enzyme Glutamin-Synthetase (GS) und Glutamat-Synthase (= Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase, GOGAT) in Aminosäuren eingebaut: Die GS synthetisiert Glutamin unter ATP-Verbrauch aus freiem Ammonium und Glutamat. Glutamat wird in der GOGAT-katalysierten Reaktion durch Übertragung einer Aminogruppe von Glutamin auf  $\alpha$ -Ketoglutarat (= Oxoglutarat) regeneriert. Insgesamt entsteht so aus je einem Molekül  $\alpha$ -Ketoglutarat und NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ein Molekül Glutamat. Dieses steht als Aminogruppen-Donor weiteren Synthesewegen zur Verfügung. Isoformen sowohl der GS als auch der GOGAT finden sich im Zytosol und in den Plastiden (Lam *et al.* 1996).

Obwohl die Assimilation von Ammonium wesentlich weniger metabolische Energie verbraucht, als die von Nitrat, ist eine N-Versorgung ausschließlich oder überwiegend mit NH<sub>4</sub><sup>+</sup> für die meisten Pflanzen problematisch. Ammonium ist bereits in geringen Konzentrationen zytotoxisch, möglicherweise weil es im Gleichgewicht mit freiem Ammoniak (NH<sub>3</sub>) steht, der als Entkoppler von Protonengradienten an Membranen wirkt (Kleiner 1981). Es wird deshalb bereits in der Wurzel assimiliert (Givan 1979) und seine Konzentration im Zytosol liegt in der Regel unter 15  $\mu$ M. Höhere Konzentrationen können in der Vakuole auftreten, wo der saure pH-Wert die Bildung von NH<sub>3</sub> verhindert (Roberts &

Pang 1992). Ausschließliche Ammonium-Ernährung führt zu einer massiven Umstellung des Kohlenhydratstoffwechsels zugunsten der Versorgung der Wurzel mit C-Skeletten, sowie Ungleichgewichten in der Versorgung mit anderen Nährstoffionen. Daraus resultieren schwere physiologische und morphologische Störungen in der Osmo- und pH-Regulation, die als "Ammonium-Syndrom" bezeichnet werden (Chaillou *et al.* 1986, Mehrer & Mohr 1989). Im Gegensatz zu Ammonium kann dagegen Nitrat sowohl in der Wurzel als auch im Sproß assimiliert und problemlos in der Vakuole gespeichert werden (Miller & Smith 1992).

Das bei der Nitratreduktion auftretende Nitrit wirkt mutagen (Desaminierung von Adenin zu Hypoxanthin und von Cytosin zu Uracil) und darf wie Ammonium nicht in der Zelle akkumulieren (Becker *et al.* 1992). Die NR stellt deshalb den langsamsten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der gesamten N-Assimilation dar. Da außerdem Nitrat als anorganische Stickstoffquelle meistens überwiegt, kann die Nitratreduktase-Aktivität (NRA) als Maß für die N-Assimilationsaktivität der Pflanze insgesamt betrachtet werden (Lee & Steward 1978). Aufgrund des hohen Energiebedarfs der Nitratreduktion (bis zu 25 % der Energieausbeute der Lichtreaktion, Champigny 1995) und der engen Kopplung von C- und N-Metabolismus über den Bedarf an Kohlenstoffgerüsten, ATP und Reduktionsäquivalenten wird die NRA sehr genau reguliert. Dies geschieht auf Ebene der Transkription, des Proteinabbaus und der reversiblen Enzyminaktivierung durch Phosphorylierung (Solomonson & Barber 1990, Kaiser & Spill 1991). Die NR wird durch Nitrat, Licht und Kohlenhydrate induziert und durch Glutamin inhibiert, die mRNA- und Proteinkonzentration sowie die Enzymaktivität zeigen diurnale Rhythmen (Solomonson & Barber 1990, Becker *et al.* 1992, Lillo 1994).

### 1.3 Ferntransport von Assimilaten und Ionen in der Pflanze

Für den Ferntransport von Nährstoffen und organischen Verbindungen besitzt die Pflanze zwei Gewebetypen, das Xylem und das Phloem, die zusammen die Leitbündel bilden. Das Xylem besteht aus toten, lignifizierten Zellen, die ein ununterbrochenes Kapillarsystem darstellen, und parenchymatischen Zellen, die für die Be- und Entladung entlang der Gefäße und die transiente Speicherung von Nährstoffen zuständig sind. Bei den Angiospermen sind die Xylemgefäße in weitlumige Tracheen und englumige Tracheiden differenziert. Die in ihnen transportierte Nährstofflösung enthält vor allem Aminosäuren und andere organische Säuren (zusammen bis zu 25 mM), sowie anorganische Ionen, bei denen  $K^+$  (ca. 25 mM),  $NO_3^-$  (bis 20 mM) und  $Ca^{2+}$  (ca. 10 mM) dominieren (Triplett *et al.* 1980). Die Ammoniumkonzentration im Xylemstrom ist sogar bei reiner  $NH_4^+$ -Ernährung stets niedrig,

bei Mais steigt sie z.B. nie signifikant über 1 mM (van Beusichem *et al.* 1988, Engels & Marschner 1993). Obwohl Aminosäuren die häufigsten Substanzen im Xylem sind (Pate *et al.* 1977, Pate 1980), ist ihre Gesamtkonzentration dennoch ca. zehnfach kleiner als im Phloem (Lam *et al.* 1995). Angetrieben wird der Xylemstrom durch die Kapillarkräfte in den Gefäßen und die Transpiration der oberirdischen Pflanzenteile, also letztlich durch die Wasserpotentialdifferenz zwischen Atmosphäre und Boden. Im Xylem ist daher nur ein aufwärts gerichteter Transport von der Wurzel in den Sproß möglich.

Im Gegensatz zum Xylem besteht das Phloem aus lebenden Zellen, in denen eine komplexe, hochkonzentrierte Lösung transportiert wird, die neben verschiedenen Kohlenhydraten (Disaccharide, Zuckeralkohole und Oligosaccharide) auch Aminosäuren und anorganische Ionen enthält (Ziegler 1975, Zimmermann & Ziegler 1975, Lohaus *et al.* 1995, Hayashi *et al.* 2000). Anders als im Xylemsaft kommen aber weder Nitrat noch Ammonium vor (Lohaus *et al.* 1995, Lohaus *et al.* 1998). Mit einem Anteil von bis zu 90 % an der Trockensubstanz des Phloemsaftes (Hocking 1980) dominiert bei weitem das Disaccharid Saccharose. Es kann im Phloemsaft Konzentrationen bis zu 1,5 M erreichen (Lohaus *et al.* 1994, 1995) und dient in den meisten Pflanzen als Haupttransportform für Photoassimilate. Die Gesamtkonzentration von Aminosäuren im Phloem liegt dagegen bei ca. 100-300 mM (Riens *et al.* 1991, Lohaus *et al.* 1994, 1995, 1998, Lohaus & Möllers 2000). Dabei sind die Konzentrationsverhältnisse der Aminosäuren untereinander im Phloem und dem umgebenden Gewebe sehr ähnlich (Riens *et al.* 1991, Winter *et al.* 1992), woraus man auf eine unspezifische Aufnahme von Aminosäuren ins Phloem schließen kann. Die häufigsten Aminosäuren sowohl im Mesophyll als auch im Phloem sind Glutamin, Glutamat und Aspartat, die deshalb oft als Transport-Aminosäuren bezeichnet werden. Die Transportgeschwindigkeit ist im Phloem für alle Substanzen etwa gleich (Housley *et al.* 1979) und beträgt bis zu 40-100 cm h<sup>-1</sup> (Fischer 1990).

Im Phloem werden außer Assimilaten auch Phytohormone (Ziegler 1975) und Makromoleküle wie Oligopeptide, Proteine und RNA transportiert (Oparka & Santa Cruz 2000). Peptide im Phloem können der Stickstoffverlagerung dienen, häufig handelt es sich aber um Wachstumsfaktoren (Stacey *et al.* 2002). Kleinen, im Phloem transportierten RNA-Spezies wird eine Rolle bei der systemischen Aktivierung der Pathogenabwehr durch RNA-Interferenz (RNAi) zugeschrieben (Systemic Acquired Resistance, Ryals *et al.* 1996). Das Phloem dient somit nicht nur dem Stoff-, sondern auch dem Signaltransport (Ruiz-Medrano *et al.* 2001). Sogar die Weiterleitung von Aktionspotentialen im Phloem wird diskutiert (Rhodes *et al.* 1996). Auch Pflanzenviren breiten sich häufig über den Phloemstrom in der Pflanze aus (Nelson & van Bel 1998, Oparka & Santa Cruz 2000).

## 1.4 Anatomie des Phloems

Im Phloem bilden die kernlosen Siebzellen das eigentliche Transportsystem. Sie sind an ihren Enden jeweils über Zellwände mit zahlreichen Plasmodesmata (Siebplatten) verbunden, so daß sie zusammen eine lange, kontinuierliche Siebröhre bilden. Jede Siebzelle steht mit ein oder mehreren Geleitzellen über spezialisierte verzweigte Plasmodesmata („Pore/Plasmodesma Units“) in enger symplastischer Verbindung. Die Geleitzelle versorgt die Siebzelle u.a. mit Proteinen, da reife Siebzellen keine Ribosomen mehr besitzen (Sjölund 1997). Sieb- und Geleitzellen entstehen jeweils durch inäquale Teilung aus derselben Phloem-Mutterzelle und bilden eine funktionale Einheit, die als Siebelement-Geleitzell-Komplex bezeichnet wird. Die Ausdifferenzierung der Siebzelle erfolgt durch eine genau regulierte partielle Autolyse, die der Apoptose ähnelt und an deren Ende die Siebzelle nur noch modifizierte Mitochondrien und Endoplasmatisches Reticulum als subzelluläre Strukturen enthält. Diese liegen zusammen mit Aggregaten von siebröhrenspezifischen Proteinen eng an der Plasmamembran an und bilden die sogenannte Parietalschicht (Oparka & Turgeon 1999, Ehlers *et al.* 2000). Im übrigen Zytoplasma bewegt sich der Phloemstrom.

Nach der Druckstromtheorie von Münch (1930) wird der Massenfluß in den Siebröhren durch ein osmotisches Potentialgefälle zwischen Be- und Entladungsorten angetrieben. Die ungewöhnliche Morphologie der Siebzellen ist dafür eine notwendige Voraussetzung: Sie können gleichzeitig einen Volumenstrom durch ihr Inneres passieren lassen und einen kontrollierten Zellturgor aufrechterhalten (van Bel 2003). Da die Richtung der Phloembewegung nach der Druckstromtheorie von den Be- und Entladungsorten abhängt, kann der Phloemstrom im Gegensatz zum Xylem in der Pflanze auch abwärts verlaufen und außerdem seine Flußrichtung im Verlaufe der Pflanzenentwicklung je nach Ressourcenverhältnissen ändern (Wright *et al.* 2003). Organe, die einen Netto-Überschuß von C- bzw. N-Assimilaten erzeugen werden als (C- oder N-) Source-Organe bezeichnet. In ihnen erfolgt die Beladung des Phloems. Organe, die einen Netto-Bedarf an Assimilaten aufweisen und Nährstoffe aus dem Phloem entladen, heißen Sink-Organe.

## 1.5 Phloem-Beladungsmechanismen

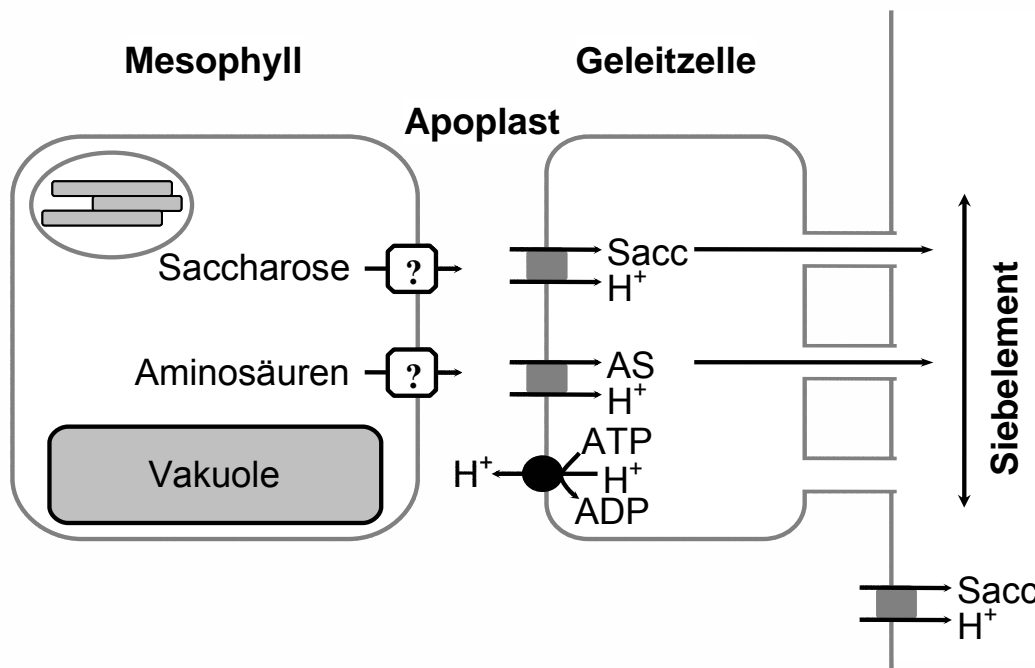
Eine Voraussetzung für den Druckstrom im Phloem ist die Anreicherung der Transportsubstanzen in den Siebröhren gegenüber dem umgebenden Gewebe, die den Aufbau eines osmotischen Potentials ermöglicht. Saccharose ist im Phloemsaft gegenüber dem Zytosol der umgebenden Mesophyllzellen ca. zehnfach höher konzentriert, Aminosäuren bis

zu dreifach höher (Riens *et al.* 1991, Lohaus & Möllers 2000). Die Siebröhren sind vom umgebenden Gewebe weitgehend symplastisch isoliert, und die Phloembeladung erfolgt hauptsächlich an den Geleitzellen. Dabei werden Pflanzen mit geschlossener und offener Phloemanatomie unterschieden.

In Pflanzen mit offener Phloemanatomie steht die Geleitzelle durch zahlreiche Plasmodesmata in engem Kontakt mit dem umgebenden Gewebe und wird als Intermediärzelle bezeichnet (Gunning & Pate 1969). Bei diesen Pflanzen können transportierte Substanzen theoretisch durch die Plasmodesmata direkt in den Siebelement-Geleitzell-Komplex gelangen, ohne den Apoplasten passieren zu müssen (symplastische Phloembeladung). Symplastische Belader transportieren neben Saccharose meist auch Oligosaccharide aus der Raffinose-Familie (Ziegler 1975), die erst in den Intermediärzellen synthetisiert werden (Holthaus & Schmitz 1991). Turgeon (1991, 1996) formulierte deshalb das „polymer-trap“ Modell, wonach die Raffinose-Oligosaccharide zu groß sind, um durch die Plasmodesmata wieder aus dem Phloem heraus zu diffundieren. Inwiefern die Ausschlußgröße der Plasmodesmata diese Annahme bestätigt, ist noch umstritten. In letzter Zeit wurden jedoch auch bei potentiell symplastischen Beladern  $H^+$ -Saccharose-Symporter im Phloem lokalisiert (Knop *et al.* 2001), die vermutlich an der Phloembeladung mit Saccharose beteiligt sind. Der Mechanismus der symplastischen Phloembeladung muß noch endgültig geklärt werden.

Bei einer geschlossenen Phloemanatomie hat auch die Geleitzelle nur wenige symplastische Verbindungen zum Mesophyll. Dies erfordert, daß die im Phloem transportierten Metaboliten zunächst aus dem Zytosol der Mesophyllzellen in den Zellwandraum (Apoplast) austreten und von dort wieder in die Geleitzelle aufgenommen werden (apoplastische Phloembeladung). Die Geleitzellen von apoplastischen Beladern können durch zahlreiche Einstülpungen der Zellwand und der anliegenden Plasmamembran ins Zytoplasma eine stark vergrößerte Oberfläche haben, die den Stoffaustausch erleichtert. Sie werden dann als Transferzellen bezeichnet (Gunning & Pate 1969). Bei der apoplastischen Phloembeladung müssen die Assimilate mindestens zwei Plasmamembranen passieren. Zumindest für die Aufnahme in die Geleitzelle sind dabei aktive Transportprozesse notwendig (Riesmeier *et al.* 1994, Koch *et al.* 2003). Die Bestimmung der Konzentrationen von Metaboliten im Apoplast ist schwierig (Lohaus *et al.* 2001). Sie sind aber insgesamt sehr niedrig und liegen für Saccharose und verschiedene Aminosäuren in der Größenordnung von <0,1 bis 5 mM (Lohaus *et al.* 1995). Der tatsächliche Konzentrationsgradient, gegen den die Phloembeladung erfolgt, ist also bis zu hundertfach höher als der Konzentrationsunterschied zwischen dem Zytosol der

Mesophyllzellen und dem Phloemsaft. Zahlreiche Transportproteine, die für diesen aktiven Transport verantwortlich sind, sind inzwischen charakterisiert worden, u.a. für Saccharose (Riesmeier *et al.* 1992, Gahrz *et al.* 1994, Sauer & Stolz 1994), Aminosäuren (Abschnitt 1.3), Mannit (Noiraud *et al.* 2001) und Sorbit (Gao *et al.* 2003).



**Abb. 1.1: Apoplastische Phloembeladung.** Im Phloem transportierte Metaboliten verlassen auf noch unbekannt Weise die Mesophyllzelle des Source-Blattes und werden von Protonensymporthern in der Plasmamembran der Geleitzelle aus dem Apoplasten aufgenommen. Der Transport wird über den von H<sup>+</sup>-ATPasen aufgebauten Protonengradienten angetrieben. Weitere Transporter entlang der Siebröhre dienen möglicherweise der Wiederaufnahme aus dem Phloem ausgetretener Metabolite.

## 1.6 Phloem-Entladung

Die Entladung des Phloems kann prinzipiell ebenfalls auf apoplastischem oder symplastischem Weg erfolgen. Verschiedene Pflanzenarten unterscheiden sich dabei u.a. in Abhängigkeit der von ihnen bevorzugt gespeicherten Kohlenhydrate (Stärke, Saccharose oder Hexosen). In den meisten Geweben scheint aber die symplastische Entladung vorzuherrschen (Lalonde *et al.* 2003). Dies lässt sich sehr elegant durch die Expression des im Phloem mobilen Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) unter der Kontrolle eines geleitzellenspezifischen Promotors visualisieren: Die Ausbreitung des grünen Fluoreszenzsignals über die Siebröhren und in die Zielorgane beweist die symplastische

Kontinuität dieses Transportweges (Imlau *et al.* 1999). Viola *et al.* (2001) fanden, daß während der Entwicklung von Kartoffelknollen ein Umschalten von anfänglicher apoplastischer zu symplastischer Entladung stattfindet. Bei einer apoplastischen Entladung des Phloems müssen die Transportmetabolite wiederum mindestens zwei Plasmamembranen passieren. Der Austritt aus den Siebröhren erfolgt mit dem Konzentrationsgefälle und muß deshalb nicht über einen aktiven Transport erfolgen. Für Saccharose wird das Konzentrationsgefälle noch dadurch verstärkt, daß Invertasen die apoplastische Konzentration permanent auf einem niedrigen Niveau halten (Sturm & Tang 1999, Roitsch *et al.* 2000). Die freigesetzten Monosaccharide können durch Hexosetransporter in die Zielzellen aufgenommen werden (Büttner & Sauer 2000). Ein vergleichbarer Mechanismus existiert für Aminosäuren nicht.

### **1.7 Verlagerung von Stickstoff in der Pflanze: Source-Sink-Verhältnisse**

Der Stickstofftransport in der Pflanze ist ein sehr komplexes Phänomen (Frommer *et al.* 1994b). Verschiedene Organe können im Verlauf der Pflanzenentwicklung zeitweise als N-Source- und zeitweise als N-Sink-Gewebe fungieren und die transportierten Metabolite variieren in Abhängigkeit von diesen Source-Sink-Verhältnissen.

Wenn Ammonium, das in der Wurzel assimiliert wird, einen großen Teil der Stickstoffversorgung ausmacht, stellt die Wurzel ein N-Source-Organ dar. Zugleich ist sie aber auch ein C-Sink und der Phloemstrom ist zur Versorgung der Wurzel mit Saccharose abwärts gerichtet. Der Export von Aminosäuren in die oberirdischen Pflanzenteile muß unter diesen Umständen im Xylem erfolgen. Bei hauptsächlichlicher Nitraternahrung überwiegt die Nitratreduktion im Sproß (Pate 1980, Andrews 1986, Schulze & Gebauer 1997) und Nitrat wird mit dem Xylemstrom aufwärts transportiert. Die Wurzel stellt dann ein C- und N-Sink-Organ dar und wird über das Phloem sowohl mit Saccharose als auch mit Aminosäuren versorgt.

Blätter sind N-Sink-Organ, solange sie noch nicht zur Photosynthese befähigt sind. Reife Blätter fungieren dagegen als N-Source, ebenso wie seneszierende Blätter und andere seneszierende Gewebe, die Proteine abbauen. Während reife Blätter hauptsächlich Aminosäuren exportieren, machen bei seneszierenden Blättern auch proteolytische Peptide einen gewissen Anteil des Stickstoff-Exports aus (Stacey *et al.* 2002, Miranda *et al.* 2003).

Reifende Samen, die die stärksten N-Sinks in der Pflanze darstellen, erhalten den größten Teil ihres Stickstoffreservoirs aus der Remobilisation von bereits zuvor aufgenommenem Stickstoff und nicht aus der Neuaufnahme über die Wurzel (Thorne 1985, Frommer *et al.*

1994b). Aminosäuren werden sowohl im Xylem als auch im Phloem in die Infloreszenz transportiert, erreichen aber nur über das Phloem den Samen. Es muß deshalb ein quantitativer Transfer vom Xylem ins Phloem erfolgen (Peoples & Gifford 1990). Bei der Keimung werden die im Samen angelegten Speicherproteine wieder abgebaut und die Keimblätter versorgen den Rest des Keimlings über das Phloem mit Stickstoff, Kohlenhydraten und anderen Nährstoffen.

Viele dieser Transportprozesse erfordern die Translokation von Aminosäuren über eine Plasmamembran, so z.B. die Aufnahme in den Zentralzylinder der Wurzel an der Endodermis, die (apoplastische) Phloembeladung und die Beladung des symplastisch von der Mutterpflanze isolierten Samens mit Stickstoff. Die dafür verantwortlichen Transportproteine sind erst seit zehn Jahren bekannt.

### **1.8 Identifizierung pflanzlicher Aminosäuretransporter**

Pflanzliche Aminosäuretransporter wurden bereits in den 1970er Jahren physiologisch untersucht. Aus der Aufnahme radioaktiv markierter Aminosäuren in Blattscheiben, abgeriebene Blattoberflächen, Protoplasten, Zellkulturen (Reinhold & Kaplan 1984) und Plasmamembran-Vesikel (Li & Bush 1991, 1992) schloß man, daß der Transport wie bei Saccharose aktiv ist und durch den Protonengradienten der Plasmamembran angetrieben wird. Es wurden komplexe mehrphasige Kinetiken beobachtet, die das Vorkommen mehrerer unabhängiger Transportsysteme belegten. So schlossen z.B. Li & Bush (1990, 1991) aus Untersuchungen an Plasmamembran-Vesikeln auf mindestens vier unterschiedliche Systeme, je eines spezifisch für saure und basische Aminosäuren, sowie ein hoch- und ein niedrigaffines System für neutrale Aminosäuren. Für die Substraterkennung bei den neutrale Aminosäuren transportierenden Systemen erwies sich die  $\alpha$ -Aminogruppe als essentiell (Li & Bush 1992).

Aufgrund der Schwierigkeiten, die mit der biochemischen Isolation relativ seltener integraler Membranproteine verbunden sind, gelang es lange Zeit nicht, die Aminosäuretransporter einzeln zu charakterisieren. Dies wurde erst auf molekularbiologischem Weg durch die Verwendung von Hefemutanten mit defizienter Aminosäure-Aufnahme möglich (Frommer & Ninnemann 1995). Durch Expression von cDNA-Banken aus Arabidopsis in solchen Hefestämmen und Selektion auf Medien mit niedrigen Konzentrationen der betreffenden Aminosäure konnten pflanzliche cDNAs identifiziert werden, die die Hefe-Transportmutanten komplementierten. Auf diese Weise identifizierten Frommer *et al.* (1993) und Hsu *et al.* (1993) unabhängig voneinander die zu mehr als 99 % identischen cDNAs von AAP1 („Amino



Acid Permease 1“) und NAT2 („Neutral Amino Acid Transport System II“). Frommer *et al.* verwendeten dazu ein Prolin- und Hsu *et al.* ein Histidin-Selektionssystem.

Durch die Hefekomplementation konnten seitdem zahlreiche weitere Aminosäuretransporter aus insgesamt 6 Genfamilien in *Arabidopsis* identifiziert werden (Frommer *et al.* 1994b, Fischer *et al.* 1998, Rentsch *et al.* 1998, Ortiz-Lopez *et al.* 2000, Wipf *et al.* 2002). Die Methode erlaubt allerdings nur die Identifizierung von Transportern, die für ihre Funktion nur eine Untereinheit benötigen und in Hefe korrekt in die Plasmamembran inseriert werden (Frommer *et al.* 1994b). Weitere potentielle Aminosäuretransporter konnten anhand ihrer Homologie mit tierischen oder Hefe-Transportern in der vollständigen Sequenz des *Arabidopsis*-Genoms (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000) identifiziert werden, ihre tatsächliche Substratspezifität ist aber in vielen Fällen noch nicht untersucht. Insgesamt enthält das *Arabidopsis*-Genom 53 (putative) Aminosäuretransporter in 9 Proteinfamilien (Tab. 1.1, Wipf *et al.* 2002). Weitere für Aminosäuren spezifische Transporter könnten sich auch unter den bisher nicht charakterisierten Mitgliedern anderer Proteinfamilien befinden, wie z.B. den ABC-Transportern (Theodoulou 2000).

**Tab. 1.1: Familien von (potentiellen) Aminosäuretransportern in *Arabidopsis*.** Im Anschluß an die Familie ist die Anzahl offener Leseraster im *Arabidopsis*-Genom in Klammern angegeben. TM: Anzahl putativer Transmembranhelices; MFS: „Major Facilitator Superfamily“; APC: „Amino Acid-Polyamine-Choline Transporter Superfamily“; ATF: „Amino Acid Transporter Family 1“. Nach Wipf *et al.* 2002 und Lam *et al.* 1998 (GLRs), Grallath *et al.* 2003 (ProTs) und Lee & Tegeder 2003 (LHT2).

Superfamilie	Familie	TM	Substrate
MFS	VGT-like (5)	8-12	?
	GLRs (7)	4	putative Glutamat-gesteuerte Calciumkanäle
APC	LATs (5)	12	?
	CATs (9)	14	basische und neutrale Aminosäuren
ATF1	<b>AAPs (8)</b>	<b>(9-) 11</b>	<b>neutrale und saure Aminosäuren (Aspartat: nur AAP6 und 8; außerdem basische Aminosäuren: nur AAP3 und 5)</b>
	LHTs (8)	9-10	Lysin und Histidin (LHT1), neutrale und saure Aminosäuren (LHT2)
	ANTs (3)	11	aromatische und neutrale Aminosäuren
	ProTs (5)	10	Betain, D- und L-Prolin, $\gamma$ -Aminobuttersäure
	AUXs (3)	10	Auxin

## 1.9 Familien von Aminosäuretransportern in Arabidopsis

Die bisher bekannten (potentiellen) Aminosäuretransporter verteilen sich auf drei Superfamilien:

(1) Zur „**Major Facilitator Superfamily**“ (MFS) gehören (1a) 5 Gene, die Homologie zu tierischen VGTs („Vesicular Glutamate Transporters“) aufweisen und (1b) eine weitere Genfamilie, die GLRs, mit Sequenzähnlichkeit zu tierischen ionotropen Glutamatrezeptoren (Lam *et al.* 1998). Keines dieser Proteine ist bisher untersucht worden (Wipf *et al.* 2002).

(2) In der „**Amino Acid-Polyamine-Choline Transporter Superfamily**“ (APC), zu der auch alle Hefe-Aminosäuretransporter gehören, finden sich zwei pflanzliche Genfamilien: (2a) Die uncharakterisierten Gene *AtLAT1* bis 5 weisen Homologien zu den Hefetransportern und zu tierischen LATs (System L-HATs [„Heteromeric Amino Acid Transporters“]) auf. Es handelt sich um Proteine mit 12 putativen Transmembrandomänen. Für den Hefetransporter GAP1 wurde diese Struktur experimentell belegt (Gilstring & Ljungdahl 2000). Die tierischen HAT-Transporter benötigen für ihre Funktion eine zweite, schwere Untereinheit, die nur eine Transmembranhelix aufweist und für die Aktivität des eigentlichen Transporters notwendig ist. Weder in Hefe noch in Pflanzen wurden Homologe dieser schweren Untereinheiten gefunden (Wipf *et al.* 2002).

(2b) Die zweite Arabidopsis-Genfamilie innerhalb der APC Superfamilie enthält den Transporter *AtCAT1* = *AtAAT1* (Frommer *et al.* 1995) und vier verwandte Gene, die den CATs (Cationic Amino Acid Transporters) aus Tieren ähneln. *CAT1/AAT1* ist ein 58 kDa Protein mit 14 putativen Transmembrandomänen und transportiert nicht-stereospezifisch ein breites Spektrum von Aminosäuren, wobei die höchste Affinität zu basischen Aminosäuren besteht. Der Transporter wird in allen Organen von Arabidopsis exprimiert, in Blättern und Wurzeln konnte die Expression auf die Leitbündel eingegrenzt werden. Wahrscheinlich ist *CAT1/AAT1* am Ferntransport, Xylem-Phloem-Transfer und der Versorgung sich entwickelnder Embryonen mit basischen Aminosäuren beteiligt.

(3) Alle übrigen in Arabidopsis identifizierten Aminosäuretransporter gehören in die **Superfamilie ATF1** („**Amino Acid Transporter Family 1**“) und sind Protonen-Symporter.

(3a) ProTs sind Transporter für Betain, L- und D-Prolin sowie  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Rentsch *et al.* 1996, Grallath *et al.* 2003). Es handelt sich um 48 kDa Proteine mit 10 putativen Transmembranhelices. ProT1 spielt eine Rolle bei der Induktion der Blütenentwicklung durch Prolin (Kavi Kishor *et al.* 1995, Rentsch *et al.* 1996). ProT2 ist im Cortex und der Epidermis der Wurzel exprimiert und wird bei Salz- und Trockenstreß stark induziert, so daß eine Funktion bei der Verteilung von Prolin als Osmoregulator („compatible solute“) angenommen

wird (Delauney & Verma 1993, Rentsch *et al.* 1996). ProT3 ist in der Epidermis von Blattunterseiten exprimiert (Grallath *et al.* 2003). Zwei weitere verwandte Transporter sind noch nicht näher untersucht (Wipf *et al.* 2002).

**(3b)** LHT1 („Lysine and Histidine Transporter 1“, Chen & Bush 1997) gehört zu einer weiteren Familie von 8 Genen (Wipf *et al.* 2002). Das 50,5 kDa Protein mit 9-10 putativen Transmembrandomänen katalysiert die Aufnahme von Lysin und Histidin in Hefezellen, hat aber nur eine geringe Affinität für Arginin. LHT1 ist ubiquitär in Arabidopsis exprimiert, besonders stark in Sink-Geweben. Der kürzlich charakterisierte Transporter LHT2 (Lee & Tegeder 2003) transportiert dagegen mit hoher Affinität neutrale und saure Aminosäuren und ist im Tapetum der Staubbeutel exprimiert.

**(3c)** Der erst 2001 identifizierte Transporter ANT1 („Aromatic and Neutral Amino Acid Transporter 1“, Chen *et al.* 2001) bildet mit 2-4 weiteren, noch nicht untersuchten Genen eine dritte Familie innerhalb der ATF1-Transporter. Das 50 kDa Protein mit 11 putativen Transmembranhelices ist in allen Organen von Arabidopsis exprimiert und transportiert neben neutralen und aromatischen Aminosäuren auch Arginin und Auxin.

**(3d)** Die als erste pflanzliche Aminosäuretransporter identifizierten AAPs sind bei weitem die am besten untersuchte Gruppe und gehören ebenfalls zur ATF1-Superfamilie. Das Arabidopsis-Genom enthält acht *AAP*-Gene, von denen 7 bisher funktionell charakterisiert und auf mRNA-Ebene in der Pflanze lokalisiert wurden (Frommer *et al.* 1993, Hsu *et al.* 1993, Kwart *et al.* 1993, Fischer *et al.* 1995, Rentsch *et al.* 1996, Hirner *et al.* 1998, Fischer *et al.* 2002, Okumoto *et al.* 2002, Wipf *et al.* 2002). Mitglieder dieser Proteinfamilie wurden auch in *Nicotiana glauca* (Lalanne *et al.* 1997), *Ricinus communis* (Bick *et al.* 1998), *Vicia faba* (Montamat *et al.* 1999, Miranda *et al.* 2001), *Nepenthes alata* (Schulze *et al.* 1999), *Pisum sativum* (Tegeder *et al.* 2000), und *Solanum tuberosum* (Koch *et al.* 2003) identifiziert. Es handelt sich um Proteine mit ca. 490 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 53 kDa und 9-11 putativen Transmembrandomänen. Für AAP1 konnte eine Tertiärstruktur mit 11 die Plasmamembran durchspannenden Helices, zytosolischem N- und extrazellulärem C-Terminus experimentell gezeigt werden (Chang & Bush 1997). Wahrscheinlich weisen auch die anderen AAPs diese Struktur auf. Die in Hefezellen und *Xenopus*-Oocyten funktionell charakterisierten Transporter AAP1-6 und AAP8 katalysieren eine pH-abhängige und durch Entkoppler oder H<sup>+</sup>-ATPase-Hemmstoffe inhibierbare Akkumulation von Aminosäuren in den betreffenden Zellen gegenüber dem Medium. Das pH-Optimum der AAPs liegt bei 5,0, was etwa der apoplastischen Protonenkonzentration entspricht (Pfanzen & Dietz 1987). Mit *AAP1*- und *AAP5*-exprimierenden *Xenopus*-Oocyten wurden detaillierte elektro-

physiologische Messungen vorgenommen (Boorer *et al.* 1996, Boorer & Fischer 1997), die zeigten, daß alle Aminosäuren unabhängig von ihrer Ladung zusammen mit einem Proton transportiert werden. Die Substrate der Transporter sind dabei die einfach positiven Kationen von Arginin und Lysin und die neutralen Zwitterionen aller anderen Aminosäuren.

Alle AAPs weisen eine breite Substratspezifität auf und transportieren die meisten proteinogenen Aminosäuren. Dabei bestehen allerdings einige signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Transportern: Nur AAP3 und AAP5 transportieren effizient basische Aminosäuren, und nur AAP6 und AAP8 besitzen eine unter physiologischen Bedingungen relevante Affinität zu Aspartat (Fischer *et al.* 2002, Okumoto *et al.* 2002). Mit Ausnahme der ProTs sind somit alle bisher bekannten pflanzlichen Aminosäuretransporter in der Lage, jeweils ein ganzes Spektrum verschiedener Aminosäuren zu transportieren, wobei die AAPs das breiteste Substratspektrum besitzen. Da die Phloembeladung von Aminosäuren unspezifisch erfolgt, sind die AAPs dafür die wahrscheinlichsten Kandidaten. Allerdings muß dabei die Konzentration der Substrate *in vivo* berücksichtigt werden. So besitzen AAP3 und AAP5 zwar eine höhere Affinität für basische Aminosäuren als für Glutamin, Glutamat und Aspartat, transportieren aber unter physiologischen Bedingungen möglicherweise doch eher diese in bis zu hundertfach höherer Konzentration auftretenden Hauptaminosäuren. Das würde erklären, warum Pflanzen zusätzlich Transporter mit relativ hoher Spezifität für basische Aminosäuren (CAT1, LHT1) und Tryptophan (ANT1) besitzen (Fischer *et al.* 2002). Bei so vielen Transportern mit überlappender Substratspezifität stellt sich auch die Frage nach möglicher Redundanz. Northern Blot-Analysen, RNA *in situ* Hybridisierungen und Promotor-GUS-Studien haben für alle AAPs ein unterschiedliches Expressionsmuster in der Pflanze gezeigt. Zusammen decken sie die wesentlichen Aminosäure-Transportvorgänge in der Pflanze ab (Rentsch *et al.* 1996). AAP1 ist wahrscheinlich an der Beladung des Samens und der Remobilisierung der Stickstoffreserven im Keimling beteiligt (Kwart *et al.* 1993, Okumoto *et al.* 2002). AAP2, AAP3 und AAP4 werden im Phloem von Source-Blättern exprimiert und dienen dort dem Aminosäure-Export. AAP2 und AAP4 spielen außerdem eine Rolle in der Wiederaufnahme von aus dem Phloem ausgetretenen Aminosäuren entlang des Transportweges im Stengel und möglicherweise beim Transfer zwischen Phloem und Xylem. AAP3-Expression in der Wurzel deutet auf eine zusätzliche Funktion dieses Transporters bei der Aufnahme von Aminosäuren aus dem Boden hin. AAP5 wird ebenfalls im Phloem von Source-Blättern, Stengeln und Blüten exprimiert. Möglicherweise ist seine Funktion der Export und Xylem-Phloem-Transfer von Glutamin (Kwart *et al.* 1993, Fischer *et al.* 1995). AAP6 ist spezifisch für Sink-Blätter und Wurzeln (Rentsch *et al.* 1996, Okumoto *et al.* 2002).

Eine Expression von AAP7 in der Pflanze konnte bisher nicht nachgewiesen werden. In Hefe exprimiert, katalysierte das Protein keinen Aminosäuretransport (Okumoto *et al.* 2002). AAP8 ist wie AAP1 für die Beladung des Samens zuständig, wobei seine höhere Affinität zu Aspartat von Bedeutung ist, das von AAP1 nur ungenügend transportiert wird (Okumoto *et al.* 2002). Für ein genaues Verständnis der Funktion einzelner Transporter ist ihre zellspezifische Lokalisation innerhalb des Phloems entscheidend (van Bel 2003). Eine Immunlokalisation gelang aber bisher für keinen einzigen pflanzlichen Aminosäuretransporter.

Für einige Gene der AAP-Familie existieren auch Daten zur Transkriptions-Regulation. So werden AAP4 und AAP6 bei Trocken- und Salzstreß herunterreguliert (Rentsch *et al.* 1996), die Expression von AAP1 und 2 wird abhängig von der Samenentwicklung gesteuert (Hirner *et al.* 1998), VfAAP1 aus *Vicia faba* ist Cystein-reprimierbar (Miranda *et al.* 2001) und beim Übergang vom Sink zum Source in Blättern wird in Arabidopsis die Expression von AtAAP6 herunter- und in Kartoffel die von StAAP1 hochreguliert (Fischer *et al.* 2002, Koch *et al.* 2003). Daten zur Regulation auf Proteinebene fehlen bisher vollkommen (Delrot *et al.* 2000), ebenso wie zur Regulation der Transporter in Abhängigkeit von der Stickstoffversorgung. Auch die Expression der AAPs während der Blattseneszenz und Remobilisation von Aminosäuren aus der Proteolyse ist noch kaum untersucht. Sakr *et al.* (1993, 1997) fanden bei seneszierenden *Beta vulgaris* Blättern eine Induktion des Aminosäure-Transports in Blattscheiben und Plasmamembran-Vesikeln, konnten dieses Ergebnis aber nicht mit molekularbiologischen Daten ergänzen.

**(3e)** Die letzte Familie innerhalb der ATF1-Superfamilie beinhaltet *AUX1* und zwei verwandte Gene. AUX1 ist kein eigentlicher Aminosäuretransporter, sondern katalysiert die Aufnahme des mit der Aminosäure Tryptophan chemisch verwandten Phytohormons Auxin in Zielzellen (Bennett *et al.* 1996).

Abgesehen von den eigentlichen Aminosäuretransportern ist auch für den Oligopeptid- und Nitrattransporter NTR1 (CHL1) aus Arabidopsis sowie für den homologen Transporter BnNTR1;2 aus Raps der Transport von Histidin beschrieben worden (Frommer *et al.* 1994a, Rentsch *et al.* 1995, Zhou *et al.* 1998). BnNTR1;2 ist das einzige bisher in Raps identifizierte Protein mit einer Aminosäure-Transportaktivität. In den Datenbanken fand sich nur der „Expressed Sequence Tag“ (EST) eines zu AtAAP6 homologen Raps-Gens (Acc. No. H07512, Sohn *et al.* 1995). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden aber von Noiraud *et al.* (2002) partielle cDNA-Sequenzen von drei zu den Arabidopsis-Transportern AAP1, AAP2 und AAP4 homologen Genen aus *B. napus* hinterlegt (Acc. No. AY188953, AY188954, AY188955).

### 1.10 Die Problematik der Stickstoffnutzung bei Raps

Raps (*Brassica napus* L.) gehört wie die molekularbiologische Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zur Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae). Die Brassicaceen sind nach morphologischen Gesichtspunkten und der Zusammensetzung ihres Phloemsaftes apoplastische Phloembelader (Haritatos *et al.* 2000b, Lohaus & Möllers 2000). Im Gegensatz zu seinem nahen Verwandten ist Raps aber mit 40-50 % Öl und 20-30 % Protein im Samen (Finlayson 1976, Uppström 1995) eine wirtschaftlich bedeutsame Nutzpflanze, die v.a. in Mitteleuropa und Asien angebaut wird. Die Samen dienen der Ölproduktion und die Preßrückstände als eiweißreiches Viehfutter. Der restliche Sproß verbleibt in der Regel als Gründünger auf dem Feld. Den Nutzungsanforderungen entsprechend ist Raps seit langem mit den Methoden der klassischen Züchtung in Hinblick auf den Öl- und Proteinertrag der Samen optimiert worden und heute werden fast ausschließlich sogenannte 00-Sorten angebaut, die frei von nahrungsunverträglicher Erucasäure und Glucosinolaten sind.

Ein bislang ungelöstes Problem beim Rapsanbau ist jedoch sein hoher Bedarf an Stickstoffdünger und die geringe Stickstoff-Nutzungseffizienz. Rapskulturen benötigen etwa 180-220 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup>, deutlich mehr als Getreidekulturen. Dabei wird der applizierte Stickstoff sogar mit höherer Effizienz aufgenommen als von anderen Nutzpflanzen (Lainé *et al.* 1993, Dejoux *et al.* 2000), aber nur etwa 30-70 % gelangen am Ende der Vegetationsperiode in die Samen (Aniol 1994, Sieling & Christen 1999). Der übrige Stickstoff verbleibt in den vegetativen Pflanzenteilen und damit letztlich in der Streu. Raps-Streu wird schnell mineralisiert, so daß es zu erheblichen N-Verlusten ins Grundwasser kommt (Dejoux *et al.* 1999, Sieling & Christen 1999, Trinsoutrot *et al.* 1999, 2000), die aus wirtschaftlicher und ökologischer Sicht unerwünscht sind.

Wie viele Pflanzen legt auch Raps zunächst in den Blättern transiente Stickstoffspeicher in Form von vegetativen Speicherproteinen an (Fernandez *et al.* 1991, Sjøhdahl *et al.* 1993) und die reifenden Samen erhalten den größten Teil ihres Stickstoffreservoirs aus der Remobilisierung dieser Reserven (Thorne 1985, Feller & Keist 1986, Aniol 1994, Frommer *et al.* 1994b). Dabei ist von besonderer Bedeutung, daß Raps anders als die meisten anderen Kulturpflanzen einen großen Teil seiner Blätter bereits während der Blüte abwirft und zum Zeitpunkt der Samenreife nahezu blattlos ist. Noch in den Blättern gebundener Stickstoff geht dabei für die Retranslokation in den Samen verloren (Aniol 1994, Schjoerring 1995). Diese Verluste können bis zu 15 % des gesamten pflanzlichen Stickstoffs ausmachen (Rossato *et al.* 2001). Die Remobilisierung von Stickstoff aus den Blättern stellt deshalb möglicherweise

einen Schlüsselprozeß dar, über dessen gentechnische Modifikation eine Verbesserung der Stickstoffeffizienz von Raps erreicht werden könnte.

### 1.11 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit ist Teil des DFG-Projekts „Verbesserung der Stickstoffeffizienz bei Raps“, in dem in einer interdisziplinären Zusammenarbeit von Pflanzenzüchtern und Molekularbiologen die Ursachen der niedrigen Stickstoff-Nutzungseffizienz bei Raps untersucht und die genotypische Variabilität dieses Merkmals quantifiziert werden sollte, um Ansätze für eine züchterische oder gentechnische Verbesserung zu liefern. Dazu wurden einerseits in groß angelegten Feldversuchen zahlreiche Rapssorten miteinander verglichen (Kessel 2000, Zhou 2000) und eine Teilaufgabe dieser Arbeit war es, einige der Versuchspflanzen physiologisch zu charakterisieren. Andererseits sollte die Remobilisierung von Stickstoff aus den Blättern genauer untersucht werden. Zwar war aus vorherigen Arbeiten innerhalb des Projekts bekannt, daß Raps Aminosäuren in hohen Konzentrationen im Phloemsaft transportiert (Lohaus & Möllers 2000), aber nicht, ob diese Aminosäuren aus seneszierenden Blättern stammen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten deshalb biochemische und molekularbiologische Methoden angewandt werden, um die Vorgänge bei der Phloembeladung von Aminosäuren in Raps detailliert zu charakterisieren. Die Verhältnisse in alten Blättern sollten dabei einen Schwerpunkt bilden.

Im Einzelnen waren die Ziele der Arbeit:

- Bestimmung der Nitratreduktaseaktivitäten und Metabolitkonzentrationen in Blättern der Rapspflanzen aus den Feldversuchen
- Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen in subzellulären Kompartimenten von Mesophyllzellen und im Apoplasten von Rapsblättern bei unterschiedlicher Stickstoffversorgung und in Abhängigkeit vom Blattalter
- Klonierung von Aminosäuretransportern mit breiter Substratspezifität (AAPs) aus Raps
- Funktionelle Charakterisierung dieser Transporter durch Expression in *Xenopus*-Oocyten
- Untersuchung der gewebe- und zellspezifischen Expression der Transporter
- Untersuchung möglicher Veränderungen der Expression der Transporter während der Blattentwicklung

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Allgemeines

Sofern nicht anders angegeben

- wurde ausschließlich zweifach destilliertes Wasser verwendet;
- entsprachen alle Chemikalien einem analytischen Reinheitsgrad und wurden von den Herstellern Carl Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim) oder Serva Electrophoresis (Darmstadt) bezogen;
- fanden alle Zentrifugationen bei Raumtemperatur (RT) und 13.000 Upm (= 16.000 x g) in einer Heraeus Biofuge Pico Zentrifuge (Bodo Schmidt, Göttingen) statt (im Folgenden als Tischzentrifuge bezeichnet);
- wurden alle Arbeiten mit sterilen Bakterien- oder Pflanzenkulturen an einer Sterilbank (Bio-II-A; Prettl Reinraumtechnik, Pfullingen) durchgeführt;
- wurden für alle Arbeiten mit isolierten Nukleinsäuren oder Sterilkulturen nur autoklavierte Pipettenspitzen, Lösungen (einschließlich H<sub>2</sub>O) und Gefäße verwendet.

### 2.2 Material

#### 2.2.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

Verwendete Rapssorten (*Brassica napus* L.):

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pflanzenzucht und Pflanzenbau der Universität Göttingen wurden die Öl-, Protein- und Aminosäuregehalte sowie Nitratreduktaseaktivitäten verschiedener doppelt haploider (DH-) Winterraps-Linien aus einer Kreuzung der Sorten Apex und Mohican bestimmt (2.3). Für molekularbiologische Untersuchungen wurden nur die Winterraps-Sorte Lirajet, sowie eingefrorenes Blattmaterial einer Kreuzung Bristol x Mansholts verwendet.

Die Anzucht aller im Labor verwendeten Winterraps-Sorten erfolgte von der Samenauslegung bis zur 8-10 wöchigen Vernalisation der Keimlinge im Institut für Pflanzenzucht und Pflanzenbau der Universität Göttingen. Vernalisierte Rapskeime wurden anschließend entweder in Komposterde weitergezogen, wenn der Status der Stickstoff-Versorgung nicht versuchsrelevant war, oder in Hydrokultur mit definiertem Nitratgehalt (0,5 oder 4 mM) überführt.



Hydrokultur-Nährlösung (Spurenelemente nach Randall & Bouma 1973):

0,1 mM	KCl	10 µM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0,7 mM	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 µM	MnSO <sub>4</sub>
0,5 mM	MgSO <sub>4</sub>	0,1 µM	ZnSO <sub>4</sub>
0,1 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2	0,2 µM	CuSO <sub>4</sub>
160 µM	FeCl <sub>3</sub>	0,017 µM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
91 µM	Na <sub>2</sub> EDTA		
0,5 mM Nitrat-Lösung:	0,25 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 2 mM CaCl <sub>2</sub>		
4 mM Nitrat-Lösung:	2 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		

Als transformierbare Modellpflanze zur Untersuchung der gewebespezifischen Promotoraktivität diente *Arabidopsis thaliana* L. (Ökotyp Columbia). *Arabidopsis* wurde ebenfalls auf Komposterde angezogen.

Die Wachstumsbedingungen für *B. napus* und *A. thaliana* sowohl im Gewächshaus als auch in Klimakammern waren 300-330 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 15 h Belichtung (Langtag) und eine Temperatur von 23 °C Tag/18 °C Nacht.

### 2.2.2 Bakterienstämme

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten und zur Vermehrung von DNA-Konstrukten wurde der *Escherichia coli* Stamm DH5α (Hanahan 1983) verwendet:

Genotyp: *supE44 ΔlacU169 ((ϕ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

Alternativ kam auch *E. coli* XL1-Blue (Bullock *et al.* 1987) zur Anwendung.

Genotyp: *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup>*  
 F' [*proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(tet<sup>r</sup>)*]

Zur Überexpression eines MBP-BnAAP6-N-Terminus Fusionsproteins (2.17.1) diente der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) (Studier & Moffat 1986).

Genotyp: *hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)*

Das BnAAP6-Protein wurde in von *E. coli* BL21 abgeleitete Rosetta-gami (DE3) pLysS Zellen (Novagen, Madison, USA) exprimiert, die eine Lyse durch wiederholtes Schockgefrieren und Auftauen bei 37 °C erlauben.

Genotyp: *ahpC\** *Δara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR araD139 galE galK rpsL F* [*lac*<sup>+</sup> (*lacI*<sup>f</sup>)*pro*] *gor522 ::Tn10 (Tc<sup>R</sup>) trxB::kan (DE3)*  
pLysSRARE (Cm<sup>R</sup>)

Zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* L. wurden zwei verschiedene *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme verwendet: GV3101 pMP90, (Charest *et al.* 1989) diente zur Transformation von Konstrukten, die auf dem Plasmid pBI101.3 basierten, EHA105 (Hood *et al.* 1993) für Plasmide auf pCAMBIA3300-Basis.

### 2.2.3 Häufig verwendete Nährmedien

LB (Lurija-Bertani)-Medium für *E. coli* Kulturen:

10 g/l Select Pepton 140 (Invitrogen, Karlsruhe)  
5 g/l Hefe Extrakt (Invitrogen, Karlsruhe)  
10 g/l NaCl  
pH 7,5 mit NaOH einstellen  
[für Agar-Platten: 15 g/l Agar (Duchefa, Haarlem, Niederlande)]  
autoklavieren

YEB-Medium für *A. tumefaciens* Kulturen:

2 g/l Hefe Extrakt (Invitrogen, Karlsruhe)  
5 g/l Lab-Lemco-Powder (Oxoid, Basingstoke, England)  
5 g/l Pepton (Casein-Hydrolysat)  
5 g/l Saccharose  
pH 7,0 mit NaOH einstellen  
[für Agar-Platten: 15 g/l Agar (Duchefa, Haarlem, Niederlande)]  
autoklavieren  
danach 2 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> (sterilfiltriert) zugeben

MS (Murashige & Skoog)-Medium für Pflanzenkulturen:

4,4 g/l MS-Salze (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

20 g/l Saccharose

pH 5,8 mit KOH einstellen

[für Agar-Platten: 15 g/l Agar (Duchefa, Haarlem, Niederlande)]

autoklavieren

Antibiotika-Zusätze:	<u>Stamm-Lsg.</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin:	100 mg/ml	100 µg/ml (1:1.000)
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml (1:1.000)
Rifampicin	10 mg/ml (in Methanol)	50 µg/ml (1:200)

#### 2.2.4 Plasmide

pGEM-T Easy	Amp <sup>R</sup>	Promega, Mannheim
pBI101.3	Km <sup>R</sup>	Jefferson <i>et al.</i> (1987)
pBF1	Amp <sup>R</sup>	W. Frommer, Tübingen; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Struck, Konstanz
pET-15b	Amp <sup>R</sup>	Novagen, Madison, USA
pCAMBIA3300	Km <sup>R</sup> , „BASTA“	CAMBIA, Canberra, Australien
pMAL-c2X	Amp <sup>R</sup>	New England Biolabs, Frankfurt

### 2.3 Feldversuch zur Untersuchung der genetischen Variabilität der Stickstoffnutzung bei Winterraps

In dieser Arbeit wurden Metabolitkonzentrationen und Enzymaktivitäten in Rapspflanzen bestimmt, die Teil eines großangelegten Feldversuchs zur Untersuchung der genetischen Variabilität der Stickstoffeffizienz bei Raps waren. Der Feldversuch wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Becker (Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität Göttingen) und kooperierenden Arbeitsgruppen im DFG-Projekt „Verbesserung der Stickstoffeffizienz bei Raps“ durchgeführt. Es wurden über mehrere Jahre jeweils unterschiedliche DH-Linien aus einer Kreuzung der Sorten Apex und Mohican unter zwei N-Düngungsstufen (0 und 240 kg N ha<sup>-1</sup> a<sup>-1</sup>) angepflanzt. Von jeder Linie und N-Düngungsstufe wurden 2 unabhängige Wiederholungen angelegt. Zusätzlich wurden auch die Elternsorten und einige weitere aus pflanzenzüchterischem Interesse ausgewählte Sorten angepflanzt. Die

Zahl der getesteten DH-Linien betrug 1999/2000 und 2000/2001 45, und 2001/2002 acht. Der genaue Aufbau des Feldversuchs und weitere daraus resultierende Ergebnisse sind u.a. in Kessel 2000 und Zhou 2000 beschrieben. Die Ernte von Blattproben erfolgte zur Zeit der Samenreife am frühen Nachmittag an regenfreien Tagen. Pro Wiederholung wurden jeweils 10 Blätter unterschiedlicher Größe, Höhe am Stengel und von verschiedenen Pflanzen gesammelt, aufeinander gelegt und einmal mit einem 2 cm-Blattausstanzer durchstoßen. Die Blattscheiben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung darin aufbewahrt. Für die Analyse wurde das Pflanzenmaterial fein gemörsert und anschließend bei -80 °C gelagert. Mit diesen Proben wurde eine Bestimmung der Nitratreduktaseaktivität sowie eine Chloroform-Methanol-Extraktion (2.4.1) mit anschließender chromatographischer Metabolitanalyse (2.5) durchgeführt.

### **2.3.1 Bestimmung der Nitratreduktaseaktivität (NRA)**

Das Meßprinzip dieses Enzymtests war die photometrische Bestimmung von Nitrit, das durch die Nitratreduktase aus Nitrat gebildet wurde (modifiziert nach Kaiser *et al.* 1992). Dabei wurde Sulfanilsäure durch salpetrige Säure diazotiert und das Diazoniumsalz mit  $\alpha$ -Naphthylamin zu einem Azofarbstoff umgesetzt, dessen Extinktion bei 535 nm photometrisch bestimmt wurde.

200 mg gefrorenes Pflanzenmaterial wurden mit 1 ml Extraktionspuffer versetzt und gründlich gevortext. In Eppendorfgefäßen wurden jeweils 940  $\mu$ l Reaktionsmix und 60  $\mu$ l Additive vorgelegt. Der Reaktionsstart erfolgte durch 200  $\mu$ l Extrakt. Von jedem Reaktionsansatz wurden nach 5, 10 und 15 min Inkubation bei 30 °C jeweils 300  $\mu$ l Aliquots entnommen und die Reaktion durch Mischen mit 100  $\mu$ l Stopmix gestoppt. Alle gestoppten Proben wurden für mindestens 15 min bei 4 °C inkubiert und dann mit 600  $\mu$ l Farbmix gemischt. Bis zu diesem Zeitpunkt fanden alle Inkubationen wegen der Lichtempfindlichkeit von Phenazinmethosulfat im Dunkeln statt. Nach der Farbmix-Zugabe erfolgte eine halb- bis mehrstündige Inkubation bei RT. Zum Schluß wurden die Proben 2 min abzentrifugiert und die Extinktion bei 535 nm gemessen (Uvikon 932; Kontron, Mailand, Italien). Die Konzentration des gebildeten Nitrit wurde anhand einer Eichgeraden von 0-15 nmol bestimmt und die NRA aus der zeitlichen Rate der Konzentrationszunahme berechnet.

Extraktionspuffer: 100 mM HEPES  
10 % (v/v) Glycerin  
1 mM EDTA  
5 mM Magnesiumacetat  
0,2 % (v/v) Triton X-100  
0,5 % (w/v) BSA  
5  $\mu$ M  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$   
1 % (w/v) PVPP  
\*5 mM DTT  
\*8  $\mu$ M FAD  
\*0,2 mM PMSF  
\*10  $\mu$ M Leupeptin  
pH 7,5 mit KOH einstellen

\* frisch zugegeben

Reaktionsmix: 100 mM HEPES  
6 mM  $\text{KNO}_3$   
6 mM EDTA  
\*5 mM DTT  
\*200  $\mu$ M FAD  
\*10 mM NADH  
\*100  $\mu$ M  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$   
\*333  $\mu$ M Leupeptin  
pH 7,5 mit KOH einstellen

\* frisch zugegeben

Stopmix: 0,6 M Zinkacetat:0,2 mM Phenazinmethosulfat (1:3), frisch angesetzt

Farbmix: 0,02 % (w/v) N-Naphthylendiamin-Dihydrochlorid:1 % (w/v) Sulfanilamid in 2 M HCl (1:1), frisch angesetzt

## **2.4 Extraktion von Metaboliten aus Pflanzengeweben**

### **2.4.1 Chloroform-Methanol-Extraktion von Blattgeweben**

Die Chloroform-Methanol-Extraktion diente zur Extraktion wasserlöslicher Metabolite aus Blättern. Bezugsgröße für die Metabolitgehalte war die eingesetzte Menge an Frischgewicht. Für die Chloroform-Methanol-Extraktion wurden ausschließlich dreifach destilliertes HPLC-Reinstwasser und damit gespülte Gefäße verwendet.

Die Proben wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert und 100-200 mg des Pulvers in ein Reagenzglas abgewogen. Nach Zugabe von 0,6 ml 20 mM HEPES/KOH pH 7,0 und 5 ml Chloroform:Methanol (1,5:3,5, v/v) wurde 2 min kräftig geschüttelt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Extraktion erfolgte durch Ausschütteln mit 3 ml H<sub>2</sub>O und anschließende Zentrifugation für 5 min bei 5.000 Upm in einer Tischzentrifuge (Hettich EBA 35; Carl Roth, Karlsruhe). Die wässrige Oberphase wurde in einen Rundkolben überführt. Nach erneuter Extraktion der Unterphase mit 2 ml H<sub>2</sub>O wurden die vereinigten Oberphasen am Rotationsverdampfer bei 34 °C bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 1 ml HPLC-Reinstwasser aufgenommen, durch 0,45 µm Nitrozellulosefilter (Sartorius, Göttingen) filtriert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

### **2.4.2 Nichtwässrige Fraktionierung**

Die Nichtwässrige Fraktionierung (Gerhardt & Heldt 1984) erlaubt es, die Konzentrationen von Metaboliten in den subzellulären Kompartimenten Zytosol, Vakuole und Chloroplast zu bestimmen. Dazu wird durch Ultraschall aufgebrochenes Pflanzenmaterial in einem Dichtegradienten fraktioniert und anschliessend in allen Fraktionen sowohl die relevante Metabolitkonzentration als auch die Aktivität von Markerenzymen für die verschiedenen Kompartimente bestimmt. Mit Hilfe eines computergestützten numerischen Analyseverfahrens (Programm Bestfit, Riens *et al.* 1991) wird anhand der Verteilung der Markerenzyme die wahrscheinlichste Zuordnung der Metabolitkonzentrationen zu den Kompartimenten errechnet. Die Verwendung ausschließlich nichtwässriger Medien verhindert, daß während der Extraktion und Fraktionierung eine enzymatische Umsetzung der Metabolite stattfindet. Es wurden ausschließlich mit HPLC-Reinstwasser gespülte, detergentfreie Gefäße verwendet.

Geerntetes Blattmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert, lyophilisiert und bis zur Verwendung in dicht schließenden Plastikboxen bei  $-80\text{ °C}$  in einem Exsikkator aufbewahrt. Alle Arbeiten wurden bei  $4\text{ °C}$  oder auf Eis durchgeführt.

Zur Herstellung des Dichtegradienten wurden drei unterschiedliche Gemische definierter Dichte aus Heptan ( $\rho_{20\text{°C}} = 0,684\text{ g cm}^{-3}$ ) und Tetrachlorethylen ( $\text{C}_2\text{Cl}_4$ ,  $\rho_{20\text{°C}} = 1,623\text{ g cm}^{-3}$ ) hergestellt. Wegen der Lichtempfindlichkeit von Tetrachlorethylen wurden die Lösungen in dunklen Flaschen bei  $4\text{ °C}$  aufbewahrt. Die tatsächliche Dichte der Gemische bei  $4\text{ °C}$  wurde jeweils vor ihrer Verwendung mit einem Pykrometer überprüft und gegebenenfalls durch Zugabe von Heptan oder  $\text{C}_2\text{Cl}_4$  nochmals eingestellt. Zur Herstellung des jeweils benötigten Gradienten wurden in einem Nitrozellulose-Ultrazentrifugenröhrchen  $0,5\text{ ml}$  Lösung mittlerer Dichte mit einem  $2\text{ ml}$ -Kissen der Lösung höchster Dichte unterschichtet. Darauf wurde mit einem Gradientenmischer der eigentliche Gradient aus ca.  $10\text{ ml}$  leichtester Dichtelösung und  $7\text{ ml}$  mittlerer Dichtelösung aufgeschichtet. Der optimale Dichtebereich für eine saubere Fraktionierung der Zellkompartimente mußte jeweils empirisch ermittelt werden, und lag im Allgemeinen zwischen  $1,2$  und  $1,6\text{ g cm}^{-3}$ .

Zur Entnahme von lyophilisiertem Probenmaterial wurden die Probeboxen möglichst nur kurz geöffnet und das entnommene Material (ca.  $2\text{-}3\text{ g}$ ) sofort in ein Reagenzglas mit  $20\text{ ml}$  Gradientenlösung der geringsten Dichte überführt, um die Aufnahme von Luftfeuchtigkeit gering zu halten. Die Probe wurde gevortext und anschließend durch Ultraschall aufgeschlossen (höchste Stufe,  $2\text{ min}$  lang je  $5\text{ sec}$  Puls und  $5\text{ sec}$  Pause,  $30\text{ sec}$  Pause,  $1$  kurzer Puls, weitere  $30\text{ sec}$  Pause,  $1\text{ min}$  lang je  $5\text{ sec}$  Puls und  $5\text{ sec}$  Pause, Sonifier B15; Branson, Genf, Schweiz). Während der Ultraschallbehandlung stand das Reagenzglas in einem mit Trockeneis gekühlten Heptan-Bad. Um eine Wasseraufnahme aus der Luft zu verhindern blieb die Probe bis zur Auftragung auf den Gradienten mit einem Gummistopfen verschlossen. Auch während der Ultraschall-Behandlung wurde ein Gummistopfen mit entsprechender Öffnung für den Ultraschallstab verwendet. Die Ultraschall-behandelte Probe wurde gevortext und auf vier  $12\text{ ml}$ -Zentrifugenröhrchen verteilt. Diese wurden mit Heptan aufgefüllt, geschüttelt und  $2\text{ min}$  bei  $3.000\text{ Upm}$  (Heraeus Megafuge 1.0; Bodo Schmidt, Göttingen) zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Heptan-Überstands wurden die Probenpellets in insgesamt  $3\text{ ml}$  Gradientenlösung geringster Dichte aufgenommen. Dazu wurde zuerst mit  $2\text{ ml}$  von einem Röhrchen ins nächste gespült und anschließend mit  $1\text{ ml}$  nachgespült. Die Probe wurde zügig durch ein  $40\text{ }\mu\text{m}$  Netz (Merck, Darmstadt) filtriert und ein  $200\text{ }\mu\text{l}$  Aliquot entnommen (Fraktion „G“ = gesamt). Das verbleibende Probenvolumen wurde notiert und vorsichtig auf den Gradienten aufgeschichtet. Anschließend erfolgte die

Fraktionierung für 120 min bei 25.000 x g. (Centrikon T-1065, Rotor HB4; Kontron, Mailand, Italien).

Nach dem Zentrifugenlauf wurden die Fraktionen nacheinander vorsichtig mit einer 2 ml-Meßpipette abgenommen und ihr Volumen notiert. Die oberste Fraktion („0“) war gelblich bis farblos, darunter folgte die klar abgegrenzte dunkelgrüne, trübe Chloroplastenfraktion („1“). Der darunter liegende hellgrüne Teil des Gradienten wurde in 4 gleichmäßigen Fraktionen abgenommen („2-4“), die unterste und letzte Fraktion („6“) war farblos. Ein eventuell vorhandenes Pellet wurde durch Vortexen in Fraktion 6 gelöst und mit aufgenommen.

0,8 ml jeder Fraktion wurde für die Enzymtests in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, die restlichen ca. 1,2 ml für die Metabolitanalysen in ein 2 ml Eppendorfgefäß. Beide Aliquots (und auch das anfänglich entnommene Aliquot „G“) wurden mit Heptan aufgefüllt und die Proben 15 min bei 11.500 Upm in einer Tischzentrifuge pellettiert. Nach dem Verwerfen des Heptan-Überstandes wurden die Proben in einem Exsikkator unter Vakuum getrocknet (mehrmals ja 10 min Anlegen des Vakuums mittels einer Wasserstrahlpumpe). Schließlich wurde der verschlossene Exsikkator mit den Proben bis zur Weiterverwendung am nächsten Tag bei 4 °C gelagert.

Nach der Trocknung am nächsten Morgen wurden die Teilproben für die Metabolitanalysen (2.5) bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren. Aus den Aliquots für die Enzymtests wurden die Proteine mit Phosphatpuffer extrahiert. Dazu wurden 500 µl Phosphatpuffer auf die Pellets gegeben, 30 sec gevortext, 1 min auf Eis inkubiert, erneut 30 sec gevortext und nochmal 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe weiterer 500 µl Phosphatpuffer und Vortexen wurden 300 µl entnommen und bei -80 °C gelagert. Diese Proben dienten später zur Bestimmung des Protein- und Chlorophyllgehaltes. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry (2.7.2), die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration ist unter 2.7.4 beschrieben. Die restlichen 700 µl wurden abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 5 min 13.000 Upm) und der Überstand mit den löslichen Proteinen für die folgenden Enzymtests abgenommen und auf Eis aufbewahrt.

Phosphatpuffer:	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5	50 mM
	EDTA	0,5 mM
	*DTT	5 µM (bei altem Blattmaterial 20 µM)

\* frisch zugegeben

Im Folgenden werden die Enzymtests für die Markerenzyme einzeln beschrieben.



#### 2.4.2.1 $\alpha$ -Mannosidase-Test (vakuolisches Markerenzym)

Die Bestimmung der  $\alpha$ -Mannosidaseaktivität erfolgte über die Umsetzung des synthetischen Substrats PNP-Mannosid (para-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Manno-Pyranosid), das in D-Mannose und *p*-Nitrophenol gespalten wird. *p*-Nitrophenol ist photometrisch bei 405 nm detektierbar.

Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung und ein Blindwert durchgeführt. Zu je 500  $\mu$ l 100 mM Citrat/KOH pH 4,5 wurden für die Doppelbestimmung je 50  $\mu$ l Probe gegeben. Der Reaktionsstart in den Proben und im Blindwert erfolgte durch 500  $\mu$ l 10 mM PNP-Mannosid. Alle Reaktionsgefäße einschließlich dem Blindwert wurden für 40-155 min bei 37 °C inkubiert, wobei die Inkubationszeit für alle Ansätze identisch war. Durch Zugabe von 500  $\mu$ l 0,8 M Borsäure/KOH pH 9,8 wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend erfolgte auch beim Blindwert die Zugabe von 50  $\mu$ l Probe. Die Reaktionsansätze wurden abzentrifugiert und im Überstand die Extinktion bei 405 nm gegen den Blindwert gemessen (Uvikon 932; Kontron, Mailand, Italien). Der Extinktionskoeffizient von *p*-Nitrophenol ist  $\epsilon = 18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.4.2.2 Saure Phosphatase-Test (vakuolisches Markerenzym)

Die saure Phosphatase stellte eine empfindlicheres vakuoläres Markerenzym als die  $\alpha$ -Mannosidase dar, dessen Aktivität alternativ gemessen werden konnte. Das Meßprinzip beruht auf der Spaltung von PNP-P (para-Nitrophenylphosphat) in *p*-Nitrophenol und Phosphat. Auch hier wurde das *p*-Nitrophenol bei 405 nm photometrisch bestimmt.

Die Durchführung verlief ähnlich dem  $\alpha$ -Mannosidase-Test: In 3 Reaktionsgefäße für Doppelproben und einen Blindwert wurden je 500  $\mu$ l 100 mM Citrat/KOH pH 5,5 vorgelegt, in die Doppelproben zusätzlich je 20  $\mu$ l Probe. Die Reaktion wurde durch 50  $\mu$ l 0,3 M PNP-P (frisch angesetzt) gestartet und nach 30-50 min Inkubation bei 37 °C durch 500  $\mu$ l 0,8 M  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{KOH}$  pH 9,8 wieder gestoppt. Alle Proben wurden exakt gleich lange inkubiert. Nach dem Reaktionsstop wurde auch in den Blindwert 20  $\mu$ l Probe pipettiert. Die Ansätze wurden 5 min abzentrifugiert und die gebildete *p*-Nitrophenolmenge wie oben beschrieben durch die Extinktion bei 405 nm bestimmt.

### 2.4.2.3 Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-Test (plastidäres Markerenzym)

Das Meßprinzip dieses Enzymtests war die Reduktion von 1,3-Bisphosphoglycerat durch die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) zu D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat unter Oxidation von NADPH zu  $\text{NADP}^+$ . Die Extinktionsabnahme bei 334 nm durch den NADPH-Verbrauch wurde gemessen. 1,3-Bisphosphoglycerat wurde erst im Reaktionsansatz durch 3-Phosphoglycerat-Kinase (3-PGK) aus 3-Phosphoglycerat (3-PGA) gebildet. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Der folgende Reaktionsansatz wurde direkt in einer Küvette vorgelegt: 580  $\mu\text{l}$  GAP-DH-Puffer, 20  $\mu\text{l}$  0,2 M DTT (frisch angesetzt), 20  $\mu\text{l}$  0,2 M ATP (frisch angesetzt), 20  $\mu\text{l}$  10 mM NADPH (frisch angesetzt), 20  $\mu\text{l}$  3-PGK (3,7 U/ $\mu\text{l}$ ) und 20  $\mu\text{l}$  Probe. In Blindwert-Küvetten wurden 600  $\mu\text{l}$  GAP-DH-Puffer und Reagenzien ohne Probe vorgelegt. Der Reaktionsstart erfolgte im Photometer durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  200 mM 3-PGA. Die Extinktionsabnahme bei 334 nm in der Probe wurde gegen den Blindwert für ca. 15 min gemessen und aus der Steigung die Enzymaktivität berechnet. Der Extinktionskoeffizient für NADPH bei 334 nm ist  $\varepsilon = 6,18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

GAP-DH-Puffer:

100 mM	HEPES
20 mM	KCl
2 mM	EDTA
30 mM	$\text{MgCl}_2$
pH 8,0 mit KOH einstellen	

### 2.4.2.4 Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Test (cytosolisches Markerenzym)

Die Bestimmung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase ( $\text{PEP}_{\text{CX}}$ )-Aktivität erfolgte über einen indirekten photometrischen Test: Phosphoenolpyruvat (PEP) wird durch die  $\text{PEP}_{\text{CX}}$  zu Oxalacetat (OA) unter Phosphat-Abspaltung carboxyliert. Das gebildete OA wurde durch Malat-Dehydrogenase (MDH) unter Verbrauch von NADH zu L-Malat reduziert. Der NADH-Verbrauch wurde durch die Messung der Differenz zwischen den Extinktionen bei 334 nm und 405 nm bestimmt.

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen für jede Probe durchgeführt. Dazu wurden direkt in Glasküvetten 600  $\mu\text{l}$  Gly-Gly-Puffer, 10  $\mu\text{l}$  20 mM NADH (frisch angesetzt), 10  $\mu\text{l}$  5 mg/ml MDH in Gly-Gly-Puffer und 70  $\mu\text{l}$  Probe vorgelegt, gevortext und 10 min bei RT inkubiert.

Danach erfolgte im Doppelwellenlängen-Photometer (ZFP 22; Sigma, Steinheim) der Reaktionsstart durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  50 mM PEP in Gly-Gly-Puffer (frisch angesetzt). Die Abnahme der Extinktion bei 334 nm gegenüber der bei 405 nm wurde für ca. 3-5 min verfolgt und aus der Steigung der NADH-Verbrauch berechnet ( $\epsilon = 6,18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Gly-Gly-Puffer:

50 mM	Glycylglycin
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
4 mM	KHCO <sub>3</sub>
pH 7,9 mit KOH einstellen	

### 2.4.3 Extraktion von Apoplastensaft (Lohaus *et al.* 2001)

Eine Beprobung des Apoplasten ist durch Infiltration des Pflanzenmaterials mit H<sub>2</sub>O-Bidest und anschließendes Auszentrifugieren der Flüssigkeit möglich. Dazu wurden frisch vom Sproß abgetrennte Blätter ohne sie zu verletzen aufgerollt und in einer 50 ml Spritze durch abwechselndes manuelles Erzeugen von Unter- und Überdruck infiltriert. Um Stoffwechsel- und Transportvorgänge zu minimieren war das Infiltrationswasser auf 4 °C vorgekühlt und die Extraktionszeit betrug höchstens 5 min. Die vollständige Füllung des Gasraumes der Blätter war durch eine deutliche Verdunkelung des Grüntones äußerlich erkennbar. Die Blattoberflächen wurden vorsichtig abgetrocknet und die infiltrierte Flüssigkeit durch Zentrifugation extrahiert. Dazu wurden die Blätter aufgerollt, in Reagenzröhrchen mit durchbohrtem Boden, unter dem ein 1,5 ml Eppendorfgefäß befestigt war, gegeben und bei 4 °C und 1.000-2.000 Upm 3-4 min zentrifugiert (Centrifuge 5810 R; Eppendorf Gerätebau, Hamburg). Dabei wurde darauf geachtet, stets eine unbeschädigte Blattkante nach unten zu orientieren, so daß die Apoplastenflüssigkeit nur durch die Stomata und nicht aus Xylem-Gefäßen an den Schnittstellen oder anderen Verletzungen austreten und somit mit Zellinhalt kontaminiert werden konnte. Ein optisches Anzeichen für eine solche Kontamination war eine Grünfärbung des Extraktes. Auch die Zentrifugationszeit und -geschwindigkeit mußten ausreichend niedrig gewählt werden, um ein Aufbrechen von Zellen im Gewebe zu vermeiden. Zellulär kontaminierte (grüngefärbte) Proben wurden nicht weiterverwendet. Die Analyse des Apoplastensaftes erfolgte durch Aminosäure-HPLC (2.5.1). Bis zur Analyse wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt. Zur Berechnung der Metabolitkonzentrationen im Apoplasten von Raps aus den Konzentrationen in der Auswaschlösung wurde folgender Verdünnungsfaktor zugrunde gelegt (Lohaus *et al.* 2001):

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{(V_{\text{Apoplast}} + V_{\text{Gasraum}})}{V_{\text{Gasraum}}} = 7$$

## 2.5 Metabolit-Messungen

Aminosäuren, Zucker, sowie organische und anorganische Ionen in den verschiedenen pflanzlichen Extrakten (aus Chloroform-Methanol-Extraktion, Apoplasten-Infiltration und nichtwässriger Fraktionierung; 2.4.1, 2.4.2 und 2.4.3) wurden durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) qualitativ und quantitativ bestimmt.

### 2.5.1 Chromatographische Bestimmung von Aminosäuren

Um eine Auftrennung an einer „Reversed Phase“ Säule und anschließende Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen, mußten die Aminosäuren zunächst mit *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) und  $\beta$ -Mercaptoethanol zu fluorophoren apolaren Indolderivaten umgesetzt werden (Riens *et al.* 1991). Die Fluoreszenzdetektion erhöht die Sensitivität des Nachweises um das zwanzigfache gegenüber der herkömmlichen Ninhydrin-Derivatisierung. Prolin ist mit dieser Methode nicht nachweisbar, da seine Iminstruktur die Reaktion mit OPA verhindert.

Derivatisierungsreagenzien:

OPA-Stock:	16 mM	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
	88 % (v/v)	Methanol
	0,1 M	Kaliumborat pH 10,4
	1,1 % (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
Arbeitslösung:	OPA-Stock 1:3 mit 1 M Kaliumborat pH 10,4 verdünnt	

OPA-Stock und Kaliumborat wurden bis zu 5 Tage lichtgeschützt aufbewahrt. Der Arbeitslösung wurden 5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt, wenn die Stocklösung älter als einen Tag war. Einige der gebildeten Aminosäurederivate waren sehr instabil (Cooper *et al.* 1984). Um dennoch reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Auftragung der Proben auf die Säule mit einem automatisch gesteuerten Probengeber (Autosampler 2157; LKB Pharmacia, Freiburg) vereinheitlicht und die Säulentemperatur (35 °C) konstant gehalten

(Säulenofen 2155; LKB Pharmacia, Freiburg). 20 µl Arbeitslösung und 20 µl Probe wurden gemischt und 1 min derivatisiert. Davon wurden 20 µl auf eine „Reversed Phase“ Säule (LiChro Cart 125-4, Supersphere 100RP 18 endcapped; Merck, Darmstadt) aufgetragen. Das Säulenmaterial bestand aus Octadecylsilicat. Um Verunreinigungen der Säule zu verhindern, wurde eine Vorsäule (Supercap ODS2; LKB Pharmacia, Freiburg) verwendet. Die gesamte Aminosäurekonzentration betrug im Derivatisierungsansatz maximal 0,5 mM.

Ein Gradient aus Acetonitril und Phosphatpuffer eluierte die Aminosäurederivate vom apolaren Säulenmaterial. Der Gradient wurde durch einen Gradientenmischer (Low Pressure Mixer; LKB Pharmacia, Freiburg) und eine Pumpe (HPLC-Pumpe 2248; LKB Pharmacia, Freiburg) erzeugt. Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad.

Elutionslösungen:

HPLC-Stockpuffer:

0,12 % (v/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$

0,05 % (w/v) EDTA

pH mit 50 % NaOH auf 7,06-7,08 einstellen

Verlauf des Gradienten:

Minute	% A	% B	% C	Flußrate (ml/min)
0	100	0	0	0,9
12	81	19	0	0,9
20	81	19	0	0,9
38	52	48	0	0,9
41	52	48	0	0,9
48	32	68	0	0,9
51	0	0	100	1,2
66	0	0	100	1,2
68	100	0	0	0,9
78	100	0	0	0,9

- A: 5 % Acetonitril in HPLC-Stockpuffer
- B: 50 % Acetonitril in HPLC-Stockpuffer
- C: 70 % Acetonitril in HPLC-Reinstwasser

Zur Anregung der Derivatisierungsprodukte wurde ein 330 nm Interferenzfilter verwendet. Die Emission des Eluats wurde bei 408 nm direkt am Säulenausgang mit einer Empfindlichkeit von 500-1.000 nA im kontinuierlichen Fluß gemessen (Fluoreszenzdetektor 2144; LKB Pharmacia, Freiburg). Jede Meßreihe erforderte eine eigene Kalibrierung, denn die Fluoreszenzintensität der Aminosäurederivate war abhängig vom Alter der Derivatisierungsreagenzien, der Fluoreszenzlampe, der Säule und sehr empfindlich gegenüber geringen pH-Wert-Änderungen. Die Kalibrierung erfolgte mit HPLC-Reinstwasser als Blindwert und drei verschiedenen Aminosäurekonzentrationen (4, 10 und 20 µM). Die Linearität der Eichgeraden wurde in einem Bereich von 1-50 µM getestet. Dem Aminosäure-Standard-Gemisch (Amino Acid Standard Solution A-2161; Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden die entsprechenden Konzentrationen an Glutamin, Asparagin, Tryptophan und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) zugesetzt, sowie  $\alpha$ -Aminobuttersäure (ABA, 16 µM) als interner Standard. Der interne Standard wurde verwendet, um mögliche Geräteungenauigkeiten der Pumpe und des automatischen Probengebers nachzuweisen. Blattextrakte und Apoplastensaftproben wurden vor der Analyse durch 0,2 µm Nitrozellulose-Filter (Schleicher & Schüll, Dassel) gefiltert und mit HPLC-Reinstwasser entsprechend verdünnt. Alle Standardgemische und Proben wurden mit 5 % (v/v) 1 M Kaliumborat pH 10,4 gepuffert. Die Pumpe, der Autosampler und die Meßsequenz wurden von einem Computerprogramm (HPLC-Manager; LKB Pharmacia, Freiburg) gesteuert und die Daten des Fluoreszenzdetektors kontinuierlich gespeichert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einem Integrationsprogramm (PeakNet 5.0; Dionex, Idstein).

### 2.5.2 Chromatographische Bestimmung von Zuckern

Die chromatographische Bestimmung von Zuckern erfolgte über ein HPLC-System mit Puls-Amperometrischer Detektion. Vor der Messung wurde die Proben durch 0,2 µm Nitrozellulose-Filter (Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert. Die Zucker wurden über eine Anionenaustauscher-Säule (CarboPac PA10; Dionex, Idstein) mit zugehöriger Vorsäule (CarboPac PA10 Guard; Dionex, Idstein) aufgetrennt und isokratisch mit 80 mM NaOH eluiert. Die Flußrate (1 ml/min) und die Elutionsdauer (30 min pro Lauf) wurden über eine Pumpe (LC-9A; Shimadzu, Duisburg) gesteuert. Das Wasser für den Elutionspuffer wurde

zuvor 20 min mit Helium entgast, um die Bildung schwerlöslichen Natriumhydrogencarbonats zu verhindern. Zum Probenauftrag stand ein automatischer Probengeber (Autosampler 2157; LKB Pharmacia, Freiburg) zur Verfügung. Die elektrochemische Detektion erfolgte über eine Dünnschicht-Amperometrische Zelle (#5040; ESA, Bedford, USA) mit einer Goldelektrode. Ein Amperometer (Coulochem II; ESA, Bedford, USA) steuerte die Spannungspulse und war für die Messung der Stromstärken erforderlich.

Puls-Modus	Spannung	Dauer	Messverzögerung
Messung	50 mV	500 ms	400 ms
Reinigung	700 mV	540 ms	
Regenerierung	-800 mV	540 ms	

Für die Stabilität der Basislinie war es notwendig, nur hochreine Substanzen und HPLC-reines Wasser zu verwenden. Die Kalibrierung erfolgte mit Zuckerkonzentrationen von 50, 100, 200 und 500  $\mu\text{M}$ . Die Eichgeraden waren in diesem Bereich linear. Die Daten wurden kontinuierlich gespeichert und mit Hilfe des Integrationsprogramms PeakNet 5.0 (Dionex, Idstein) ausgewertet.

### 2.5.3 Chromatographische Bestimmung von Ionen

Anionen und Kationen wurden über eine Ionen-HPLC (DX500; Dionex, Idstein) getrennt und über einen Leitfähigkeitsdetektor (CD20; Dionex, Idstein) quantifiziert. Zur Messung von Anionen diente eine Anionenaustauscher-Säule (IonPac AS4 und AS4a kombiniert; Dionex, Idstein), die für 20 min mit 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1,7 mM  $\text{NaHCO}_3$  eluiert wurde. Die Kationen-HPLC erfolgte über eine IonPac CS12A Kationenaustauscher-Säule (Dionex, Idstein), die für 16 min mit 15 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  eluiert wurde. Die Kalibrierung wurde für Ionenkonzentrationen zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 1 mM durchgeführt. Zur Datenauswertung diente das Integrationsprogramm PeakNet 5.0 (Dionex, Idstein).

## 2.6 Methoden zur Isolierung von Proteinen

Kleinere Mengen unfraktionierten Gesamtproteins aus verschiedenen Organismen und Zelltypen wurden für die Untersuchung in SDS-Polyacrylamidgelen (2.8.1) und Immunoblots (2.17.2) benötigt. Je nach Objekt wurden zur Isolation geeignete, einfache Aufschlußmethoden gewählt:

- Raps-Aminosäuretransporter exprimierende *Xenopus* Oocyten (2.15) wurden in Laemmli-Probenpuffer (2.8.1) mit einem Pistill zermörsert (ca. 25 Oocyten in 500 µl) und die Zelltrümmer 5 min in einer Tischzentrifuge pellettiert.
- *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen, die ein Maltose-Bindeprotein-BnAAP6-N-Terminus Fusionsprotein überexprimierten (2.17.1), wurden aus der Nährlösung abzentrifugiert, in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden auch hier 5 min abzentrifugiert.
- Zur Expression von *BnAAP6* verwendete *E. coli* Rosetta-gami (DE3) pLysS Zellen exprimieren intrazellulär Lysozym. Die Lyse der Zellen wurde durch zweimaliges Schockfrieren in flüssig-N<sub>2</sub> (Freisetzung von Lysozym durch Schädigung der Plasmamembran) und anschließendes Auftauen bei 37 °C erreicht. Zusätzlich wurde DNase I (0,1 mg/ml) zugesetzt, um genomische DNA zu hydrolysieren, die beim folgenden Pellettieren der Zellreste (5 min, Tischzentrifuge), v.a. bei höheren Zelldichten eine schleimige Konsistenz des weiterverwendeten Überstandes hervorrufen kann.
- Kleine Mengen von unfraktioniertem Gesamtprotein aus Rapsblättern wurden durch Mörsern von etwa 2 g Blattmaterial mit etwas Seesand in 5 ml 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4 erhalten. Das aufgeschlossene Material wurde in einer Tischzentrifuge 5 min abzentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

Alle Proteinproben wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.6.1 Isolierung von Plasmamembran-Proteinen aus Pflanzen

#### 2.6.1.1 Anreicherung von Plasmamembran-Proteinen in einem Zwei-Phasen System

Plasmamembran-Vesikel können in einem PEG-Dextran Zwei-Phasen System angereichert werden, in dem sich Vesikel mit innen liegender cytosolischer Membranseite („outside-out“) in der leichteren PEG-Phase verteilen, und solche mit invertierter Membranorientierung („inside-out“) in der schwereren Dextran-Phase (Robinson & Hinz 2001). Dazu wurde zuerst ein großes Volumen Zwei-Phasen-Mischung hergestellt: 75,6 g Dextran 500-Lösung + 37,8 g



PEG 3350-Lösung + 60 g PSK-Puffer + 66,6 g H<sub>2</sub>O wurden in einem Scheidetrichter gründlich gemischt und über Nacht bei 4 °C zur Phasentrennung stehen gelassen. Die untere (Dextran-) Phase wurde weiterverwendet.

Da zur Vermeidung einer Kontamination der Homogenisierungspuffer frei von stabilisierendem BSA sein muß – es wird bei der Membranprotein-Isolation nur ungenügend abgereichert – wurden alle auf die Ernte des Pflanzenmaterials folgenden Schritte ausschließlich bei 4 °C/auf Eis durchgeführt und möglichst viele zur Verfügung stehende Proteinase-Inhibitoren verwendet. Etwa 10 g frisches junges Blattmaterial wurden mit einer Rasierklinge in kleine Stücke zerschnitten und in 200 ml halbgefrorenem Homogenisationspuffer mit einem Pürierstab („waring blender“) drei mal 15 sec lang homogenisiert. Das Homogenat wurde durch zwei lagen Mull und eine Lage Miracloth (Merck Biosciences, Schwalbach) filtriert und anschließend 20 min bei 13.000 g zentrifugiert, um Zellwandbestandteile abzutrennen (10.400 Upm, Sorvall RC-5B, Rotor SS34; Du Pont, Bad Homburg). Zum Pellettieren der Mikrosomenfraktion wurde der Überstand abgenommen und auf Ultrazentrifugenröhrchen verteilt. Die Sedimentation der Mikrosomen erfolgte für 1 h bei 100.000 x g und 4 °C in der Ultrazentrifuge (28.000 Upm, Optima LE-80K, Rotor SW28; Beckman Coulter, Krefeld). Das Mikrosomenpellet wurde mittels eines Potters in 5 ml PSK-Puffer resuspendiert und ein 100 µl Aliquot für spätere Proteinbestimmungen und ATPase-Tests (2.6.1.2) entnommen.

Ein kleines Volumen Zwei-Phasen-Mischung wurde in einem SS34-Röhrchen vorgelegt: 7,5 g Dextran 500-Lösung + 3,78 g PEG 3350-Lösung + 4,75 g PSK-Puffer + 2,91 g H<sub>2</sub>O. Darauf wurde die Mikrosomenfraktion aufgetragen, das Röhrchen mit Parafilm verschlossen und gründlich geschüttelt. Es folgte eine Phasentrennung durch 5 min Zentrifugation bei 1.500 x g und 4 °C (3.650 Upm, Sorvall RC-5B, Rotor HB6; Du Pont, Bad Homburg), weiterverwendet wurde die Oberphase. Diese wurde vorsichtig abgenommen und in in einem neuen Röhrchen mit frischer Unterphase aus dem anfänglich hergestellten großen Volumen auf 24 g Gesamtgewicht verdünnt, wiederum gründlich geschüttelt und zur Phasentrennung wie oben beschrieben zentrifugiert. Es folgte ein weiteres Ausschütteln der Oberphase mit frischer Unterphase und erneute Phasentrennung. Zuletzt wurde die so erhaltene dritte Oberphase mit Waschpuffer auf 75 ml Gesamtvolumen verdünnt und die angereicherten Plasmamembran-Vesikel durch Ultrazentrifugation für 1 h bei 100.000 g und 4 °C sedimentiert (28.000 Upm, Optima LE-80K, Rotor SW28; Beckman Coulter, Krefeld). Das Pellet wurde in 1 ml Waschpuffer resuspendiert (Potter) und bei -20 °C aufbewahrt.



### 2.6.1.2 P-ATPase-Test

Die Proteingehalte der Mikrosomen- und Plasmamembran-Fraktonen wurden mit dem „DC Protein Assay“ (2.7.3; BioRad, München) und durch SDS-PAGE (2.8.1) bestimmt. Anschließend konnte die Anreicherung von Plasmamembran-Proteinen anhand der Aktivität der Vanadium-inhibierbaren P-ATPase überprüft werden. Hierzu diente eine Kombination der bei Robinson & Hinz (2001) beschriebenen P-ATPase-Nachweisreaktion mit der in derselben Quelle für einen Inosin-5-Diphosphatase-Test angegebenen photometrischen Phosphatbestimmung.

Mikrosomen wurden etwa 1:10, Plasmamembran-Vesikel etwa 1:2 verdünnt (2-5 µg Protein/10 µl) und als Doppelproben gemessen. Als Eichgerade dienten Verdünnungen von 1,25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit 0-250 nmol  $\text{PO}_4^{3-}$ /10 µl. Alle Verdünnungen und die Eichgerade wurden in Waschpuffer (2.6.1.1) angesetzt, alle Messungen wurden getrennt mit ATPase-Mix mit und ohne Vanadat durchgeführt.

- Start der Reaktion durch Zugabe von 10 µl Probe zu 90 µl ATPase-Mix +/- Vanadat
- 10 min 37 °C
- Reaktionsstop durch 500 µl kalte 10 % w/v Trichloressigsäure
- Proteinfällung bei 4 °C für mindestens 2 h
- 10 min bei 9.000 Upm
- 200 µl Überstand + 1,8 ml Farbreagenz
- 1 h 37 °C

Die Phosphatkonzentration wurde bei  $E_{820}$  gegen Waschpuffer ohne  $\text{PO}_4^{3-}$  gemessen und die P-ATPase-Aktivität aus der Differenz der gehemmten (mit Vanadat) und der Gesamt-ATPase-Aktivität (ohne Vanadat) berechnet. Der Anreicherungsfaktor wurde als Verhältnis der P-ATPase-Aktivität entweder zur Gesamt-ATPase-Aktivität berechnet.

Farbmix:

1 Anteil	3 M $\text{H}_2\text{SO}_4$
1 Anteil	2,5 % (w/v) $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
1 Anteil	10 % (w/v) Ascorbat
6 Anteile	$\text{H}_2\text{O}$

Frisch angesetzt, Reagenzien in dieser Reihenfolge gemischt.

ATPase-Mix:

	35 mM	Tris/MES pH 6,5
	5 mM	MgSO <sub>4</sub>
	55 mM	KCl
	1 mM	NaMoO <sub>4</sub>
	1 mM	NaN <sub>3</sub>
	0,05 % (v/v)	Triton X-100
	3 mM	*ATP
+/-	70 µM	*Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>

\* frisch dazugegeben

## 2.7 Quantitative Proteinbestimmung

### 2.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Eine einfache Methode zur Bestimmung des Gehalts an löslichem Protein nutzt nach Bradford (1976) die Färbung von Proteinen durch Coomassie Brilliant Blue zur Mengenabschätzung. 50 µl Probe (Proteingehalt zwischen 5 und 10 µg) wurden mit 1 ml Farbmix versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegen gleich behandelten Probenpuffer gemessen (Uvikon 932; Kontron, Mailand, Italien). Die Proteinmenge wurde anhand einer Eichreihe von 0 bis 15 µg aus entfettetem BSA bestimmt. Die Eichreihe wurde jeweils nur einmal für frisch angesetzten Farbmix hergestellt, da das Farbreagenz über längere Zeit stabil war. Die Bradford-Methode wird durch SDS gestört, nicht jedoch durch β-Mercaptoethanol.

Farbmix:

Lösung 1:	600	ml	H <sub>2</sub> O
	100	ml	85 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

Lösung 2: 70 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml 99,6 % Ethanol

Lösungen 1 und 2 mischen, ad 1.000 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

Der Farbmix wurde lichtgeschützt aufbewahrt.

### 2.7.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Für die Proteinquantifizierung nach Lowry *et al.* (1951) muß im Gegensatz zur Bradford-Methode für jede Messung eine neue Eichreihe hergestellt werden.  $\beta$ -Mercaptoethanol stört die Messung, aber nicht SDS. Der Proteingehalt in Proben aus Chloroform-Methanol-Extraktion (2.4.1) und nichtwässriger Fraktionierung (2.4.2) wurde mit dieser Methode bestimmt. Für jede Proteinbestimmung wurde jeweils frischer Farbmix aus den Stammlösungen angesetzt und eine Eichreihe aus 0-36  $\mu\text{g}$  entfettetem BSA hergestellt.

Farbmix-Stammlösungen:

Lösung A:	2 % (w/v)	Natriumcarbonat in 0,1 M NaOH
Lösung B:	1 % (w/v)	CuSO <sub>4</sub>
Lösung C:	2 % (w/v)	Natrium-Kalium-Tartrat

Mischungsverhältnis A:B:C = 99:0,5:0,5

700  $\mu\text{l}$  Farbmix und 150  $\mu\text{l}$  Probe wurden gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Folin-Chiocalteus-Phenolreagenz (1:3 mit H<sub>2</sub>O frisch verdünnt; Merck, Darmstadt), sofortiges Vortexen der Probe und eine weitere Inkubation für 15 min bei RT. Die Extinktion wurde bei 578 nm gegen gleichbehandelten Probenpuffer gemessen (Uvikon 932; Kontron, Mailand, Italien) und die Proteinkonzentration anhand der Eichreihe bestimmt.

### 2.7.3 Proteinbestimmung mit dem „D<sub>C</sub> Protein Assay“

Der D<sub>C</sub> Protein Assay der Firma BioRad (München) basiert auf der Proteinbestimmungsmethode nach Lowry, ermöglicht aber eine beschleunigte Durchführung und ergibt einen länger stabilen farbigen Komplex. Wie bei der Lowry-Methode stört  $\beta$ -Mercaptoethanol die Messung, aber nicht SDS, Tween, oder Triton X-100. Mit dem D<sub>C</sub> Protein Assay wurde die Proteinmenge in Plasmamembranfraktionen (2.6.1) und Lysaten von *E. coli* Zellen und *Xenopus* Oocyten (2.6) bestimmt.

Vor Beginn der Messung wurde jeweils Arbeitslösung A' aus 20  $\mu\text{l}$  Lösung S und 1 ml Lösung A frisch angesetzt (Lösung S konnte bei detergentfreien Proben weggelassen werden). 25  $\mu\text{l}$  Probe wurden mit 125  $\mu\text{l}$  Arbeitslösung A' gevortext. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Lösung B, sofortiges Vortexen und eine Inkubation für 15 min bei RT. Lösung A entspricht der alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung, Lösung B dem Folin-Reagenz

der Lowry-Methode. Die Extinktion der Proben wurde bei 750 nm gegen gleichbehandelten Probenpuffer gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichreihe von 0,2 bis 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  entfettetem BSA in Probenpuffer ermittelt.

#### **2.7.4 Chlorophyllbestimmung**

Der Chlorophyllgehalt der Proben aus Chloroform-Methanol-Extraktion (2.4.1) und nichtwässriger Fraktionierung (2.4.2) wurde nach Arnon (1949) gemessen. Bei der Chloroform-Methanol-Extraktion wurden die Unterphasen verwendet, bei der nichtwässrigen Fraktionierung das lyophyllisierte Pflanzenpulver, das durch Ultraschall (12 x je 5 sec Puls und 25 sec Pause, Sonifier B15; Branson, Genf, Schweiz) in 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT homogenisiert und durch ein 40  $\mu\text{m}$  Netz (Merck, Darmstadt) filtriert wurde. Die Probe wurde mit 99,6 % Ethanol auf 1 ml aufgefüllt, geschüttelt und 5 min abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Die Extinktion des jeweiligen Überstandes wurde bei 652 nm gemessen (Uvikon 932; Kontron, Mailand, Italien). Der Extinktionskoeffizient von Chlorophyll in Ethanol bei 652 nm ist  $\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen**

#### **2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Bei der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) werden Proteine durch die Einlagerung von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) linearisiert und mit einer einheitlichen, negativen Oberflächenladung versehen. Dies erlaubt in der Gelelektrophorese eine Auftrennung, die nur durch das Molekulargewicht und nicht die Tertiärstruktur oder Eigenladung der Proteine bestimmt ist. Die Proteinproben wurden zunächst mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, entweder durch Verdünnung mindestens im Verhältnis 1:2 mit 1 x Probenpuffer, oder durch Zugabe von 5 x Probenpuffer und Auffüllen ad 1 x Puffer mit  $\text{H}_2\text{O}$ . Durch Aufkochen für 3-5 min bei 95 °C wurden die Proteine solubilisiert und denaturiert. Membranproteinproben wurden wegen ihrer größeren Empfindlichkeit nur bei 65 °C denaturiert (Sauer & Stolz 2000). Anschließend wurde zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert.

Laemmli-Probenpuffer: 15 mM Tris/HCl pH 6,8  
 5 % (w/v) SDS  
 2 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 20 % (v/v) Glycerin  
 0,01 % (v/v) Bromphenolblau

Die Polyacrylamidgele enthielten 12,5 % (w/v) Acrylamid im Trenngel und wurden in Mini Protean 3-Kammern (BioRad, München) gegossen. Die Gele waren 0,75 mm dick, die Länge des Sammelgels betrug ca. 0,8 cm und die Länge des Trenngels 5 cm. Für präparative Gele standen größere, selbstkonstruierte Gelkammern zur Verfügung, in den 1 mm dicke Gele mit ca. 0,8 cm langem Sammel- und 7 cm langem Trenngel gegossen wurden. Für diese Gele mußte jeweils das Vierfache des unten angegebenen Ansatzes eingesetzt werden.

Sammelgel:		Trenngel:	
0,13 M	Tris/HCl pH 6,8	0,38 M	Tris/HCl pH 8,8
0,1 % (w/v)	SDS	0,1 % (w/v)	SDS
4,6 % (w/v)	Acrylamid	12,5 % (w/v)	Acrylamid
0,12 % (w/v)	N,N-Methylenbisacrylamid	0,33 % (w/v)	N,N-Methylenbisacrylamid
0,06 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat	0,05 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat

Für ein Gel wurden folgende Komponenten gemischt:

	Trenngel	Sammelgel
Lower Gel Stock	1,12 ml	-
Upper Gel Stock	-	0,5 ml
Acrylamid Stock	1,88 ml	0,32 ml
H <sub>2</sub> O	1,5 ml	1,18 ml
APS	1,75 $\mu$ l	2 $\mu$ l
TEMED (Start der Polymerisation)	6,9 $\mu$ l	4 $\mu$ l

Lower Gel Stock: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8  
 0,4 % (w/v) SDS

Upper Gel Stock: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8  
 0,4 % (w/v) SDS

Acrylamid Stock:	30 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	N,N-Methylenbisacrylamid
APS:	10 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
TEMED:	100 %	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

Es wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet, um Luftblasenbildung zu verhindern und eine gerade Geloberfläche zu erzeugen. Nach der Auspolymerisation (ca. 30 min) wurde das Isobutanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Die Polymerisationsdauer betrug ebenfalls etwa 30 min. Im Anschluß daran wurde das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und diese mit Laufpuffer befüllt. Pro Geltasche konnten bis zu 20 µl Probe mit einer Mikroliterspritze (Microliter #702; Hamilton, Bonaduz, Schweiz) auf das Gel geladen werden. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 25 min bei 15 mA pro Gel, dann für weitere ca. 30 min bei 25 mA pro Gel bis der Bromphenolblau-Marker das Ende des Trenngels erreichte. Spannung und Leistung des Spannungsgerätes (Consort E 865; Scie-Plas, Southam, England) wurden dabei auf die maximalen Werte eingestellt. Zur Größenbestimmung wurde ein „Protein Molecular Weight Marker“ (MBI, Vilnius, Litauen) mit Markerproteinen von 18,4-116 kDa verwendet.

Laufpuffer:	50 mM	Tris/HCl (pH nicht eingestellt)
	380 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS

Proteine im Größenstandard:

β-Galactosidase	116	kDa
BSA	66,2	kDa
Ovalbumin	45	kDa
Lactat-Dehydrogenase	35	kDa
RE <i>Bsp98I</i>	25	kDa
β-Lactoglobulin	18,4	kDa
Lysozym	14,4	kDa



Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden durch eines von mehreren im Folgenden dargestellten Färbeverfahren sichtbar gemacht oder zur immunologischen Detektion auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (2.17.2).

### 2.8.2 Coomassie-Färbung

Für eine Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen muß die aufgetragene Proteinmenge ca. 2-20 µg betragen. Das Gel wurde für mindestens 30 min in Färbelösung fixiert und angefärbt. Anschließend wurde mehrmals für 15 min in Entfärber entfärbt, bis der Gelhintergrund nahezu farblos war. Das entfärbte Gel konnte dann für lange Zeit in H<sub>2</sub>O gelagert werden.

Färbelösung:	40 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,25 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G-250

Entfärber:	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

### 2.8.3 Silverstain-Färbung

Die Silverstain-Färbung (Blum *et al.* 1987) von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen ist etwa 10-100fach empfindlicher als die Coomassie-Färbung, so daß noch Proteinmengen bis zu 10 ng detektierbar sind.

Silbernitrat reagiert mit Proteinseitengruppen nichtstöchiometrisch unter sauren Bedingungen und wird anschließend durch Formaldehyd unter alkalischen Bedingungen zu metallischem Silber reduziert. Die bei der Silverstain-Färbung reaktiven Gruppen der Proteine sind freie Amino- und Sulfhydrylgruppen. Daraus folgt, daß die Intensität der Färbung von der Aminosäuresequenz des Proteins abhängt und bei basischen Proteinen am größten ist. Die Färbung wurde auf einem Horizontalschüttler (Unimax 1010; Heidolph, Schwabach) wie folgt durchgeführt:

1. Fixierung: 90 min bis über Nacht  
Fixierer: 50 % (v/v) Ethanol  
12 % (v/v) Essigsäure  
0,05 % (v/v) 37 % Formaldehyd
2. Waschen: 3 x 20 min  
50 % (v/v) Ethanol
3. Imprägnierung: 1 min  
0,01 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
4. Waschen: 3 x 20 sec  
 $\text{H}_2\text{O}$
5. Färbung: 20 min  
Färbelösung: 0,1 % (w/v)  $\text{AgNO}_3$   
0,075 % (v/v) 37 % Formaldehyd
6. Waschen: 2 x 20 sec  
 $\text{H}_2\text{O}$
7. Entwicklung: 1-2 min\*  
Entwickler: 3 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
0,05 % (v/v) 37 % Formaldehyd  
0,2 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
8. Abstoppen: 10 min  
10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$
9. Lagerung:  $\text{H}_2\text{O}$

\* Die tatsächliche Färbedauer war vom Erscheinen der Proteinbanden im Gel abhängig, wobei beachtet werden mußte, daß das Gel beim Abstoppen noch weiter nachfärbte.

### 2.8.4 KCl-Färbung und Elution von Proteinen aus präparativen SDS-Gelen

Die KCl-Färbung (Prussak *et al.* 1989) von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen ist noch weniger sensitiv als die Coomassie-Färbung, im Gegensatz zu dieser und der Silverstain-Färbung läßt sich aber das Färbemittel hinterher mühelos wieder entfernen. Deshalb wurde diese Methode angewandt, um in *E. coli* überexprimiertes und in großen Mengen in präparativen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrenntes Maltose-Bindeprotein-BnAAP6-N-Terminus Fusionsprotein (2.17.1) zum Ausschneiden der Proteinbande sichtbar zu machen. Das Gel wurde dazu 5 min bei 4 °C in 250 mM KCl gelegt und anschließend für 15 min in

eiskaltes Wasser. Die Proteine wurden dabei als milchigweiße Banden sichtbar. Zum Ausschneiden der gewünschten Bande wurde ein schwarzer Hintergrund verwendet.

Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden mit einer Rasierklinge auf einer Glasplatte zerkleinert und anschließend durch ein auf eine aufgeschnittene 20 ml-Spritze aufgeschmolzenes Sieb gepresst. Der Gelbrei wurde über Nacht bei 4 °C in H<sub>2</sub>O geschüttelt und die Gelreste anschließend entfernt, indem die Lösung durch vier Lagen Baumwolltaschentuch zentrifugiert wurde. Zuletzt wurde die Proteinlösung in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac Concentrator; Bachhofer, Reutlingen) auf 1 ml eingengt. Sie konnte direkt zur Immunisierung von Kaninchen verwendet werden (2.17.1).

## **2.9 Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren**

### **2.9.1 Isolation von RNA**

#### 2.9.1.1 Mini-Präparation pflanzlicher Gesamt-RNA

Bei wenig polysaccharidhaltigem Pflanzenmaterial (*Arabidopsis*) oder geringem RNA-Bedarf (RT-PCR, 2.12, 2.13) kamen zur RNA-Isolation verschiedene kommerziell erhältliche Kits zur Anwendung, wobei je nach Ausgangsmaterial der am besten geeignete empirisch ermittelt werden mußte. Verwendet wurden der „Invisorb Spin Plant-RNA Mini Kit“ (Invitex, Berlin) sowie „peqGOLD RNAPure“ und „peqGOLD OptiPure“ Lösungen (PeqLab, Erlangen). Der Invisorb Kit diente auch zur nachträglichen weiteren Aufreinigung von RNA-Proben.

#### 2.9.1.2 Extraktion großer Mengen pflanzlicher Gesamt-RNA

Für die Isolation großer Mengen RNA aus polysaccharidreichem Rapsgewebe für Northern Blots (2.11.2) wurde eine kombinierte Phenol- und Guanidinium-RNA-Extraktion mit einer „peqGOLD OptiPure“ Reinigung (PeqLab, Erlangen) kombiniert. Dazu wurden ca. 300 mg Pflanzenmaterial mit einer Spatelspitze Polyclar AT unter flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Nach dem Verdampfen des Stickstoffs wurde das noch gefrorene Pflanzenpulver in 6 ml Extraktionslösung überführt und unter Vortexen aufgetaut. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurden Zelltrümmer, genomische DNA und Polyclar AT 10 min bei 10.000 x g und 4 °C abzentrifugiert (Sorvall RC-5B, Rotor SS-34; Du Pont, Bad Homburg). Der Überstand wurde mit 1,2 ml Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und 2-3 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurde 15 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und zur RNA-Fällung mit 3 ml Isopropanol und 3

ml 0,8 M Natriumcitrat/1,2 M NaCl versetzt. Nach dem Durchmischen durch Invertieren erfolgte eine 10 min Inkubation bei RT und das Pellettieren der RNA für 10 min bei 10.000 g und 4 °C. Das Pellet wurde mit 5 ml 75 % Ethanol gewaschen und nochmal 5 min bei 10.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Ethanol-Überstandes, wurde das Pellet in 600 µl OptiPure (200 µl je 100 mg Ausgangsmaterial) durch kräftiges Vortexen aufgeschwemmt. Dabei gehen Polysaccharide und Polyphenole in Lösung, während das RNA-Pellet unlöslich bleibt. Die OptiPure-Lösung wurde mit dem RNA-Pellet in ein Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 3.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 µl 0,5 % (w/v) SDS pH 7,0 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde erneut geschüttelt und 5 min bei 3.000 g zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und die RNA mit 1 Volumen Isopropanol und 0,2 Vol. 2 M Natriumacetat pH 5 (Endkonzentration 0,2 M) gefällt (15 min 16.000 g). Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 100-200 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (2.10.1) und Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt (2.9.6)

Extraktionslösung: 38 % (v/v) Roti-Phenol (Carl Roth, Karlsruhe)  
20 % (v/v) 4 M Guanidiniumthiocyanat  
10 % (v/v) 4 M Ammoniumthiocyanat  
3,34 % (v/v) 3 M Natriumacetat pH 5,0  
5 % (v/v) Glycerin

### 2.9.2 Isolation genomischer pflanzlicher DNA

Zur Isolation großer Mengen intakter genomischer DNA für die Herstellung einer „Genome-Walking“ Bibliothek (2.13.5.1) wurde eine modifizierte Hexadecyltrimethyl-Ammoniumbromid- (CTAB-) Methode nach Rogers & Bendich (1988) angewandt. Ca. 10 g gewaschene, frische junge Blätter ohne Mittelrippen wurden unter Zugabe einer Spatelspitze Polyclar AT (Serva Electrophoresis, Darmstadt) in flüssig-N<sub>2</sub> sorgfältig gemörsert. Das Pulver wurde mitsamt dem N<sub>2</sub> in ein 250 ml-Gefäß überführt und nach dem Verdampfen des Stickstoffs in 10 ml 65 °C warmem 2 x CTAB-Puffer aufgenommen. Wenn die Suspension zu dickflüssig war, wurde entsprechend mehr Puffer zugegeben. Nach Zusatz von 100 µg/ml Proteinase K erfolgte eine einstündige Inkubation bei 65 °C im Wasserbad unter gelegentlichem Schütteln.

Die Lösung wurde zu gleichen Teilen auf vier Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und das Gefäß mit 10 ml Chloroform ausgespült, die anschließend ebenfalls gleichmäßig auf die

Zentrifugenröhrchen aufgeteilt wurden. Durch kurzes Vortexen der Röhrchen erfolgte eine Chloroformextraktion, anschliessend wurde zur Phasentrennung 20 min bei 12.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Die wässrigen Oberphasen wurden in frische Zentrifugenröhrchen überführt und mit jeweils 0,1 Vol. 10 % CTAB-Lösung versetzt. Anschließend erfolgte eine erneute Extraktion mit 1 Vol. Chloroform und Phasentrennung für 20 min bei 12.000 Upm und 4 °C. Die wässrigen Oberphasen wurden abgenommen und zu je 1 ml auf 2 ml Eppendorfgefäße verteilt. Der CTAB-DNA Komplex wurde durch Zugabe von je 1 ml CTAB-Präzipitationspuffer und 10 min Zentrifugation bei 13.000 Upm und RT pelletiert. Die Sedimente wurden in je 200 µl Hochsalz-TE-Puffer 10 min bei 65 °C resuspendiert. Zur Fällung der DNA wurden je 2 Vol. (400 µl) kalter 99,6 % Ethanol zugefügt und 1 h bei -20 °C inkubiert. Es folgte eine 25 min Zentrifugation bei 13.000 Upm und das Waschen des DNA-Pellets mit 150 µl 75 % Ethanol. Die Pellets wurden bei RT getrocknet und über Nacht bei 4 °C in je 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Zuletzt wurden alle Aliquots vereinigt und die DNA nochmal durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung (2.9.4, 2.9.5) gereinigt.

2 x CTAB-Puffer:	100 mM	Tris/HCl pH 8,0
	2 % (w/v)	CTAB
	20 mM	EDTA
	1,4 M	NaCl
	1 % (w/v)	PVP

10 % CTAB-Lösung:	10 % (w/v)	CTAB
	0,7 M	NaCl

CTAB-Präzipitationspuffer:

	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 % (w/v)	CTAB
	1 mM	EDTA

Hochsalz-TE-Puffer:	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA
	1 M	NaCl

Alle Lösungen wurden autoklaviert.

### 2.9.3 Isolation bakterieller Plasmid-DNA

#### 2.9.3.1 Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli*

Zur Kontrolle potentiell positiver Kolonien auf Transformationsplatten (2.14.6) wurden von diesen mit einem sterilen Zahnstocher jeweils 3 ml LB-Flüssigmedium mit einem entsprechenden Antibiotikum (2.2.3) angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Reagenzglasschüttler inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkulturen wurden auf zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt und die Zellen 1 min bei 13.000 Upm pelletiert. Der Mediums-Überstand wurde dekantiert und eine Probe zunächst bei -20 °C gelagert. Aus dem zweiten Bakterienpellet wurde Plasmid-DNA mittels des „Triton-Boiling“-Protokolls isoliert:

Das Bakterienpellet wurde in 150 µl kaltem STEL-Puffer resuspendiert und die Zellen 30 sec bei 100 °C lysiert. Durch anschließende Zentrifugation für 20 min bei 13.000 Upm bildeten die Zellüberreste (inklusive genomischer DNA) ein zähes Pellet, das mit einem sterilen Zahnstocher entfernt wurde. Durch Zugabe von 180 µl Isopropanol und 5 minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde die im Überstand befindliche Plasmid-DNA gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 75 % Ethanol gewaschen und nochmals 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde die DNA 5 min bei 37 °C getrocknet und danach in 50 µl 0,2 mg/ml RNaseA resuspendiert und 15 min bei 37 °C inkubiert. 6 µl der Plasmid-Präparation wurden für einen Restriktionsanalyse eingesetzt (2.14.1). Alternativ wurde zusammen mit der Übernachtskultur mit demselben sterilen Zahnstocher auch eine PCR-Probe angeimpft und die Kolonie über Kolonie-PCR (2.13.3) überprüft.

STEL-Puffer:	50 mM	Tris/HCl pH 8.0
	8 % w/v	Saccharose
	5 % v/v	Triton X-100
	50 mM	EDTA
	0,5 mg/ml	Lysozym

Sofern ein durch Restriktionsanalyse oder Kolonie-PCR als positiv identifizierter Klon zusätzlich ansequenziert werden sollte, war die Reinheit der „Triton-Boiling“ Plasmid-Präparation nicht ausreichend. Aus dem zuvor eingefrorenen zweiten Bakterienpellet wurde dann Plasmid-DNA mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert, wobei die DNA statt mit dem beigefügten Salzpuffer mit H<sub>2</sub>O

eluiert wurde. Der Kit basiert auf der Birnboim-Methode (Birnboim & Doly 1979), bei der die Zellen alkalisch lysiert werden, so daß genomische DNA denaturiert, während die superspiralisierte Plasmid-DNA intakt bleibt. Bei der folgenden Neutralisation verklumpt die genomische DNA mit den übrigen Zelltrümmern, Plasmide bleiben im Überstand.

#### 2.9.3.2 Plasmid-Maxi-Präparation aus *E. coli*

Um größere Mengen sauberer Plasmid-DNA für präparative Restriktion, *in vitro*-Translation (2.15) o.ä. zu erhalten, wurden von einer Bakterienkolonie 50 ml LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum (2.2.3) angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die gewachsene Kultur wurde auf 4 sterile 12,5 ml Schraubdeckelröhrchen aufgeteilt und die Zellen 10 min bei 4.500 Upm pelletiert. Zur Plasmid-Präparation diente der „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II“ (PeqLab, Erlangen). Die DNA wurde mit 120 µl H<sub>2</sub>O in zwei Zentrifugationsschritten (80 µl + 40 µl) eluiert.

#### 2.9.3.3 Plasmid-Mini-Präparation aus *Agrobacterium tumefaciens*

Um die Transformation von Agrobakterien (2.14.8) zu überprüfen, mußten aus diesen die Plasmide reisoliert und anschliessend nochmals in *E. coli* transformiert (2.14.6) und dort vermehrt werden, da die DNA-Ausbeute aus *Agrobacterium* Plasmid-Präparationen i.d.R. zu gering für eine Sequenzierung ist. Zur Plasmid-Isolation aus *A. tumefaciens* wurde ein modifiziertes Protokoll nach Le Gouill *et al.* (1994) verwendet.

Eine 3 ml-Übernachtskultur der gewünschten Agrobakterien-Kolonie wurde in YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (2.2.3) angezogen, auf zwei 1,5 ml Eppendorfgläser verteilt und die Zellen 1 min bei 13.000 Upm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung II wurden die Zellen lysiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform und eine 5 minütige Inkubation bei RT. Zuletzt wurden 150 µl Lösung III hinzugefügt, gevortext und 10 min bei 13.000 Upm zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere wässrige Phase mit der Plasmid-DNA wurde abgenommen, mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (2.9.5) versetzt, erneut gevortext und zur Phasentrennung 10 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die DNA mit 2 Vol. kaltem 99,6 % Ethanol gefällt. Nach einer 5 min Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde das DNA-Pellet mit 150 µl 75 % Ethanol gewaschen, erneut 5 min abzentrifugiert, ca. 15 min bei RT getrocknet und dann in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsanalyse (2.14.1) oder PCR (2.13.2) überprüft und

gegebenenfalls zur Retransformation von *E. coli* eingesetzt, wenn eine Sequenzierung erwünscht war.

Lösung I:	25 mM	Tris/HCl pH 8,0
	50 mM	Glukose
	10 mM	EDTA
Lösung II:	0,2 M	NaOH
	1 % (w/v)	SDS
Lösung III:	3 M	Kaliumacetat pH 4,8

Alle Lösungen wurden autoklaviert.

#### **2.9.4 Ethanolfällung von DNA oder RNA**

Zur Aufkonzentrierung von Nukleinsäurelösungen wurde eine Fällung der DNA oder RNA durchgeführt. Hierzu wurden 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat pH 6,0 und 2,5 Vol. 99,6 % Ethanol zugegeben und die Nukleinsäuren bei -20 °C für mindestens eine Stunde gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (5 min 13.000 Upm), etwa 15 min bei 37 °C getrocknet und in einem geringeren Volumen H<sub>2</sub>O oder Puffer resuspendiert.

#### **2.9.5 Phenol/Chloroform-Reinigung von DNA oder RNA**

Um DNA- oder RNA-Lösungen von Protein- oder Polysaccharid-Rückständen zu reinigen wurde die Lösung mit 1 Vol. Phenol:Chloroform (1:1) versetzt, gevortext und zur Phasentrennung für 5 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Denaturierte Proteine sammeln sich dabei an der Phasengrenze. Dieser Arbeitsschritt wurde je nach Bedarf 1-3 mal wiederholt. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und mit 1 Vol. Chloroform gründlich gemischt. Zur Phasentrennung wurde wiederum für 5 min zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt (2.9.4.).

Herstellung von Phenol:Chloroform (1:1): 100 g Phenol wurden in 100 ml 100 mM Tris/HCl pH 8 gelöst. Anschließend wurde die (wassergesättigte) Phenolphase von der wässrigen Phase



in einem Scheidetrichter getrennt und so lange mit 100 mM Tris/HCl pH 8 ausgeschüttelt, bis sie pH 8 erreicht hatte. Danach wurde 1 Vol. Chloroform zugegeben, gründlich geschüttelt und zur Phasentrennung 10 min bei 4.000 Upm zentrifugiert (Centrifuge 5810 R; Eppendorf Gerätebau, Hamburg). Verwendet wurde die untere, phenolische Phase.

### 2.9.6 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen standen zwei Methoden zur Verfügung. Bei beiden kann eine Kontamination mit Polysacchariden zu einer Überschätzung der DNA- bzw. RNA-Menge führen. Zum einen wurde 1 µl Aliquot der Lösung in einer Agarose-Gelelektrophorese (2.10.1) aufgetrennt und die gewünschte Bande in ihrer Intensität mit einer Bande des verwendeten  $\lambda$ /*Pst*I-Markers verglichen. Aus der Größe der betreffenden Markerbande, der Gesamtgröße des  $\lambda$ -Genoms (50 kb) und der aufgetragenen Gesamtmenge an  $\lambda$ -DNA (1 µg) konnte die DNA-Menge abgeschätzt werden. Diese Methode ist ungenauer und wurde für schnelle Abschätzungen der DNA- bzw. RNA-Menge verwendet. Eine genauere Quantifizierung erlaubt die UV-photometrische Bestimmung:

Doppelproben von 1 µl Nukleinsäurelösung wurden in je 600 µl Wasser verdünnt und die Extinktion bei 230, 260 und 280 nm gemessen (Uvikon 932; Kontron, Mailand, Italien). Die Quotienten der Extinktionswerte (230 nm/260 nm und 260 nm/280 nm) stellen ein Maß für die Verunreinigung der Lösung mit Polysacchariden bzw. Proteinen dar. Idealerweise sollten sie zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden nach folgenden Formeln berechnet, die für doppelsträngige DNA und einzelsträngige RNA gelten (Sambrook *et al.* 1989):

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 42 \times V_{\text{Küvette}} \times V_{\text{Aliquot}}^{-1}$$

$$\text{DNA } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 50 \times V_{\text{Küvette}} \times V_{\text{Aliquot}}^{-1}$$

## 2.10 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

### 2.10.1 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA oder RNA durch TEA-Agarose-Gelelektrophorese diente zur Quantifizierung (2.9.6) und Reinheitsüberprüfung, Fragment-Größenbestimmung, Kontrolle von Restriktionsverdau (2.14.1), Detektion von PCR-Produkten (2.13.2) und zur gezielten Isolierung einzelner Fragmente. Im letzteren Fall mußte die entsprechende Bande aus dem

Gel ausgeschnitten und die DNA aus der Agarosematrix eluiert werden (2.10.2). Die Gele bestanden aus 1 % (w/v) Agarose (Invitrogen, Karlsruhe) in 1 x TEA-Puffer, die durch Aufkochen geschmolzen und bis zum Gießen der Gele bei 60 °C aufbewahrt wurde. Für die Gelelektrophorese von RNA wurden die Gelkammer und Gießvorrichtung 1 h in 1 % SDS eingelegt, um RNasen zu inaktivieren. Vor dem Probenauftrag wurde den Proben jeweils 0,2 Vol. „loading dye“ zugesetzt. Als Größenstandard diente mit *PstI* verdaute  $\lambda$ -DNA. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V in 1 x TEA-Puffer. Anschließend wurden die Gele etwa 5 min in 10  $\mu$ g/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt und ebenso lange in H<sub>2</sub>O entfärbt. Die DNA-Banden konnten dann an einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert werden (IDA; Raytest, Straubenhardt).

50 x TEA-Puffer:    2 M            Tris/Acetat pH 8,3  
                          100 mM        EDTA

„loading dye“:    50 % (v/v)    Glycerin  
                          10 mM        NaPO<sub>4</sub> pH 7,0  
                          0,4 % (w/v)   Orange G

### 2.10.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Häufig ist es notwendig, ein bestimmtes DNA-Fragment von anderen, z.B. PCR-Produkten (2.13.2) oder Fragmenten eines Restriktionsverdaus (2.14.1), zu trennen, um es in einer Ligation (2.14.4) oder als Sonde in einer Hybridisierung (2.11) einzusetzen. Dazu wurden die DNA-Fragmente in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, das besonders dick gegossen war, so daß die Geltaschen das Auftragen von bis zu 50  $\mu$ l Probenvolumen erlaubten. Die gewünschte Bande wurde aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel eluiert. Dazu wurde der „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Dieser Kit beruht auf dem Schmelzen der Agarose bei relativ niedriger Temperatur (50 °C) in einem Puffer, der ein chaotropes Salz enthält. Anschließend wird die DNA bei hoher Salzkonzentration selektiv an eine Kieselgel-Säule gebunden. Schließlich wurde die DNA mit 25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eluiert und durch Agarose-Gelelektrophorese von 1  $\mu$ l Eluat quantifiziert (2.9.6).

## 2.11 Hybridisierungsmethoden

Der spezifische Nachweis von Nukleinsäuresequenzen erfolgt durch die Hybridisierung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes (Sonde) an die betreffende Sequenz. Je nach Hybridisierungsbedingungen kann dieser Nachweis mit höherer oder niedriger Spezifität (Stringenz) erfolgen. Wenn die gesuchte Sequenz dabei in einem Nukleinsäuregemisch vorliegt, z.B. eine bestimmte mRNA in einer Gesamt-RNA Probe, so kann das Gemisch zunächst in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und in dieser Form durch Übertragung auf eine Nylonmembran immobilisiert werden. Dies wird als Blotting und ein RNA Gel-Blot als Northern Blot bezeichnet. Der Northern Blot ermöglicht u.a. die Bestimmung der Häufigkeit einer bestimmten mRNA Spezies in unterschiedlichen Geweben.

### 2.11.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten („Random Priming“)

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten als Hybridisierungs-Sonden erfolgte mit dem „Hexalabel DNA Labeling Kit“ (MBI, Vilnius, Litauen). Hierbei werden an das hitzedenaturierte Fragment Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz gebunden, die anschließend dem großen proteolytischen Fragment der DNA Polymerase I aus *E. coli* (Klenow-Fragment) als Primer für eine Auffüllreaktion dienen (siehe auch 2.14.2). Dem Enzym wird zunächst ein dNTP-Gemisch als Substrat zur Verfügung gestellt, daß dCTP nur in radioaktiv markierter Form enthält. Durch Verwendung einer mutierten Version des Klenow Fragments ohne 3'→5' Exonukleaseaktivität ( $exo^-$ ) wird verhindert, daß bereits eingebaute Radionukleotide durch das Korrekturlesen der Polymerase wieder entfernt werden. Die als Sonden verwendeten DNA-Fragmente wurden zuvor aus Plasmiden ausgeschnitten (2.14.1), über eine Gelelektion gereinigt (2.10.2) und durch Agarose-Gelelektrophorese quantifiziert (2.9.6).

100-200 ng DNA-Fragment wurden mit 10 µl Hexanukleotiden gemischt und auf 43 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 100 °C denaturiert und dann auf Eis gestellt. Nun wurden 3 µl Mix C (0,33 mM dNTPs ohne dCTP), 30 µCi (3 µl)  $\alpha^{32}P$ -dCTP und 1 µl (5 U) Klenow-Fragment  $exo^-$  zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 4 µl vollständiger dNTP-Mix (10 mM) zugegeben um vorzeitige Kettenabbrüche durch dCTP-Mangel zu vermeiden und nochmals 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt.

Die Trennung der markierten Sonde von den nicht eingebauten Nukleotiden erfolgte durch einen „ProbeQuant G-50“ Kit (Amersham Biosciences, Freiburg). Die freien Desoxynukleotide

werden dabei an eine G-50 Sephadex Säule gebunden, wogegen die doppelsträngige DNA-Sonde sich im Eluat findet. Das Säulenmaterial lag fertig äquilibriert vor und brauchte nur durch Vortexen aufgeschüttelt und anschließend durch 1 min Zentrifugation bei 3.000 Upm sedimentiert und getrocknet zu werden, dann konnte die Probe aufgetragen und in einem einzelnen Zentrifugationsschritt (2 min 3.000 Upm) gereinigt werden. Von der gereinigten Sonde wurde ein 1 µl Aliquot im Szintillationszähler (Packard Tri-Carb 1900 TR; PerkinElmer Life Sciences, Jügesheim) gemessen. Die Gesamtaktivität der Sonde sollte größer als  $5 \times 10^6$  cpm sein. Bis zur Hybridisierung wurde die Sonde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.11.2 Northern Blot

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA für einen Northern Blot wurden spezielle Formaldehyd-haltige Agarosegele verwendet. Formaldehyd denaturiert sowohl die RNA-Sekundärstruktur, so daß die RNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden, als auch eventuell vorhandene RNasen.

Für ein Formaldehydgel wurden 3 g Agarose in 150 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgeschmolzen und, nach Abkühlung auf  $70^\circ\text{C}$ , 33 ml Formaldehyd und 20 ml 10 x MEN Puffer zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde zum Gießen eines einzigen Gels von ca. 15 x 15 cm eingesetzt. Je Geltasche wurden 15-20 µg gesamt-RNA aufgetragen. Die Geltaschen faßten dabei ein Volumen von 90 µl, so daß je nach RNA-Konzentration der im Folgenden beschriebene Probenansatz unter Beibehaltung der Volumenverhältnisse an die RNA-Konzentration angepaßt werden konnte. Um das Probenvolumen in allen Geltaschen gleich zu halten, wurden dabei alle Proben durch Auffüllen mit  $\text{H}_2\text{O}$  oder Aufkonzentration der RNA durch eine Ethanol-fällung (2.9.4) an die jeweils niedrigst- oder höchstkonzentrierte Probe angeglichen. Die eingesetzte RNA wurde vor dem Pipettieren 5 min bei  $65^\circ\text{C}$  resuspendiert, um eine möglichst hohe Homogenität der Lösung zu erreichen.

Probenansatz:	9 µl	RNA
	12 µl	deionisiertes Formamid
	3 µl	Formaldehyd
	3 µl	Blaumarker
	3 µl	10 x MEN Puffer

Blaumarker: Bromphenol-Blau-Stammlösung: Ethidiumbromid (10 mg/ml) (17:3)

Bromphenol-Blau-Stammlösung: 0,25 % (w/v) Bromphenol-Blau, 0,25 % (w/v) Xylen Zyanol FF, 40 % (w/v) Saccharose

Die Proben wurden zur Denaturierung der RNA 5 min bei 65 °C inkubiert und dann auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurden die Geltaschen mit 1 x MEN Puffer gefüllt, der auch als Laufpuffer diente. Dazu wurde die Gelkammer mit ca. 600 ml 1 x MEN gerade bis zur Geloberkante gefüllt, so daß die Geloberfläche trocken blieb. Die Gelelektrophorese wurde für ca. 2,5 h bei 130 V durchgeführt. Dabei mußte bei Verwendung von zwei Reihen Geltaschen beachtet werden, daß Ethidiumbromid sich entgegengesetzt zur RNA im Gel bewegt. Das Fotografieren des Gels (DIANA III; Raytest, Straubenhardt) zur Überprüfung der Auftrennung und Quantifizierung der aufgetragenen RNA mußte deshalb durchgeführt werden, bevor das Ethidiumbromid aus der einen Geltaschenreihe die Proben in der anderen Gelhälfte vollkommen überdeckte.

Nach der Elektrophorese wurden die Taschen des Gels abgeschnitten und das Gel gegebenenfalls in zwei Hälften zerschnitten, wenn zwei Reihen Geltaschen vorhanden waren. Dann wurde das Gel luftblasenfrei mit der Oberseite nach unten auf ein mit 20 x SSC angefeuchtetes Stück Whatman 3 MM Papier gelegt, dessen Enden in 20 x SSC tauchten. Auf das Gel wurde die zuvor in H<sub>2</sub>O angefeuchtete und dann 20 min in 20 x SSC äquilibrierte Nylonmembran (Hybond XL; Amersham Biosciences, Freiburg) ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt. Eine Ecke der Membran war zur späteren Orientierung abgeschnitten worden. Auf die Membran kamen noch luftblasenfrei 3 Lagen mit 20 x SSC angefeuchtetes Whatman 3 MM Papier, dann wurde rings um das Gel mit Zellophanfolie oder Parafilm ausgelegt um zu verhindern, daß Blotpuffer durch herabhängendes Papier am Gel vorbei gesaugt werden konnte. Zuletzt wurden auf den Blotaufbau ca. 5 cm hoch Papierhandtücher gleichmäßig aufgeschichtet und mit einem Gewicht von ca. 2 kg beschwert. Der Transfer der RNA auf die Nylonmembran erfolgte über Nacht.

Am folgenden Tag wurde der Blot abgebaut und die Membran 5 min in 2 x SSC gewaschen um eventuelle Gelreste zu entfernen. Die RNA wurde durch eine 10 sec UV-Belichtung in einem UV-Fixierofen (Bio-Link BLX; Biometra, Göttingen) an der Membran fixiert und der Transfer unter UV Licht überprüft. Zur Absättigung der freien Bindungsplätze auf der Nylonmembran wurde dann 45 min bei 65 °C in Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Danach erfolgte die Zugabe der zuvor hergestellten Sonde (2.11.1), die 5 min bei 95 °C denaturiert und dann direkt in den Hybridisierungspuffer pipettiert wurde. Die Hybridisierung

erfolgte bei 65 °C über Nacht. Danach wurde zweimal 20 min in 2 x SSC, 0,1 % SDS und einmal 20 min in 0,5 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Der letzte Waschschrift war durch die geringere Salzkonzentration im Puffer stringent, d.h. die Sonde sollte nur an mRNAs mit hoher Sequenzhomologie gebunden bleiben. Von der Prähybridisierung bis zum Waschen der Membran wurden alle Arbeitsschritte in verschraubbaren Glasröhren mit ca. 4 cm Durchmesser in einem Hybridisierungsöfen (OV5; Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Nach dem letzten Waschen wurde die Membran luftgetrocknet, in eine Plastiktüte eingeschweißt und ein Phosphoimager-Screen mit der lichtempfindlichen Seite auf ihre RNA-Seite aufgelegt. Je nach Höhe der Restradioaktivität wurde der Screen für 2 h bis über Nacht exponiert. Die Signale wurden mit einem Fujifilm FLA-3000 Phosphoimager (Fuji Photo Film, Düsseldorf) detektiert und mit den Bildbearbeitungsprogrammen BASReader und Aida Image Analyzer v3.24 (beide Raytest, Straubenhardt) ausgewertet.

10 x MEN Puffer:

200 mM	MOPS
80 mM	Natriumacetat
10 mM	EDTA
pH 7,0 mit NaOH einstellen	

20 x SSC:	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat pH 7,0

Hybridisierungspuffer:

5 x	SSC
5x	Denhardt's

Denhardt's (100 x):

2 % (w/v)	Ficoll 400
2 % (w/v)	PVP
2 % (w/v)	BSA (entfettet)
0,5 % (w/v)	SDS

### 2.12 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription (RT) von mRNA-Vorlagen in cDNA („copy DNA“) Kopien ermöglicht es, indirekt RNA als Ausgangspunkt einer PCR (2.13.2) zu verwenden (= RT-PCR) und so bestimmte mRNA-Spezies spezifisch nachzuweisen oder die transkribierte Sequenz eines Gens frei von Introns zu erhalten. Ein an das PolyA-Ende von eukaryontischen mRNA bindender dT<sub>20</sub>-Primer dient dabei als unspezifischer Primer für die Reverse Transcriptase:

3 µg RNA und 1 µl dT<sub>20</sub>-Primer (50 µM) wurden mit H<sub>2</sub>O auf 12,8 µl aufgefüllt und RNA-Sekundärstrukturen durch Inkubation für 5 min bei 65 °C denaturiert. Die Probe wurde wieder auf Eis gestellt und 2 µl 10 mM dNTPs, 4 µl 5 x RT-Puffer, 0,5 µl RNase-Inhibitor und 0,7 µl M-MuLV-Reverse Transcriptase (alle MBI, Vilnius, Litauen) zugegeben. Die RT-Reaktion erfolgte für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurde die Reverse Transcriptase 5 min bei 95 °C inaktiviert. Das Produkt der RT-Reaktion ist nur ein einzelner DNA-Strang (Erststrang). Die Erststrang-cDNA reicht aber als Matrize für eine RT-PCR aus, bei der dann Primer für beide Polymerisationsrichtungen vorhanden sind, so daß der zweite DNA-Strang synthetisiert werden kann. Je 1-4 µl RT-Ansatz wurden als Matrize in einer PCR eingesetzt.

### 2.13 Auf der Polymerase-Kettenreaktion basierende Methoden

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis & Faloona 1987) ist die Verwendung von hitzestabilen DNA-Polymerasen für einen zyklischen Reaktionsablauf, in dem eine DNA-Vorlage (Matrize) immer wieder thermisch denaturiert und mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primern) hybridisiert wird (Annealing), die der Polymerase als Startpunkt für die Synthese des komplementären DNA-Stranges (Elongation) dienen. Da die DNA dabei exponentiell vervielfacht wird ist es im Prinzip möglich, aus einem einzigen Ausgangsmolekül innerhalb von 25-35 Reaktionszyklen mehr als 10<sup>6</sup> Kopien herzustellen. Über die Basenpaarung der Primer mit der Vorlage ist dieser Vorgang außerordentlich spezifisch und es wird so möglich, extrem seltene Moleküle, wie bestimmte mRNA-Spezies (eigentlich cDNA-Spezies) gezielt nachzuweisen und analysierbare Mengen davon herzustellen.

### 2.13.1 Kriterien bei der Ableitung von synthetischen Oligonukleotiden (Primern)

Bei der Auswahl von Primern für die PCR muß zwischen spezifischen und degenerierten Primern unterschieden werden. Spezifische Primer können immer dann benutzt werden, wenn die genaue Sequenz der zu amplifizierenden DNA bekannt ist. Sie sollten aus 20-30 Nukleotiden bestehen, einen ausgewogenen G/C-Gehalt von 40-60 % besitzen und mit einem G oder C enden. Zudem sollten die Primer, die jeweils zusammen in einer PCR eingesetzt werden, eine ähnliche Schmelz-Temperatur haben. Dies ist die Temperatur, bei der sich die Primer von der Ziel-DNA ablösen. Sie kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times [\% \text{ G/C}] - 650/\text{Primerlänge}$$

In der Regel wurden Primer so gewählt, daß sie eine Schmelztemperatur zwischen 55 und 63 °C hatten. Außerdem mußten die Primer so beschaffen sein, daß sie eine geringe Tendenz zur Bildung von Sekundärstrukturen und zur Hybridisierung miteinander besaßen. Dies wurde mit den Computerprogrammen „foldrna“ und „bestfit“ des Wisconsin Package der Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA getestet.

Degenerierte Primer dienen zur Amplifikation von noch nicht bekannten DNA-Sequenzen, von denen bereits verwandte Sequenzen bekannt sind, z.B. weitere Mitglieder einer Genfamilie, oder Homologe aus anderen Pflanzenarten. Ihre Sequenz muß aus konservierten Regionen proteinkodierender DNA-Bereiche abgeleitet werden, da nur dort eine ausreichend große Ähnlichkeit zwischen den bereits bekannten und den neuen DNA-Sequenzen zu erwarten ist. Zunächst mußten dazu die bereits bekannten Aminosäure-Sequenzen von AAP-Proteinen miteinander verglichen werden, um konservierte Regionen zu finden. Aus der Aminosäuresequenz dieser konservierten Regionen wurde dann eine Nukleotidsequenz rückübersetzt. Da der genetische Code degeneriert ist, ist diese Rückübersetzung selbst dann nicht eindeutig, wenn die betreffende Aminosäure-Sequenz zu 100 % konserviert ist. Es bleiben in der Regel einige Positionen im Primer, an denen 2, 3 oder 4 verschiedene Nukleotide stehen können (= degenerierter Primer). 7-8 zu 100 % konservierte Aminosäuren sind notwendig, um einen Primer von 21-24 Nukleotiden Länge abzuleiten. Außerdem sollten diese im günstigsten Fall Aminosäuren mit einem geringen Degenerationsgrad des genetischen Codes beinhalten (z.B. Methionin, Tryptophan) und nicht die von jeweils sechs Basentriplets kodierte Aminosäuren Arginin, Leucin oder Serin. Im Prinzip sollten für einen degenerierten Primer dieselben Kriterien gelten wie oben für spezifische Primer angeführt, aufgrund der begrenzten Anzahl geeigneter konservierter Aminosäure-Sequenzen ist es aber



in der Regel nicht möglich, diese Vorgaben einzuhalten. Außerdem kann die Schmelztemperatur wegen der variablen Nukleotidpositionen nur näherungsweise berechnet werden. An diesen Positionen kann entweder eines der in Frage kommenden Nukleotide zufällig eingebaut werden, so daß der degenerierte Primer eigentlich ein Primergemisch darstellt. Oder variable Nukleotidpositionen werden durch Inosin (I) ersetzt, das mit allen vier Basen der DNA paaren kann. Die in dieser Arbeit verwendeten degenerierten Primer sind am Ende mit einem „i” bezeichnet, wenn es sich um Inosin-Primer handelt (Tab 2.1). Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG, Göttingen bezogen mit Ausnahme der nicht für die PCR verwendeten Oligonukleotide ANTI-1 und ANTI-2 (Carl Roth, Karlsruhe) (2.17.1)

**Tab. 2.1: Oligonukleotidprimer.** I = Inosin; M = A, C; N = A, C, G, T (beliebige Base); R = A, G (Purinbase); S = G, C; W = A, T; Y = C, T (Pyrimidinbase).

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
allgemeine Primer		
<b>5' RACE</b>	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG	5' RACE Ankerprimer
<b>AP</b>	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AGT TTT TTT TTT TTT TT	3' RACE Ankerprimer
<b>dT<sub>20</sub></b>	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT	Primer für Reverstranskription
<b>PKecgus3</b>	CCG GCT TTC TTG TAA CGC	Test-PCR von Promotor- <i>GUS</i> -Konstrukten
<b>M13 rev</b>	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA	Sequenzierungsprimer
<b>pMal-seqf</b>	CCG CAG ATG TCC GCT TTC TGG	Sequenzierungsprimer für pMal-c2X Konstrukte
<b>T7 Promotor</b>	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierungsprimer
<b>T7 Terminator</b>	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	Sequenzierungsprimer
<b>UAP</b>	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AG	3' RACE Adapterprimer
genspezifische Primer für Ubiquitin		
<b>ubifor</b>	ATG CAG ATY TTT GTG AAG AC	RT-PCR-Positivkontrolle
<b>ubirev</b>	ACC ACC ACG RAG ACG GAG	RT-PCR-Positivkontrolle
degenerierte Primer		
<b>CKAA1i</b>	GGI GTI YTI WSI YTI GCI TGG GC	Identifizierung von BnAAPs
<b>CKAA2</b>	GGN AAR MGN AAY TAY ACN TAY ATG	Identifizierung von BnAAPs
<b>CKAA2i</b>	GGI AAR MGI AAY TAY ACI TAY ATG	Identifizierung von BnAAPs
<b>CKAA4ri</b>	CCR AAI GCI GCR TAI CC	Identifizierung von BnAAPs
genspezifische Primer für <i>BnAAP1</i>		
<b>A1-3R-1</b>	AAG TTT TGT GGG AGT ATC AAC CAC C	3' RACE
<b>A1-3R-2C</b>	GAG CAA GTT TTG TGG GAG TAT CAA C	3' RACE
<b>A1-5R-1C</b>	ATC AGA TTC CCA TAC TGT GCC AC	5' RACE
<b>A1-5R-2</b>	AGA TCG AAC GTC CAT ATA CGT G	5' RACE
<b>A1TskNf</b>	GGC CAT CTC GAG ATG AAG AGT TTC AAC ACC GAT C	Klonierung des offenen Leserasters, <i>XhoI</i> Schnittstelle
<b>A1TskNr</b>	GGC CAT CTG CAG TCA CTC ATG GAT AGT CCG GA G	Klonierung des offenen Leserasters, <i>PstI</i> Schnittstelle
<b>BA1f1</b>	ATT ACA CGT ATA TGG ACG TTG TTC G	Klonierung einer Hybridisierungssonde, Sequenzierung
<b>BA1r1</b>	CCA CAT AAG ATG TAG AAG AAA GTG G	Klonierung einer Hybridisierungssonde, Sequenzierung

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

**Tab. 2.1: Oligonukleotidprimer. (Fortsetzung)**

genspezifische Primer für <i>BnAAP2</i>		
<b>BA2f1</b>	GGT GCT GAG GTT GGC GTG GGC	Klonierung einer Hybridisierungssonde
<b>BA2r1</b>	GCG GCG CAG CCC ATT GAG CC	Klonierung einer Hybridisierungssonde
genspezifische Primer für <i>BnAAP6</i>		
<b>A6TskNf</b>	GGC CAT CTC GAG ATG GAG AAA AAG AGC ATG TTC ATT G	Klonierung des offenen Leserasters, <i>XhoI</i> Schnittstelle
<b>A6TskNr</b>	GGC CAT CTG CAG CTA CTC GGG AGC CTG GAA AGG	Klonierung des offenen Leserasters, <i>PstI</i> Schnittstelle
<b>ANTI-1</b>	CTA TGG AGA AAA AGA GCA TGT TCT TTG AAC AAA GCT TCA CCG ATC ACT AA	Klonierung des Nterm Peptids in pMAL-c2X
<b>ANTI-2</b>	AGC TTT AGT GAT CGG TGA AGC TTT GTT CAA TGA ACA TGC TCT TTT TCT CCA TAG AGC T	Klonierung des Nterm Peptids in pMAL-c2X
<b>BA6f2</b>	GTC TCT CCA TCG CCA AAG TGG	Klonierung einer Hybridisierungssonde, Sequenzierung
<b>BA6r2</b>	ATC ATT GCT ACA ACA GCC GTA AC	Identifizierung von BnAAPs, Klonierung einer Hybridisierungssonde, Sequenzierung
<b>BAA3-1</b>	GGC CAG ATA ACA AGT TTA TTA CAG G	3' RACE
<b>BAA3-2</b>	GTA TCA GCT TGT TTA GAT TGG TTT GG	3' RACE
<b>BAA5-1</b>	GAT TGT TAT TCC AAT CAG ATT CCC G	5' RACE
<b>BAA5-2</b>	AGC CAA TCC ACA TAA CAT CAC TTT TC	5' RACE
<b>P6f2</b>	CTC TTT CCT TTA TGG CCT ATT CC	Promotorsequenzierung
<b>P6f3</b>	TTT ACC GGA AAT GTA TTA TTT TTA ACG	Promotorsequenzierung
<b>P6r2</b>	ACT TTA GTG GGC AAA ATC AAT ATC G	Promotorsequenzierung
<b>P6r3</b>	ATA GTT GAC TTT TCC AAA AGT CTG C	Promotorsequenzierung
<b>walk1</b>	TTT TCT CCA TAG ATA GAT TGC CTT TCT GC	„Genome walking“
<b>walk2</b>	TAT GTT GAA ATA GGA AGA AGA GGC AAA GG	„Genome walking“

### 2.13.2 Polymerase-Kettenreaktion

PCR-Amplifikationen wurden in verschiedenen Thermocyclern mit beheizbarem Deckel (TGradient Thermocycler; Biometra, Göttingen; Mastercycler personal und Mastercycler gradient; Eppendorf Gerätebau, Hamburg) durchgeführt, die z.T. Temperaturgradienten innerhalb der Thermoblocks gestatteten. Ein Standardansatz (25 µl) bestand aus folgenden Komponenten:

2,5 µl	10 x <i>Taq</i> -Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl)
1-3,5 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> (Endkonzentration 1-3,5 mM)
0,5 µl	10 mM dNTPs
0,5 µl	5'-Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	3'-Primer (10 pmol/µl)
1 µl	DNA-Matrize
0,5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl, BIOTAQ; Bionline, Luckenwalde)
ad 25 µl	H <sub>2</sub> O

Standard-Programmierung:

94 °C            1 min (Denaturierung)

94 °C            1 min (Denaturierung)

( $T_m - 3$ ) °C    1 min (Annealing)

72 °C            1 min (Elongation)

Dieser Zyklus wurde 30 x wiederholt.

72°C            10 min (terminale Elongation)

Diese Bedingungen wurden je nach Art der Primer und der zu amplifizierenden Matrize optimiert: Wurde kein Produkt erhalten, so wurde die Spezifität der PCR verringert, bei unerwünschten Nebenprodukten wurde sie erhöht. Die Annealing-Temperatur wurde zunächst 3 °C niedriger als die Schmelztemperatur der Primer gewählt, konnte aber zur Erhöhung der Spezifität höher oder zur Verringerung niedriger eingestellt werden. Bei Thermoblocks mit einstellbarem Temperaturgradient konnte innerhalb einer PCR die optimale Temperatur ermittelt werden. Die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration wurde zwischen 1 mM (spezifischer) und 3,5 mM (unspezifischer) variiert. Die Elongationszeit war abhängig von der Länge der Matrize, es wurde für die *Taq*-Polymerase eine Elongationszeit von ca. 1 kb/min veranschlagt. Weiterhin konnte die Primerkonzentration auf 100 pmol/μl und die Zyklenzahl auf 35 erhöht werden, wenn mit den Standard-Bedingungen kein Produkt erhalten wurde. Wurde mit spezifischen Primern kein Produkt oder ein starker Hintergrund unspezifischer Nebenprodukte erhalten, so wurde das PCR-Produkt z.T. reamplifiziert, indem 1 μl als Matrize in einer weiteren PCR - z.B. mit spezifischeren Amplifikationsbedingungen - eingesetzt wurden. Bei einer RT-PCR, bei der ein cDNA-Erststrang als Matrize diente, wurde die Matrizenmenge auf bis zu 4 μl erhöht.

Zwei stärkere Abwandlungen des Standard-Protokolls waren die „Touch Down“ PCR und die „Inverse Touch Down“ PCR (Knop 2001). Bei diesen PCR-Methoden wurde die Annealing-Temperatur zunächst ca. 10 °C über oder unter der endgültigen Temperatur eingestellt, die dann im Laufe von etwa 10 Zyklen mit 1 °C/Zyklus erreicht und für weitere 20-25 Zyklen beibehalten wurde. Beim „Touch Down“ wurde die Annealing-Temperatur von oben kommend allmählich verringert und so die PCR mit extrem spezifischen Bedingungen begonnen, um Nebenprodukte zu vermeiden, die dann allmählich unspezifischer wurden nachdem das gewünschte Produkt bereits angereichert war. Beim „Inverse Touch Down“

wurde umgekehrt zunächst eine sehr unspezifische, niedrige Annealing-Temperatur gewählt, um bei schwierigen PCRs überhaupt Produkt zu erhalten, und dann langsam die Spezifität erhöht.

Anstelle von *Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* wurde „SAWADY *Pwo*-DNA-Polymerase“ aus *Pyrococcus woesei* (PeqLab, Erlangen) verwendet, wenn eine geringe Fehlerrate bei der Elongation entscheidend war, wie bei PCR-Produkten die für die Veröffentlichung in den Datenbanken oder zur funktionellen Expression der kodierten Proteine (2.15) dienen sollten. *Pwo*-Polymerase hat eine 3'→5' Exonuklease Korrekturlese-Funktion und dadurch eine zehnfach höhere Genauigkeit (Fehlerrate etwa  $2 \times 10^{-3}$ ) als *Taq*-Polymerase. Entsprechend den anderen Reaktionsoptima wurden die PCR-Bedingungen angepaßt: Die Elongation fand bei 68 °C statt 72 °C statt,  $Mg^{2+}$  Ionen wurden als  $MgSO_4$  an Stelle von  $MgCl_2$  zugegeben. Die Enzymmenge pro 25 µl-Ansatz betrug 2,5 U. Wegen der langsameren Elongationsrate von *Pwo*-Polymerase wurden die Elongationszeiten zunächst verdoppelt und z.T. sogar vervierfacht. Dabei ist von Vorteil, daß das Enzym deutlich hitzestabiler ist als *Taq*-Polymerase (Halbwertszeit bei 100 °C 1 h im Gegensatz zu 5 min). Aufgrund der 3'→5' Exonuklease-Aktivität kann *Pwo*-Polymerase Primer und Matrize abbauen. Der PCR-Ansatz mußte deshalb in zwei Teilen hergestellt werden, von denen der eine Polymerase, Puffer und  $Mg^{2+}$  enthielt, der andere Matrize und Primer. Beide wurden erst unmittelbar vor dem Reaktionsstart gemischt und dann sofort in den bereits heißen Thermoblock des PCR-Gerätes gestellt. Ein Nachteil von *Pwo*-Polymerase ist auch, daß durch die 3'→5' Exonukleasefunktion keine A-Überhänge wie bei *Taq*-Polymerase erzeugt werden und somit eine T/A-Klonierung (2.14.4) nicht möglich ist. Entsprechend mußten Primer mit geeigneter Restriktionsschnittstelle verwendet werden. Alle PCR-Produkte wurden durch TEA-Agarose-Gelelektrophorese (2.10.1) von 1-5 µl Aliquots analysiert.

### 2.13.3 Kolonie-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt auch, Bakterienkolonien schnell und sequenzspezifisch auf das Vorhandensein eines Plasmids mit dem gewünschten Insert zu untersuchen. Vorteile gegenüber der Plasmid-Mini-Präparation (2.9.3.1) mit anschließendem Restriktionsverdau (2.14.1) sind dabei die schnellere Durchführung und der v.a. bei großen Probenzahlen geringere Arbeitsaufwand, die Sequenzspezifität und die Möglichkeit, durch geeignete Primerwahl gleichzeitig die Richtung der Insertion zu bestimmen. Dazu müssen ein im Insert bindender und ein Vektor-spezifischer Primer kombiniert werden, so daß ein PCR-

Produkt nur dann gebildet werden kann, wenn die Insertion so erfolgt ist, daß die 3' Enden beider Primer in entgegengesetzte Richtungen weisen.

Für eine Kolonie-PCR wurden 25 µl Standard PCR-Ansätze (2.13.2) ohne Matrizen-DNA angesetzt. Dann wurden im Anschluß an eine Transformation (2.14.6) gewachsene Bakterienkolonien mit sterilen Zahnstochern gepickt. Mit dem Zahnstocher wurde zuerst ein PCR-Ansatz und anschließend eine Übernacht-Kultur mit LB-Medium und geeignetem Antibiotikum (2.2.3) angeimpft. Diese Kulturen konnten am nächsten Tag für Plasmid-Mini-Präparationen der anhand der Kolonie-PCR als positiv identifizierten Kolonien verwendet werden. Die angeimpften PCR-Ansätze wurden dem unter 2.13.2 beschriebenen Programm in einem Thermocycler unterzogen, wobei aber der anfängliche Denaturierungsschritt auf 5 min verlängert wurde, um die Bakterienzellen zu lysieren und ihre Plasmide freizusetzen. Die PCR-Produkte wurden durch TEA-Agarose-Gelelektrophorese (2.10.1) analysiert.

#### **2.13.4 Amplifikation von cDNA-Enden (RACE)**

Wenn mittels PCR mit degenerierten Primern (2.13.1) eine bisher unbekannte cDNA-Sequenz amplifiziert worden ist, so handelt es sich dabei normalerweise nur um eine unvollständige cDNA. Die zur Primer-Ableitung verwendeten konservierten Aminosäuresequenzen liegen nur selten an den Enden des offenen Leserasters und selbst dann fehlen der Sequenz die untranslatierten 5' und 3' Enden der ursprünglichen mRNA-Sequenz. Durch die RACE-Technik („rapid amplification of cDNA ends“, Frohman *et al.* 1988) ist es möglich, diese fehlenden Enden über spezielle RT-PCR-Techniken zu erhalten. Die Schwierigkeit liegt dabei darin, daß nur an jeweils einem Ende des gewünschten PCR-Produktes die Ableitung von Primern aus dem bereits bekannten Teil der Sequenz möglich ist. Beim 3' RACE wird deshalb das PolyA-Ende der mRNA als zweite Primeranlagerungsstelle genutzt, beim 5' RACE muß ein entsprechendes Homooligomer, in diesem Fall PolyC, erst erzeugt werden. Bei beiden RACE-Techniken werden zur Erhöhung der Spezifität jeweils 2 sequenzspezifische Primer in aufeinanderfolgenden Polymerase-Reaktionen verwendet, von denen der zweite näher am zu amplifizierenden Ende, also innerhalb des zuerst erhaltenen Fragmentes liegt. Dieser zweite Primer wird als „nested“ Primer bezeichnet.

#### 2.13.4.1 Identifizierung des Transkriptions-Endpunktes durch 3' RACE

Das 3' RACE beginnt mit einer speziellen RT-Reaktion (2.12), bei der nicht der normalerweise verwendete dT<sub>20</sub> Primer, sondern der sogenannte Ankerprimer AP verwendet wurde. Dieser besitzt neben dem zur PolyA-Sequenz komplementären PolyT-Abschnitt eine Sequenz (Adaptersequenz) zu der ein zweiter Primer UAP komplementär ist (Tabelle 2.1). Auf diese Weise kann bei der nachfolgenden PCR die Verwendung des unspezifischen dT<sub>20</sub> Primers umgangen werden. Verwendet wurde Gesamt-RNA aus einem Gewebe, in dem die gewünschte mRNA stark exprimiert war (sofern bekannt). Die cDNA-Synthese wurde folgendermaßen durchgeführt:

2-3 µg Gesamt-RNA wurden mit 2,5 µl Primer AP (100 pmol/µl) versetzt, das Volumen mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt und der Ansatz 5 min bei 65 °C inkubiert um die Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen. Anschließend wurde die Probe zurück auf Eis gestellt, so daß sich der Primer anlagern konnte. Anschließend wurden 2 µl 10 mM dNTPs, 2,25 µl H<sub>2</sub>O, 0,75 µl RNase-Inhibitor, 4 µl 5 x RT-Puffer und 1 µl M-MuLV-Reverse Transcriptase (alle von MBI, Vilnius, Litauen) zugegeben, so daß das gesamte Volumen des Ansatzes 20 µl betrug. Die RT-Reaktion erfolgte für 1 h bei 42 °C.

Die so erhaltene Erststrang-cDNA wurde in einer ersten PCR als Matrize eingesetzt:

2 µl	RT-Ansatz
5 µl	10 x <i>Taq</i> -Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl)
3 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> (Endkonzentration 1-3,5 mM)
1 µl	10 mM dNTPs
1 µl	Primer UAP (100 pmol/µl)
1 µl	erster sequenzspezifischer Primer (100 pmol/µl)
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl, BIOTAQ; Bionline, Luckenwalde)
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

Thermocycler-Programmierung:

94 °C            1 min (Denaturierung)

94 °C            30 sec (Denaturierung)

58 °C            30 sec (Annealing)

72 °C            2 min (Elongation)

Dieser Zyklus wurde 35 x wiederholt.

72 °C            10 min (terminale Elongation)

Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (2.10.1) überprüft. Häufig erhielt man mehrere Produkte. Wenn sich darunter ein DNA-Fragment der erwarteten Größe befand, schloß sich zur Erhöhung der Spezifität eine weitere PCR an:

1 µl            Produkt aus PCR 1

5 µl            10 x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl)

3 µl            25 mM MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 1-3,5 mM)

1 µl            10 mM dNTPs

1 µl            Primer UAP (100 pmol/µl)

1 µl            zweiter sequenzspezifischer („nested“) Primer (100 pmol/µl)

1 µl            *Taq*-Polymerase (5 U/µl, BIOTAQ; Bionline, Luckenwalde)

ad 50 µl        H<sub>2</sub>O

Die Thermocycler-Programmierung entsprach der bei der ersten PCR. Die Produkte der ersten und zweiten PCR wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese miteinander verglichen. Aufgrund der Position der Bindungsstelle des zweiten („nested“) Primers innerhalb des mit dem ersten Primer amplifizierten Fragmentes sollte das Produkt der zweiten PCR geringfügig kleiner sein als das der ersten. Außerdem sollte die Anzahl der unspezifisch mitamplifizierten Banden nach der zweiten PCR geringer sein. Geeignete PCR-Fragmente wurden durch eine präparative Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Gelelution (2.10.2) gereinigt und zur Sequenzierung (2.13.6) in den Vektor pGEM-T Easy ligiert (2.14.4).

#### 2.13.4.2 Identifizierung des Transkriptions-Startpunktes durch 5' RACE

Auch das 5' RACE beginnt mit einer speziellen RT-Reaktion (2.12). Da in diesem Fall nicht vom 3' Ende der mRNA her, sondern aus dem kodierenden Sequenzbereich her revers transkribiert werden soll, kann bereits für die RT ein genspezifischer Primer verwendet werden. Die Annealing-Temperatur liegt dadurch wesentlich höher als bei einem dT<sub>20</sub> Primer und die cDNA Synthese wurde mit einer besonderen hitzestabilen Reversen Transcriptase durchgeführt, die bei Temperaturen bis zu 65 °C aktiv ist („Thermoscript“ Kit; Invitrogen, Karlsruhe). Außerdem konnte durch die Verwendung eines spezifischen Primers bereits bei der RT-Reaktion der zweite, „nested“ Primer bereits in der sich anschließenden PCR verwendet und auf eine zweite PCR verzichtet werden. Wie beim 3' RACE wurde Gesamt-RNA aus einem Gewebe, in dem die gewünschte mRNA stark exprimiert war verwendet (sofern bekannt).

Für die cDNA-Synthese wurden die folgenden Komponenten in ein Eppendorfgefäß pipettiert: 3 µg Gesamt RNA und 0,5 µl des ersten sequenzspezifischen Primers (100 pmol/µl) wurden mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt und RNA-Sekundärstrukturen 5 min bei 65 °C denaturiert. Die Probe wurde zur Primerbindung auf Eis gestellt und 1 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl 10 mM dNTPs, 1 µl 100 mM DTT, 1 µl „RNase out“ RNase-Inhibitor, 4 µl 5 x RT Puffer und 1 µl Thermoscript RT (1 U/µl) hinzugefügt (alle Komponenten von Invitrogen, Karlsruhe). Die RT-Reaktion erfolgte für 1 h bei 55 °C.

Da am 5' Ende der mRNA, d.h. dem 3' Ende der Erststrang-cDNA keine als Primerbindungsstelle verwendbare PolyA-Sequenz vorhanden ist, mußte im nächsten Schritt eine vergleichbare Struktur synthetisch hergestellt werden. Dies geschah durch das Enzym Terminale Desoxynukleotid-Transferase (TdT), das an freie 3' Enden von DNA Matrizen-unabhängig in zufälliger Reihenfolge Nukleotide anhängt (Roychoudhury *et al.* 1976). Wird dem Enzym nur ein einziges Desoxynukleotid angeboten, so entsteht ein Homooligomer. Dazu mußten zunächst die im RT-Ansatz noch vorhandenen dNTPs entfernt werden. Der RT-Ansatz wurde deshalb mit einem Kit („CONCERT Rapid Purification System“; Invitrogen, Karlsruhe) gereinigt. Doppelsträngige Nukleinsäuren (in diesem Fall ein Hybrid-Doppelstrang aus mRNA und Erststrang-cDNA) binden dabei selektiv in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Kieselgelsäule während die freien Nukleotide die Säule passieren. Die cDNA wurde mit 50 µl auf 65 °C erwärmtem 1 x TdT Puffer eluiert.

Zur 3' Verlängerung der cDNA wurde dCTP verwendet, da die G-C Basenpaarung mit drei Wasserstoffbrücken stabiler ist als die A-T Bindung mit nur zwei und somit bei der PCR höhere Annealing-Temperaturen und eine größere Spezifität erreicht werden können. Für die



TdT-Reaktion wurden zum Eluat der Reinigungssäule 1,5 µl H<sub>2</sub>O, 1,5 µl 1 mM dCTP, 1 µl 5 x TdT Puffer und 1 µl (19 U) Terminale Transferase (Promega, Mannheim) hinzugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. 2 µl der TdT-Reaktion wurden anschließend für eine PCR eingesetzt:

2 µl	TdT-Ansatz
5 µl	10 x <i>Taq</i> -Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl)
3 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> (Endkonzentration 1-3,5 mM)
1 µl	10 mM dNTPs
1 µl	zweiter sequenzspezifischer („nested“) Primer (100 pmol/µl)
1 µl	5' RACE Primer (100 pmol/µl)
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl, BIOTAQ; Biotline, Luckenwalde)
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

Thermocycler-Programmierung:

94 °C            1 min (Denaturierung)

94 °C            30 sec (Denaturierung)

58 °C            30 sec (Annealing)

72 °C            90 sec (Elongation)

Dieser Zyklus wurde 40 x wiederholt.

72 °C            10 min (terminale Elongation)

Der für die PCR verwendete 5' RACE Primer (Tabelle 2.1) war kein reiner PolyG-Primer, da die Bindung eines solchen Primers an das PolyC-Ende der cDNA so stabil wäre, daß die Denaturierung bei 30 sec 94 °C nur unvollständig abläuft. Die Sequenz des 5' RACE Primers enthielt deshalb einige Inosin-Basen, die die Bindung etwas abschwächen und die Annealing-Temperatur des Primers senken. Die PCR-Produkte wurden im Agarose-Gel untersucht und geeignete Fragmente aus dem Gel eluiert (2.10.2) und zur Sequenzierung (2.13.6) in pGEM-T Easy ligiert (2.14.4).

### 2.13.5 Amplifikation von Promotoren durch „Genome Walking“

Bei einem sogenannten „Genome Walking“ identifiziert man noch unbekannte genomische DNA-Sequenzen anhand bekannter benachbarter Sequenzen. Insbesondere kann durch ein „Genome Walking“ von einem als cDNA-Sequenz bekannten Gen ausgehend dessen Promotorregion identifiziert werden. Eine Möglichkeit, ein „Genome Walking“ durchzuführen basiert auf der Polymerase-Kettenreaktion. Ähnlich wie beim RACE wird dazu ein Primer verwendet dessen 3' Ende nach Anlagerung an den bekannten Sequenzabschnitt auswärts in chromosomale Sequenzbereiche weist. Am anderen, noch unbekanntem Ende der zu amplifizierenden Sequenz muss, analog der Synthese eines PolyC-Endes am 3' cDNA-Ende beim 5' RACE, erst eine Bindungsstelle für einen zweiten spezifischen Primer geschaffen werden. Dazu wird in diesem Fall allerdings kein Homooligomer an das DNA-Ende synthetisiert. Da bei genomischer DNA als Ausgangsmaterial eine wesentlich höhere Spezifität der Primerbindung erforderlich ist, wird stattdessen ein kurzes doppelsträngiges DNA-Stück mit definierter Sequenz an die DNA ligiert. Zur Durchführung des „Genome Walking“ wurde der „Universal Genome Walker Kit“ der Firma Clontech, Heidelberg verwendet. Das Protokoll dieses Kits besteht aus zwei Teilen, der Konstruktion einer „Genome Walker Library“ und der eigentlichen „Genome Walking“ PCR.

#### 2.13.5.1 Herstellung einer „Genome Walker Library“

Die „Genome Walker Library“ besteht aus 5 unterschiedlichen Gemischen von Fragmenten genomischer DNA, die jeweils mit einem anderen glatt schneidenden Restriktionsenzym erzeugt worden sind und an den Enden einen Adapter für die Primerbindung besitzen. Diese Fragmente dienen als Matrize für die „genome walking“ PCR, so daß sich mit demselben Primerpaar (genspezifischer Primer + Adapterprimer) je nach Lage der Schnittstellen im Gen oder seiner Sequenzumgebung aus jedem Fragmentgemisch unterschiedlich lange Produkte ergeben.

Für die Konstruktion der „Genome Walker Library“ wurde eine große Menge sehr sauberer genomischer DNA benötigt, die nach dem unter 2.9.2 dargestellten Verfahren aus jungen Rapsblättern isoliert wurde. Die Qualität der DNA wurde vor ihrer Weiterverwendung überprüft: Es wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (2.10.1) durchgeführt, bei der wegen der Größe der genomischen DNA 0,7 % Agarose in TEA verwendet wurde. Da die DNA für die Konstruktion der „Genome Walker Library“ mit Restriktionsenzymen in unterschiedliche Gemische von Fragmenten zerschnitten werden sollte, war wichtig, daß sie nicht bereits bei

der Isolation durch Scherkräfte fragmentiert worden war. Dies war im Gel an einer klar abgegrenzten einzelnen Bande, die oberhalb der größten Markerbande bei ca. 50 kb lief, und dem Fehlen von Schmier in der Gelspur feststellbar. Weiterhin wurde durch einen Testverdau mit *DraI* überprüft, ob die DNA mit Polysacchariden kontaminiert war, die die Restriktion stören. Dazu wurden 5 µl DNA, 11,4 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl 10 x Puffer B<sup>+</sup> und 1,6 µl *DraI* (10 U/µl; MBI, Vilnius, Litauen) vorsichtig gemischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 5 µl des Reaktionsansatzes in einem 0,7 % Agarosegel aufgetrennt. Es sollte ein gleichmäßiger Schmier in der ganzen Gelspur und mit gerader Lauffront (nicht bogenförmig zu einem „Smiling“ verzogen) sichtbar sein und möglichst nur geringe Reste der ursprünglichen 50 kb-Bande.

Hatte die genomische DNA eine geeignete Qualität, so wurde sie für die Konstruktion der „Genome Walker Library“ mit den fünf glatt schneidenden Restriktionsenzymen *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *ScaI* und *StuI* verdaut. Jeder Restriktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

25 µl genomische DNA (0,1 µg/µl)  
8 µl Restriktionsenzym (10 U/µl)  
10 µl 10 x Puffer  
57 µl H<sub>2</sub>O

Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und bei 37 °C inkubiert. Nach 2 h wurde nochmals bei geringer Geschwindigkeit für 5-10 sec gevortext und dann über Nacht bei 37 °C weiter inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Vollständigkeit der Verdau durch Gelelektrophorese von je 5 µl Restriktionsansatz in einem 0,7 % Agarosegel überprüft. Die 50 kb-Bande der intakten genomischen DNA sollte verschwunden sein. Die fragmentierte genomische DNA wurde anschließend von den noch vorhandenen Enzymen durch eine Phenolextraktion gereinigt (2.9.5). Dazu wurden zu jedem Reaktionsgefäß 95 µl Phenol:Chloroform (1:1) gegeben, kurz gemischt und anschließend 5 min zur Phasentrennung zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 95 µl Chloroform extrahiert. Wiederum wurde kurz gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und auf Eis mit 2 Vol. kaltem 99,6 % Ethanol, 0,1 Vol. 3 M Na-Oxalacetat pH 4,5 und 20 µg Glycogen gemischt. Die DNA wurde für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit kaltem 75 % Ethanol gewaschen und nochmals 5 min abzentrifugiert. Nach der Entfernung des

Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet und dann in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA) resuspendiert. Um die Menge verbliebener DNA abzuschätzen, wurde 1 µl jedes Restriktionsansatzes in einem 0,7 % Agarosegel aufgetrennt. Als nächstes erfolgte die Ligation des „Genome Walker Adaptors“ and die Enden der Restriktionsfragmente.

„Genome Walker Adaptor“ (im Kit enthalten):



Die Aminogruppe am freien 3' Ende des kürzeren Stranges verhindert bei der „Genome Walking“ PCR eine Kettenverlängerung in dieser Richtung, so daß die Adapter Primer 1 und 2 (s. nächster Abschnitt) nur an solche Fragmente binden können, bei denen von einem sequenzspezifischen Primer aus ein zum längeren Strang des „Genome Walker Adaptors“ komplementärer Strang synthetisiert wurde. Auf diese Weise wird verhindert, daß bei der PCR über den beidseitig vorhandenen Adaptor alle Fragmente in der „Genome Walker Library“ unspezifisch mitamplifiziert werden.

Zusammensetzung der Ligationsansätze:

4 µl gereinigter Restriktionsansatz  
1,9 µl Genome Walker Adaptor (25 µM)  
1,6 µl 5 x Ligationspuffer  
0,5 µl T4 DNA-Ligase (1 U/µl)

Neben der Ligation der Restriktionsansätze wurde in einem 6. Ansatz als Positivkontrolle menschliche genomische DNA eingesetzt, die bereits mit *PvuII* fragmentiert im Kit mitgeliefert wurde. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und über Nacht bei 15 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Reaktion durch eine Inkubation für 5 min bei 70 °C gestoppt. Abschließend wurde jeder Ligationsansatz durch Zugabe von 72 µl TE-Puffer auf 80 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

## 2.13.5.2 „Genome Walking“ PCR

Analog zum 3' RACE (2.13.4.1) besteht das „Genome Walking“ aus zwei aufeinanderfolgenden PCR-Amplifikationen mit unterschiedlichen Primerpaaren (jeweils ein genspezifischer und ein zum Adapter komplementärer Primer), wobei das zweite Primerpaar innerhalb des zuerst amplifizierten Fragmentes bindet („nested“ Primer). Auf diese Weise wird die Spezifität des „genome walking“ erhöht. Die Adaptor-Primer waren im Kit enthalten, während die genspezifischen Primer selbst abgeleitet werden mußten.

Adapter Primer 1 (AP1): 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Adapter Primer 2 (AP2): 5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'

Aufgrund der hohen Komplexität der genomischen DNA-Matrize mußten die genspezifischen Primer eine besonders hohe Spezifität besitzen. Es wurden deshalb lange (26-60 Nt) Oligonukleotide mit einer Schmelztemperatur von ca. 67 °C ausgewählt. Weitere Kriterien für die Primerauswahl waren, daß sie so weit wie möglich am 5' Ende der bekannten cDNA-Sequenz binden, nicht miteinander überlappen und einen G/C-Gehalt von 40-60 % besitzen sollten. Von den letzten sechs Positionen am 3' Ende sollten nicht mehr als 3 Nukleotide ein G oder C sein.

Die Ansätze für die erste PCR-Reaktion setzten sich wie folgt zusammen:

37,8 µl	H <sub>2</sub> O
5 µl	10 x <i>Tth</i> Puffer
1 µl	10 mM dNTPs
2,2 µl	25 mM Magnesiumacetat
1 µl	erster genspezifischer Primer (10 pmol/µl)
1 µl	Primer AP1 (10 pmol/µl)
1 µl	50 x Advantage <i>Tth</i> Polymerase Mix (Clontech, Heidelberg)
1 µl	<u>„Genome Walker Library“ (1-5)</u>
50 µl	Gesamtvolumen

Thermocycler-Programmierung:

94 °C            25 sec (Denaturierung)  
72 °C            3 min (Annealing + Elongation)

Dieser Zyklus wurde 7 x wiederholt.

94 °C            25 sec (Denaturierung)  
67 °C            3 min (Annealing + Elongation)

Dieser Zyklus wurde 32 x wiederholt.

67 °C            7 min (terminale Elongation)

Die PCR wurde mit den sechs Ligationsansätzen (5 Restriktionen und eine Positivkontrolle) und einer im Kit mitgelieferten fertigen „Control Library“ aus genomischer menschlicher DNA durchgeführt. Für die Kontrollansätze mit menschlicher DNA als (Ligationskontrolle und fertige „Control Library“) wurde ein anderer, ebenfalls im Kit enthaltener genspezifischer Primer verwendet, der im Gen des „tissue Plaminogen Activator“ (tPA) bindet und ein PCR-Produkt von ca. 1,5 kb ergibt. Außerdem wurden als Negativkontrolle je ein Ansatz ohne Matrizen-DNA mit AP1 und mit PCP1 angesetzt. Der verwendete „Advantage *Tth* Polymerase Mix“ (Clontech, Heidelberg) enthält eine thermostabile DNA-Polymerase mit besonders großer Elongationsreichweite aus *Thermus thermophilus* und eine geringe Beimischung einer DNA-Polymerase mit 3'→5' Korrekturleseaktivität. Außerdem sind *Tth* Polymerase bindende Antikörper enthalten, die das Enzym bis zum ersten Denaturierungsschritt inaktiv halten.

Jeweils 8 µl der PCR-Reaktionen wurden in einem 1 % Agarosegel analysiert (2.10.1). Sofern die erwartete 1,5 kb Bande in den Positivkontrollen, keine PCR-Produkte in den Negativkontrollen und amplifizierte DNA-Fragmente in den „Genome Walker Library“ Ansätzen sichtbar waren, wurde mit der zweiten PCR-Reaktion fortgefahren. Dazu wurde 1 µl der ersten PCR-Reaktion mit 49 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und davon 1 µl als eingesetzt:

37,8 µl	H <sub>2</sub> O
5 µl	10 x <i>Tth</i> Puffer
1 µl	10 mM dNTPs
2,2 µl	25 mM Magnesiumacetat
1 µl	zweiter („nested“) genspezifischer Primer (10 µM)
1 µl	Primer AP2 (10 µM)
1 µl	50 x Advantage <i>Tth</i> Polymerase Mix (Clontech, Heidelberg)
<u>1 µl</u>	<u>Produkt aus erster PCR (1:50 verdünnt)</u>
50 µl	Gesamtvolumen

Thermocycler-Programmierung:

94 °C          25 sec (Denaturierung)  
 72 °C          3 min (Annealing + Elongation)

Dieser Zyklus wurde 5 x wiederholt.

94 °C          25 sec (Denaturierung)  
 67 °C          3 min (Annealing + Elongation)

Dieser Zyklus wurde 20 x wiederholt.

67 °C          7 min (terminale Elongation)

5 µl der PCR-Produkte der zweiten PCR wurden zur Analyse in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Amplifikationsprodukte geeigneter Größe (für pflanzliche Promotoren in diesem Fall ca. 2 kb) wurden durch eine präparative Gelelektrophorese und anschließende Elution der DNA (2.10.2) aufgereinigt, kloniert (2.14) und sequenziert (2.13.6).

### 2.13.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode von Sanger *et al.* (1977). Dazu wurden mit dRhodamin markierte Didesoxynukleotide benutzt („ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“; PerkinElmer Life Sciences, Jügesheim). Die verschiedenen markierten ddNTPs haben Absorptions- und Emissionsspektren von 450-650 nm. Die Kettenverlängerungsreaktion erfolgte nach dem Prinzip einer PCR durch zyklische Wiederholung von Denaturierungs-, Primeranlagerungs- und Elongationsschritten.

Die Komponenten eines Sequenzierungsansatzes waren:

2 $\mu$ l	„Terminator Ready Reaction Mix“ (im Kit enthalten)
300-600 ng	Plasmid-DNA
0,5 $\mu$ l	Sequenzierungs-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)
ad 10 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

Thermocycler-Programmierung:

96 °C	10 sec (Denaturierung)
50 °C	5 sec (Annealing)
60 °C	4 min (Elongation)

Dieser Zyklus wurde 25 x wiederholt.

Als Sequenzierungs-Primer dienten meist in der Nähe der Klonierungsstelle liegende Sequenzabschnitte der verwendeten Vektoren (T7 Promotor, T7 Terminator, M13 rev, pMal-seqf; Tab. 2.1), zum Teil aber auch Insert-spezifische Primer bei der Sequenzierung großer DNA-Fragmente.

Im Anschluß an die Kettenverlängerungsreaktion mußten nicht eingebaute dRhodamin-ddNTPs durch eine Ethanol-fällung entfernt werden. Dazu wurden zu 10  $\mu$ l PCR-Ansatz 1  $\mu$ l 1,5 M Natriumacetat pH  $\geq$  8,0, 250 mM EDTA und 36  $\mu$ l 99,6 % Ethanol gegeben und gut gemischt. Die Probe wurde für 2 h auf Eis inkubiert, danach für 15 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das (in der Regel nicht mit bloßen Auge erkennbare) Pellet wurde mit 100  $\mu$ l 75 % Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet 1 min bei 90 °C getrocknet. Danach wurde es in 20  $\mu$ l „Template Suppression Reagent“ (PerkinElmer Life Sciences, Jügesheim) gelöst und 2 min bei 95 °C denaturiert. Bis zur Sequenzierung wurde die Probe auf Eis aufbewahrt. Die chromatographische Auftrennung und Fluoreszenz-Detektion der Kettenverlängerungs-Produkte erfolgte in einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PerkinElmer Life Sciences, Jügesheim). Die Auswertbarkeit der Chromatogramme (Leseweite) lag bei etwa 400-500 bp. Wurden längere Sequenzen benötigt, wie zur vollständigen Sequenzierung identifizierter *BnAAP*-cDNAs und Promotoren, so wurde die Kettenverlängerungsreaktion und Analyse der Produkte nicht selbst durchgeführt, sondern der Vektor mit dem zu sequenzierenden Insert und gegebenenfalls dem Sequenzierungs-Primer an die Firma SeqLab, Göttingen verschickt, wo Leseweiten über 800 bp erreicht werden konnten. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit denen schon bekannter Gene verglichen (2.18.1).



## 2.14 Klonierungsmethoden

### 2.14.1 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

Das sequenzspezifische Schneiden von doppelsträngiger DNA durch Restriktionsenzyme diente dazu, Vektoren für die Aufnahme eines Inserts zu linearisieren, die Enden von Insert und/oder Vektor für eine Ligation vorzubereiten, unerwünschte Sequenzabschnitte aus Plasmiden zu entfernen, sowie dazu, ein Insert aus einem Vektor herauszuschneiden um seine Größe zu überprüfen (2.10.1) oder es als Sonde in einer Hybridisierung zu verwenden (2.11). Insbesondere besitzt der routinemäßig für T/A-Klonierungen (2.14.4) verwendete Vektor pGEM-T Easy auf beiden Seiten der Insertionsstelle eine *EcoRI*-Schnittstelle. Der Erfolg einer Klonierung konnte deshalb auf einfache Weise durch einen Restriktionsverdau mit diesem Enzym getestet werden. Ein Standard-Restriktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

50 ng	DNA (z.B. Plasmid-Mini-Präparation)
2 µl	10 x Reaktions-Puffer
0,5 µl	Restriktionsenzym (10 U/µl)
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

Die verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Puffer wurden von der Firma MBI, Vilnius, Litauen bezogen. Sollten größere DNA-Mengen quantitativ verdaut werden, wurden entsprechend alle Komponenten des Ansatzes im gleichen Verhältnis zueinander in größeren Mengen eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Analyse eines 1 µl Aliquots in einem Agarosegel überprüft (2.10.1).

### 2.14.2 Auffüllen von überstehenden Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle

Zur Ligation von DNA-Fragmenten (2.14.4) mit nicht-komplementären überstehenden („sticky“) Enden war es teilweise nötig, die Enden in glatte („blunt“) Enden umzuwandeln. Dazu wurde eine Auffüllreaktion mit Klenow DNA-Polymerase durchgeführt. Die Klenow Polymerase ist das große Fragment eines proteolytischen Verdau der *E. coli* DNA Polymerase I mit Subtilisin und wird verwendet, weil sie keine 5'→3' Exonukleaseaktivität besitzt.

Der Ansatz für eine Auffüllreaktion enthielt folgende Komponenten:

200 ng	gereinigte DNA
4 µl	10 mM dNTPs
4 µl	10 x Puffer
1 µl	Klenow Polymerase (2 U/µl; MBI, Vilnius, Litauen)
ad 40 µl	H <sub>2</sub> O

Die Reaktion erfolgte für 20 min bei 37 °C.

### 2.14.3 Alkalische Phosphatase-Behandlung

Um bei einer Ligation (2.14.4) die Rezirkularisierung eines für die Klonierung durch einen Restriktionsverdau linearisierten Plasmides zu verhindern und so die Wahrscheinlichkeit des Einbaus des gewünschten Inserts zu erhöhen, konnte das Plasmid mit alkalischer Phosphatase behandelt werden. Dieses Enzym entfernt die 5' Phosphatreste an den Enden eines DNA-Doppelstrangs, die von der T4 DNA Ligase als Substrat benötigt werden. Die Ligation eines Inserts mit intakten 5' Phosphatresten an das Vektorende kann weiterhin erfolgen. Die alkalische Phosphatase-Behandlung war v.a. bei der verhältnismäßig ineffektiven Ligation von DNA-Strängen mit glatten („blunt“) Enden vorteilhaft. Bei linearisierten Plasmiden, deren Enden deutlich verschieden waren (z.B. ein 5' Überhang auf der einen und ein 3' Überhang auf der anderen Seite) und bei für eine T/A-Klonierung vorbereitetem pGEM-T Easy (2.14.4) war dieser Arbeitsschritt unnötig.

Zur alkalischen Phosphatase-Behandlung eines linearisierten Plasmids wurde 0,1 Vol. 10 x Dephosphorylierungspuffer und 1 U alkalische Phosphatase (Roche, Mannheim) in die DNA-Lösung oder direkt in den Restriktionsansatz gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C. Vor der Verwendung des so behandelten Plasmids in einer Ligation mußten die Restriktionsenzyme und die Phosphatase durch Phenol/Chloroform-Reinigung (2.9.5) entfernt werden. Bei der Lagerung der Phosphatase war darauf zu achten, daß sie nicht kälter als bei 4 °C gelagert wurde, da sie durch Einfrieren relativ schnell inaktiv wurde.

### 2.14.4 Ligation von DNA

Mit der DNA Ligase aus dem Bacteriophagen T4 können lineare doppelsträngige DNA-Moleküle miteinander verknüpft werden, wenn die Enden entweder beide überstehend („sticky“) und (zumindest teilweise) zueinander komplementär oder beide glatt („blunt“) sind.

Außerdem muß zumindest an einem Doppelstrangende eine freie 5' Phosphatgruppe und am anderen eine freie 3' Hydroxygruppe vorhanden sein. Die Ligation wurde benutzt, um PCR-Produkte (2.13.2) oder durch Restriktionsverdau (2.14.1) aus einem DNA-Molekül ausgeschnittene Fragmente (Insert) in ein linearisiertes Plasmid (Vektor) einzufügen. In der Regel wurden sowohl das Insert als auch der Vektor zuvor durch eine Gelelektion (2.10.2) gereinigt. Für PCR-Produkte, die mit den thermostabilen DNA Polymerasen *Taq* oder *Tth* synthetisiert wurden, konnte die sogenannte T/A-Klonierung genutzt werden, da diese PCR-Produkte an ihren 3' Enden ein überhängendes A besitzen: Der Klonierungsvektor pGEM-T Easy (Promega, Mannheim) wird fertig linearisiert geliefert und besitzt überhängende T's an seinen freien 3' Enden, so daß *Taq/Tth*-PCR-Produkte direkt hinein ligiert werden können. Für eine Ligation wurden 0,5 µl Plasmid, 5 µl 2 x T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (Promega, Mannheim) und bis zu 3,5 µl Insert-DNA gemischt, mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt und bei 15 °C über Nacht inkubiert. Das Verhältnis von Insert zu Vektor sollte dabei mindestens 10:1 betragen. 5 µl des Ansatzes wurden für die Transformation (2.14.6) verwendet, der Rest wurde für eine mögliche zweite Transformation bei -20 °C gelagert.

### 2.14.5 Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen

Zur Vermehrung und Analyse eines rekombinanten Plasmids wurde dieses zunächst in *E. coli* Zellen der Linien DH5α oder XL-I Blue transformiert. Es standen dabei zwei Methoden für die Herstellung kompetenter Zellen zur Verfügung: Die Methode nach Inoue *et al.* (1990) lieferte hochkompetente Zellen, die für die Transformation schwieriger Ligationen mit geringer Insertionsrate verwendet wurden. Da der Arbeitsaufwand dieser Methode relativ hoch war, wurden alternativ kompetente Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt. Dieses Protokoll ist schnell durchführbar und liefert kompetente Zellen deren Transformationsraten ausreichend für Standard-Ligationen und Retransformationen mit Plasmid-Mini-Präparationen sind. Frisch hergestellte kompetente Zellen wurden jeweils durch Transformation (2.14.6) mit 1 µl Plasmid-Maxi-Präparation bzw. 1 µl sterilem H<sub>2</sub>O auf ihre Transformationsrate und auf Kontamination mit Antibiotikum-resistenten Bakterien getestet.

#### 2.14.5.1 Herstellung kompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode

Von einer LB-Platte (2.2.3) wurde von einer einzelnen Kolonie eine Vorkultur in 3 ml LB-Füssigmedium angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden am folgenden Tag 1-3 ml als Inokulum für eine 50 ml Flüssigkultur in LB-

Medium verwendet. Diese wurde bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 15 min auf Eis inkubiert und anschließend die Kultur in ein 50 ml Röhrchen dekantiert und die Zellen 10 min bei 4 °C und 3.500 Upm sedimentiert (Centrifuge 5810 R; Eppendorf Gerätebau, Hamburg). Der Mediums-Überstand wurde abgossen und die Zellen in 16 ml Puffer RF-1 resuspendiert. Es folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 1 h. Danach wurden die Zellen wiederum 10 min bei 4 °C und 3.500 Upm sedimentiert, der RF-1 Puffer abgossen und das Bakterienpellet vorsichtig in 4 ml Puffer RF-2 resuspendiert ohne zu vortexen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 200 µl Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Puffer RF-1:

100 mM	RbCl
50 mM	MnCl <sub>2</sub>
15 mM	CaCl <sub>2</sub>
30 mM	Kaliumacetat
15 % (w/v)	Glycerin

pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen  
sterilfiltrieren

Puffer RF-2:

10 mM	RbCl
100 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	MOPS
15 % (w/v)	Glycerin

pH 6,8 mit NaOH einstellen  
sterilfiltrieren

#### 2.14.5.2 Herstellung kompetenter Zellen nach Inoue *et al.* (1990)

Bei dieser Methode wurden bereits beim Ansetzen der Medien und auch für die Bakterienkulturen nur Glasgefäße verwendet, die zuerst mit H<sub>2</sub>O und dann leer autoklaviert worden waren, um eventuelle Spuren von Detergentien zu beseitigen. Es wurde eine 5 ml Vorkultur von *E. coli* DH5α oder XL-I Blue in SOC-Medium in einem 50 ml Gefäß über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am folgenden Tag wurden mit der gesamten Vorkultur 200 ml SOC-Medium in einem 2 l Erlenmeyer-Kolben angeimpft und bei 18 °C bis zu einer  $OD_{600}$

von 0,4-0,6 wachsen gelassen. Dann wurde die Bakterienkultur auf vier 50 ml Röhrchen aufgeteilt und bei 4.000 Upm und 4  C für 10 min abzentrifugiert (Centrifuge 5810 R; Eppendorf Gerätebau, Hamburg). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Bakterienpellets wurden in je 15 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 30 ml Suspension in einem 50 ml Röhrchen vereinigt und die Zellen wiederum 10 min bei 4.000 Upm und 4  C pelletiert. Beide Pellets wurden wieder in je 15 ml Transformationspuffer resuspendiert und unter stetigem Mischen zu jeder Suspension langsam 525 Öl DMSO gegeben. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Bakteriensuspensionen in 200 Öl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 C.

Transformationspuffer:

10 mM	PIPES
15 mM	CaCl <sub>2</sub>
250 mM	KCl
pH 6,7 mit KOH einstellen	
ad 55 mM	MnCl <sub>2</sub>
sterilfiltrieren	

SOC-Medium:

20 g/l	Select Pepton 140
5 g/l	Hefe-Extrakt
10 ml/l	1 M NaCl
2,5 ml/l	1 M KCl
10 min autoklavieren, anschließend hinzufügen:	
10 ml/l	1 M MgCl <sub>2</sub> (sterilfiltriert)
10 ml/l	1 M MgSO <sub>4</sub> (sterilfiltriert)
10 ml/l	2 M Glukose (sterilfiltriert)

#### **2.14.6 Chemische Transformation von *E. coli***

200 Öl kompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 5 Öl Ligationsansatz (2.14.4) oder 1 Öl Plasmid-Präparation (2.9.3) zugegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42  C. Der Ansatz wurde

zurück auf Eis gestellt und 1 ml SOC-Medium (2.14.5.2) zugegeben. Danach wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Die transformierten Zellen wurden nun auf LB-Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum (2.2.3) ausgestrichen. Die Platten wurden dann bei 37 °C über Nacht inkubiert, so daß die transformierten Zellen Kolonien bilden konnten. Die Vektoren pGEM-T Easy und pMAL-c2X ermöglichen eine Blau/Weiß-Selektion (Sambrook *et al.* 1989): Die Klonierungsstelle liegt im *lacZ* Gen, das das Enzym  $\beta$ -Galactosidase kodiert. Durch Induktion des *lacZ*-Promotors mit Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) wird  $\beta$ -Galactosidase gebildet und Bakterienkolonien sind in der Lage, aus dem im Medium enthaltenen synthetischen Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal) einen blauen Farbstoff freizusetzen. Bakterienzellen, die bei der Transformation einen leeren Vektor erhalten haben, erscheinen dadurch blau. Bei einer gelungenen Ligation wird das *lacZ* Gen durch das Insert unterbrochen und die  $\beta$ -Galactosidase somit inaktiviert. Positive Transformanten bilden daher weiße Kolonien. Bei sehr kleinen Inserts von nur einigen hundert Basenpaaren (z.B. bei der Klonierung von RACE-Produkten, 2.13.4) konnte allerdings gelegentlich die Inaktivierung der  $\beta$ -Galactosidase ineffizient sein, so daß alle Kolonien blau waren. Zur Blau/Weiß-Selektion wurde auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen, denen zusätzlich 100 mM IPTG und X-Gal (2% (w/v) in DMF) Stammlösungen in jeweils 1:500 Verdünnung zugesetzt waren. Die IPTG und X-Gal Lösungen waren sterilfiltriert und wurden nach dem Autoklavieren zum Medium hinzugefügt.

### **2.14.7 Herstellung elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens* Zellen**

Zur Präparation von kompetenten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen wurde eine 3 ml-Vorkultur (YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika, 2.2.3) mit einer Einzelkolonie eines *A. tumefaciens* Stammes angeimpft und über Nacht bei 28 °C im Roller inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden mit 2 ml dieser Kultur 50 ml YEB-Medium angeimpft und unter Schütteln bei 28 °C für ca. 4 h bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 angezogen. Nach der Sedimentation der Bakterienzellen für 5 min bei 4.300 Upm und 4 °C (Centrifuge 5810 R; Eppendorf Gerätebau, Hamburg) wurde das Pellet in 10 ml 0,15 M NaCl-Lösung resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Zellsediment in 1 ml eiskalter 75 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und in 200  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

### **2.14.8 Elektroporation von *Agrobacterium tumefaciens***

*Agrobacterium tumefaciens* wurde durch Elektroporation transformiert. Dazu wurden 30 µl kompetente Agrobakterien (2.14.7) auf Eis aufgetaut und mit 3 µl des zu transformierenden Plasmids vermischt. Der Ansatz wurde für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend in eine Spezialküvette gegeben, gemischt und in die Elektroporationsapparatur (Gene pulser II Pulse Controller Plus; BioRad, München) gestellt. Der Pulser wurde auf 2,5 V/ 200 kΩ/ 25 µF/ 4,6 msec eingestellt. Es wurde ein einmaliger Strompuls ausgelöst und die Küvette danach sofort auf Eis gestellt und 1 ml SOC-Medium (2.14.5.2) hinzugefügt. Der Ansatz wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 2 h bei 28 °C im Roller inkubiert. Danach wurde die Agrobakterien-Lösung auf YEB-Agarplatten (2.2.3) mit geeigneten Antibiotika ausplattiert und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

Positive Kolonien wurden durch Kolonie-PCR (2.13.3) oder, wenn auch eine Sequenzierung erwünscht war, durch Plasmid-Mini-Präparation (2.9.3.3) getestet. Da die Ausbeute v.a. große, in niedriger Kopienzahl vorliegender binärer Vektoren aus Agrobakterien sehr gering ist, mußten für eine Sequenzierung zunächst 5 µl der Plasmid-Präparation in *E. coli* retransformiert werden (2.14.6). Aus den transformierten *E. coli* Zellen konnte dann ausreichend Plasmid-DNA für eine Sequenzierung (2.13.6) gewonnen werden. Von den positiven Agrobakterien-Kolonien wurden Glycerinkulturen angelegt (2.14.9).

### **2.14.9 Bakteriendauerkultur**

Zur Anlage von Bakteriendauerkulturen positiver Klone wurden 0,2 ml Glycerin in 2 ml Schraubdeckel-Eppendorfgefäßen autoklaviert. Von einer gut gewachsenen Übernachtskultur mit Antibiotikum wurden 0,8 ml hinzugegeben und gut gemischt. Die Glycerinkulturen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

### **2.14.10 Transformation von *Arabidopsis thaliana***

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia erfolgte nach der „floral dip“-Methode (Clough & Bent 1998). Hierzu wurden zunächst *Arabidopsis*-Pflanzen ca. sechs Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen, da die Pflanzen auf diese Weise eine große Anzahl an Infloreszenzsprossen bildeten. Wenn die meisten Sprosse eine Höhe von 4-10 cm erreicht hatten, erfolgte die Transformation.

Hierzu wurde der Agrobakterien-Stamm, der das interessierende Gen in einem passenden binären Vektor enthielt, bei 25-28 °C in 500 ml YEB-Flüssigmedium (2.2.3) angezogen, das die notwendigen Antibiotika enthielt (normalerweise Kanamycin, und Rifampicin). Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6-1,0 wurde die Bakterien-Suspension auf mehrere Gefäße aufgeteilt und für 10 min bei 4300 Upm abzentrifugiert (Centrifuge 5810 R; Eppendorf Gerätebau, Hamburg). Die Pellets wurden in frisch angesetzter, unsteriler 5 % (w/v) Saccharose-Lösung resuspendiert, wieder vereinigt und die OD<sub>600</sub> der Suspension mit Saccharose-Lösung auf 0,6-0,8 eingestellt. Diese Bakterien-Suspension wurde in ein breithalsiges Becherglas überführt und als ein mildes Detergenz 0.05 % (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, USA) hinzugegeben.

Zur Transformation wurden die Pflanzen mit ihren Blütenständen in die Agrobakterien-Suspension getaucht und für 2-3 sec darin geschwenkt. Die Bakteriensuspension wurde dabei ständig langsam gerührt. Nachdem die Pflanzen abgetrocknet waren (ca. 1 h), wurden sie wieder zurück in die Klimakammer gestellt, und blieben noch für einen Tag unter einer Schutzhaube um ein zu schnelles Eintrocknen des Bakterienfilms zu verhindern. Danach wurden die *Arabidopsis*-Pflanzen normal weiter angezogen und nach ca. 3-4 Wochen die Samen geerntet. Von diesen konnten bis zu 1 % transgen sein.

Die Selektion der aus den Samen angezogenen Pflanzen erfolgte je nach verwendetem Vektor (2.2.4): Bei pCAMBIA3300-Konstrukten, die eine Resistenz gegen Glufosinat („BASTA“) trugen, wurden die Samen zur Keimung auf Komposterde ausgelegt. Ca. 3 Wochen nach der Keimung wurden die jungen Pflanzen mit einer 10 mM „BASTA“-Lösung (Agrevo, Düsseldorf) besprüht. Nach 3-4 Tagen verfärbten sich daraufhin die untransformierten Pflanzen gelblich und starben ab, wohingegen sich transgene *Arabidopsis*-Pflanzen unbeeinflusst weiterentwickelten.

Bei pBI101.3-Konstrukten diente eine vektorkodierte Kanamycin-Resistenz zur Selektion. Dazu wurden die Samen zunächst durch eine Behandlung mit Natriumhypochlorid oberflächensterilisiert. Die Sterilisation erfolgte unter einer Sterilbank. Etwa 50 µl Samen wurden in ein Eppendorfgefäß gefüllt und 3 min in Natriumhypochlorid-Lösung (6-14 % aktives Chlor, Sigma-Aldrich, Steinheim) geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren der Samen und dem Abnehmen des Hypochlorids erfolgte eine weitere Wäsche für 3 min in 70 % Ethanol. Die Samen wurden erneut abzentrifugiert und der Ethanol abgenommen. Anschließend wurde dreimal für 5 min mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen. Mit dem letzten Waschwasser wurden die Samen danach direkt auf eine Selektionsplatte mit MS-Km Medium (2.2.3) plattiert. Einige Zeit nach der Keimung waren nichttransgene Pflanzen an ihren



bleichen Keimblättern und dem gehemmten Wachstum erkennbar. Sobald die Selektion deutliche Unterschiede zwischen transgenen und nichttransgenen Pflanzen zeigte, wurden die Transformanten auf Komposterde überführt.

### **2.15 Funktionelle Expression von Membranproteinen in *Xenopus* Oocyten**

Diese Arbeiten wurden im Labor von PD Dr. Christine Struck in der Abteilung für Phytopathologie der Universität Konstanz durchgeführt und die genaue Durchführung ist in der Literatur beschrieben (Voegele *et al.* 2001). Die offenen Leseraster der betreffenden Gene wurden in den Vektor pBF1 kloniert (2.14). Das pBF1-Plasmid kodiert für eine 40 Nukleotide lange PolyA-Sequenz stromabwärts der Klonierungsstelle, die für eine effiziente Expression von Membrantransportproteinen in *Xenopus* Oocyten notwendig ist (Boorer *et al.* 1996). Von den Plasmidkonstrukten wurde *in vitro* cRNA transkribiert („mMessage mMachine Kit“; Ambion, Huntingdon, England). 30 ng cRNA wurden in operativ aus einem *Xenopus*-Weibchen entfernte Oocyten mikroinjiziert. Zur Negativkontrolle wurden Oocyten mit Wasser injiziert. Bis zu den elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Oocyten 5-6 Tage zur Regeneration bei 16 °C in Barth-Medium (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,41 mM CaCl<sub>2</sub>, 2,5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,33 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,82 mM MgSO<sub>4</sub>, 7,5 mM Tris/HCl pH 7,4) mit je 10 µg/ml Penicillin und Streptomycin gehalten. Diese Vorbereitungen wurden von C. Struck durchgeführt.

Nach der Regeneration der Oocyten und Expression des Transportproteins konnten durch Substrattransport hervorgerufene Änderungen des Membranpotentials *in vivo* über eine injizierte Mikroelektrode gemessen werden. Ei

kein negatives Membranpotential gemessen, oder es näherte sich relativ schnell 0 mV an. In diesem Fall wurde die Messung abgebrochen. War das Membranpotential für ca. 2 min stabil oder sank sogar, so wurde mit der Messung begonnen. Über ein Ventilsystem konnte dazu die die Meßkammer durchspülende Flüssigkeit geändert werden. Zuerst wurde die Meßzelle mit Transportmedium pH 5,0 äquilibriert, was bereits zu einem leichten Anstieg des Membranpotentials führte. Dann wurde die gewünschte Aminosäure (5, 0,5 oder 0,1 mM in Transportmedium pH 5,0) eingeleitet. Wenn das Substrat transportiert wurde, führte dies zu einer starken anfänglichen Depolarisation, die dann wieder zurückging und sich bei einem positiveren Membranpotential stabilisierte. Ein typischer Meßverlauf ist in Abb. 3.7 im Ergebnisteil dargestellt. Die Potentialdifferenz zwischen der Inkubation in Transportmedium pH 5,0 ohne und mit Aminosäure wurde bestimmt und relativ zur Referenzaminosäure Alanin gesetzt. Nach jeder Einzelmessung wurde die Oocytenmembran durch Spülen mit Transportmedium pH 7,5 regeneriert. War bei diesem Schritt kein Absinken des Membranpotentials feststellbar, so wurde die Oocyte verworfen. Mit einer einzelnen Oocyte konnten nacheinander etwa 3-20 verschiedene Aminosäuren oder Konzentrationen gemessen werden. Die Meßelektrode konnte mehrfach verwendet werden. Sie wurde aus der nicht mehr benötigten Oocyte gezogen und vor der nächsten Mikroinjektion sowohl unter dem Binokular als auch durch eine Widerstandsmessung auf Intaktheit und mögliche Verstopfungen untersucht. Nicht mehr benötigten Oocyten wurden zur Proteinisolation aufgeschlossen (2.6) und die Proteine später für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.8.1) und Western-Blots (2.17.2) verwendet.

### **2.16 Nachweis der Promotoraktivität durch einen histochemischen GUS-Test**

Die Aktivität und Gewebespezifität von Promotoren kann durch die Fusion mit sogenannten Reportergenen analysiert werden. Für pflanzliche Systeme ist das *GUS* Reportergen gebräuchlich, welches das bakterielle Enzym  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) kodiert. Das GUS-Protein wird in transgenen Pflanzen i.d.R. problemlos in aktiver Form exprimiert. Durch die  $\beta$ -Glucuronidase wird aus dem synthetischen Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronat (X-Gluc) ein blauer Farbstoff freigesetzt. Das Gewebe transgener Pflanzen, die ein Konstrukt enthalten, bei dem *GUS* unter Kontrolle des zu untersuchenden Promotors steht, kann mit einer X-Gluc Lösung infiltiert und so die Promotoraktivität anhand der Blaufärbung sichtbar gemacht werden.

Zur Färbung wurde eine modifizierte Methode nach Jefferson *et al.* (1987) verwendet. X-Gluc Stammlösung wurde 1:50 in GUS-Waschpuffer verdünnt und das zu untersuchende

Pflanzenmaterial wurde unter Vakuum mit dieser Lösung infiltriert. Dazu wurde an einen Exsikkator mit einer Wasserstrahlpumpe solange immer wieder Unterdruck angelegt und zwischendurch belüftet bis keine Luftblasen mehr aufstiegen und das vollständig infiltrierte Pflanzenmaterial in der Lösung zu Boden sank. Dem Waschpuffer wurden dazu 3-10 mM Kaliumferricyanid und Kaliumferrocyanid in gleichen Teilen zugesetzt, um die spontane Oxidation des möglicherweise im Gewebe diffundierenden X-Gluc und damit eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden. Zur Entwicklung der GUS-Färbung wurden die Proben bei 37 °C inkubiert. Dies geschah im Dunkeln, da X-Gluc lichtempfindlich ist. Die Inkubation konnte je nach Stärke der Promotoraktivität für einige Stunden bis zu mehreren Tagen fortgesetzt werden. Gestoppt wurde die Färbungsreaktion durch Überführen der Proben in GUS-Fixativ, worin sie für 1 h inkubiert wurden. Anschließend wurden zur besseren Visualisierung der Färbung die pflanzlichen Farbstoffe (v.a. Chlorophyll) aus dem Gewebe extrahiert. Dies geschah durch einstündige Inkubation in 75 % Ethanol, gefolgt von einer Inkubation über Nacht in 99,6 % Ethanol. Am nächsten Tag wurden die Proben zur Lagerung wieder in 75 % Ethanol überführt und waren so lange Zeit haltbar.

GUS-Waschpuffer:

50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,8
1 mM	EDTA
0,1 % (v/v)	Tween 20
3-20 mM	K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] x 3 H <sub>2</sub> O
3-20 mM	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]

X-Gluc Stammlösung: 100 mM X-Gluc in DMF

GUS-Fixativ:

50 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Essigsäure
5 % (v/v)	Formaldehyd

## 2.17 Immunologische Methoden

Mit immunologischen Methoden werden Proteine spezifisch identifiziert und lokalisiert. Dazu werden zunächst Antikörper gegen das untersuchte Protein benötigt, mit denen dann in Western-Blots bzw. durch Immunolokalisation das gewebespezifische Vorkommen des

Proteins nachgewiesen werden kann. In dieser Arbeit wurde dies für das BnAAP6-Protein durchgeführt.

### 2.17.1 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Für den immunologischen Nachweis des BnAAP6 Proteins sollte ein polyklonaler Antikörper hergestellt werden. Dazu wurden zunächst als Antigene geeignete Peptidabschnitte des Proteins ausgewählt. Als Kriterien dienten dabei zuerst eine möglichst hohe Variabilität der entsprechenden Region innerhalb der AAP-Transporterfamilie und die Lage außerhalb einer Transmembranhelix. Entsprechende Sequenzen wurden weiterhin auf ihre mögliche Antigenizität hin untersucht, die z.B. durch die Anzahl der Ladungen, das Vorhandensein oder Fehlen potentieller Glykosylierungsstellen und die wahrscheinliche Ähnlichkeit der Tertiärstruktur im vollständigen Protein und im Oligopeptid bestimmt wird. Zusätzlich wurde von der Firma Pineda Antikörper-Service (Berlin) eine Epitopanalyse durchgeführt. Es ergaben sich zwei möglicherweise geeignete Sequenzen: Der N-Terminus (Nterm) von BnAAP6 wies die höchste Antigenizität und geringste Homologie zu verwandten Proteinen auf. Eine weitere als Seq5 bezeichnete Sequenz, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer intrazellulären Schleife der Polypeptidkette liegt wies eine hohe Antigenizität aber auch Homologie zu anderen AAPs auf.:

Nterm: MEKKSMFIEQSFTDH(K)\*

Seq5: QSAKRWPDNKFITGE

\* der letzte Lysin (K)-Rest wurde bei der Konstruktion des MBP-BnAAP6-Nterm Fusionsproteins (s.u.) weggelassen.

Zur Antikörpergewinnung wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zuerst wurden zwei Oligonukleotide synthetisiert (Carl Roth, Karlsruhe), die den beiden Strängen der für das Peptid Nterm kodierenden DNA-Sequenz entsprachen (ANTI-1 und ANTI-2, Tab. 2.1). Diese Oligonukleotide wurden zu doppelsträngiger DNA zusammengelagert und in den mit *SacI* und *HindIII* linearisierten (2.14.1) Vektor pMAL-c2X ligiert (2.14.4). Dadurch wurde das kodierte Peptid im korrekten Leseraster C-terminal an Maltose-Bindeprotein (MBP) aus *E. coli* fusioniert. Zum Annealing wurden je 1 µl Oligonukleotid (100 pmol/µl) mit 10 µl 5 x PNK-Puffer (Promega, Mannheim) und 38 µl H<sub>2</sub>O gemischt und der Ansatz zunächst für 2 min bei 85 °C denaturiert. Danach erfolgte das Annealing bei 65 °C für 5 min und eine Inkubation bei 37 °C ebenfalls für 15 min. Die zusammengelagerten Oligos wurden

anschließend durch das Anfügen von Phosphatresten an die freien 5' Enden für die Ligation vorbereitet: 3,5 µl angelagerte Oligonukleotide wurden mit 2 µl 5 x PNK-Puffer, 0,5 µl T4 Polynukleotidkinase (PNK) (19 U/µl; Promega, Mannheim), 0,5 µl 10 mM ATP und 3,5 µl H<sub>2</sub>O gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. In zwei separaten Ligationsansätzen mit unterschiedlichen Insert/Vektor-Verhältnissen wurden je 1 µl angelagerte phosphorylierte Oligonukleotide entweder mit 0,25 µl (ca. 0,125 µg) Vektor und 2,75 µl H<sub>2</sub>O oder mit 1 µl (ca. 0,5 µg) Vektor und 2 µl H<sub>2</sub>O versetzt und 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde zu beiden Ansätzen je 1 µl 10 x Ligasepuffer, 0,5 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl; Promega, Mannheim) und 4,5 µl H<sub>2</sub>O gegeben. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 15 °C.

Die Ligationsansätze wurden zur Expression des Fusionsproteins in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (2.14.6) und die Expression mit 1 mM IPTG in einer Bakterienkultur induziert. Aus den Bakterienzellen wurde das Gesamtprotein isoliert (2.6) und in einer SDS-PAGE mit Gesamtprotein aus BL21 (DE3) Zellen ohne Vektor verglichen (2.8.1). Eine nur in Fusionsprotein exprimierenden Zellen auftretende deutliche Bande in der erwarteten Größe von 45 kDa wurde in einer präparativen SDS-PAGE mit anschließender KCl-Färbung und Gelelution (2.8.4) aufgereinigt. Das erhaltene Protein wurde zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

Ein deutlicher Nachteil dieser Methode bestand darin, daß das Verhältnis von antigenem Peptid zu Trägerprotein nur 1:1 betrug, so daß ein großer Teil der erhaltenen polyklonalen Antikörper gegen MBP und nicht BnAAP6 gerichtet war. Es wurden deshalb außerdem die Peptide Nterm und Seq5 synthetisch hergestellt und über einen zusätzlichen C- (Nterm) bzw. N-terminalen (Seq5) Cysteinrest mit KLH (Keyhole Limpid Hemocyanine) als Trägerprotein chemisch gekoppelt. Über eine chemische Kopplung konnten jeweils mehrere antigene Peptidmoleküle an ein Trägerproteinmolekül gebunden werden. Auch mit diesen KLH-Fusionsproteinen wurden Kaninchen immunisiert.

Bei allen drei Antigenen wurden jeweils drei Kaninchen mit 200 µg Protein injiziert und nach 30 Tagen mit weiteren 100 µg Protein erneut injiziert (geboostet). Antiserenproben (1,5 ml) wurden am 1. (= Präimmunserum), 30., 61., 90. und 120. (nur KLH-Antigene) Tag nach der Erstinjektion entnommen. Die mit MBP-Antigen immunisierten Kaninchen wurden am 120. Tag, die mit KLH-Antigenen immunisierten Tiere am 150. Tag getötet und ausgeblutet. Die Gesamtmenge gewonnenen Immunsersums betrug etwa 75 ml. Je 50 ml der anti-KLH-Nterm-Immunsereen wurden über eine Affinitätssäule (Peptid Nterm gekoppelt an Sepharose 4B) gereinigt (monospezifische Fraktionen). Die Synthese der Nterm und Seq5 Peptide,

Immunisierung der Kaninchen und Affinitätsreinigung der Antiseren wurde von der Firma Pineda Antikörper-Service (Berlin) durchgeführt.

### 2.17.2 Western-Blot

Analog zum Southern und Northern Blot für DNA bzw. RNA wird beim Western Blot ein einzelnes Protein spezifisch in einem Gemisch nachgewiesen, das zuvor gelektrophoretisch aufgetrennt und zur Fixierung auf eine Membran übertragen (geblottet) wurde. Der Nachweis erfolgt in diesem Fall durch spezifische Antikörper.

Die Protein-Proben wurden zuerst durch eine SDS-PAGE (2.8.1) aufgetrennt, danach wurde das Sammelgel abgeschnitten und das Trenngel in die Western-Blot-Apparatur eingespannt. Sowohl die SDS-PAGE als auch das Blotten erfolgten dabei in einer Mini Protean 3 Kammer (BioRad, München). In einer Spannhalterung wurden in der Reihenfolge, die in der Blotkammer später der Flußrichtung von der Kathode (-) zur Anode (+) entsprach, ein Tuch, ein Filterpapier, das Gel, eine entsprechend zugeschnittene Nitrozellulosemembran (Hybond; Amersham Biosciences, Freiburg), ein weiteres Filterpapier und noch ein Tuch übereinandergelegt. (Tücher und Filterpapiere waren im Mini Protean 3 System enthalten). Die Halterung wurde geschlossen und in die Blotkammer gesteckt. Filter und Nitrozellulosemembran waren vorher mit Blotpuffer angefeuchtet worden und der gesamte Aufbau erfolgte in Blotpuffer, um Luftblasen zwischen den Schichten zu vermeiden. Der Transfer erfolgte in der mit Blotpuffer gefüllten Kammer für 50 min und 60 V bei maximaler Stromstärke (Consort E 865; Scie-Plas, Southam, England). Zur Kühlung wurde in die Kammer ein eisgefülltes Kühlaggregat gestellt.

Blotpuffer:	25 mM	Tris (pH nicht eingestellt)
	192 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol

Zur Überprüfung des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran anschließend in Ponceau-Rot Färbelösung angefärbt. Diese fixiert gleichzeitig die Proteine. Dazu wurde die Membran 2 min in die Färbelösung gelegt und dann 3-4 x mit H<sub>2</sub>O gespült, bis die Proteine als rote Banden sichtbar waren. Die Größenstandard-Banden wurden mit einem Kugelschreiber markiert. Die Ponceau-Färbung ist reversibel und durch weiteres Spülen mit Wasser wurde die Membran weitestgehend wieder entfärbt. Letzte Reste von Ponceau-Rot verschwanden dann während den nachfolgenden Inkubationen.

Ponceau-Rot Färbelösung:

2 % (w/v)	Ponceau S
3 % (w/v)	Trichloressigsäure

Als nächstes wurde die Nitrozellulosemembran für mindestens 2 h bis über Nacht in Blockpuffer auf einem Kippschüttler (Polymax 1040; Heidolph, ORT) inkubiert um überschüssige Bindungskapazitäten abzusättigen. Das Blocken erfolgte bei RT oder bei 4 °C, wenn über Nacht inkubiert wurde. Erst danach wurde 45 min bei RT mit primärem (proteinspezifischem) Antikörper inkubiert. Zur Verringerung von Hintergrundsignalen erfolge auch diese Inkubation in (frischem) Blockpuffer; der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Anschließend wurde der Blot einmal kurz und viermal für 4 min in TBS-T gewaschen, um nicht oder unspezifisch gebundene IgG-Moleküle zu entfernen. Als sekundärer Antikörper diente Peroxidase-gekoppeltes Protein A (EIA Grade Protein A-Horseradish Peroxidase Conjugate; BioRad, München) 1:3.000 in TBS-T verdünnt. Protein A aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* bindet unspezifisch an Wirbeltier-Immunglobuline (Boyle & Reis 1987). Auch diese Inkubation erfolgte für 45 min bei RT. Danach wurde nochmals einmal kurz und dreimal für 4 min mit TBS-T und schließlich einmal für 10 min mit TBS gewaschen.

TBS:            50 mM        Tris/HCl pH 7,5  
                  150 mM       NaCl

TBS-T:        0,1 % (v/v)   Triton-X-100  
                  in TBS

Blockpuffer: 3 % (w/v)    Trockenmilchpulver (Carl Roth, Karlsruhe)  
                  in TBS-T

Der Nachweis des primären Antikörpers und damit des gesuchten Proteins erfolgte über die an das Protein A gebundene Peroxidase. Sie katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wodurch Luminol zur Lichtemission angeregt wird. Verstärkt wird diese Reaktion durch Phenole. Die Halbwertszeit der Reaktion beträgt ca. 1 h. Diese Methode wird als „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL) bezeichnet. Die Lichtemission kann schließlich durch das Auflegen eines Filmes detektiert werden.

Die Nitrozellulosemembran wurde mit der Proteinseite nach oben auf eine Glasplatte gelegt und darauf frisch zusammengemischte ECL-1 und ECL-2 Lösung (1:1) (Amersham Biosciences, Freiburg) gegeben. Nach 1 min wurde die Flüssigkeit durch Abgießen und seitliches Absaugen mit Zellstoff wieder entfernt und die Membran luftblasenfrei mit Haushaltsfolie bedeckt. Anschließend wurde sofort für 1 min ein Film (Hyperfilm; Amersham Biosciences, Freiburg) aufgelegt. Je nach der Signalstärke auf diesem Film wurden ein oder mehrere weitere Filme mit angepassten Expositionszeiten von 10 sec bis zu 1 h aufgelegt. Die Filmentwicklung erfolgte in einem Optima Typ TR (MS Laborgeräte, Wiesloch).

### 2.17.3 Immunohistochemischer Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten

#### 2.17.3.1 Einbettung von Pflanzengewebe in Methacrylat

Blätter von jungen, in 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Hydrokulturlösung angezogenen *Brassica napus* Pflanzen der Sorte Lirajet wurden geerntet und mit einer frischen Rasierklinge in ca. 1 x 5 mm große Stücke zerteilt. Ca. 30-40 solcher Gewebestücke wurden in 3 ml Fixierungslösung (Ethanol:Essigsäure 3:1, v/v) in einem Exsikkator infiltriert, an den ein Wasserstrahlvakuum angelegt wurde. Dieses wurde so lange beibehalten, bis keine Luftblasen mehr aus den Proben aufstiegen. Die Fixierungslösung wurde erneuert und die Proben für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal 30 min und dann über Nacht mit 75 % techn. Ethanol, 1 mM DTT gewaschen. Am nächsten Tag erfolgte die Entwässerung der Proben über eine Ethanolreihe. Hierzu wurde das Gewebe jeweils 20 min mit 80, 85, 90, 95 % techn. Ethanol, 1 mM DTT und anschließend zweimal 20 min mit 99,6 % Ethanol, 1 mM DTT behandelt. Danach wurde der Ethanol schrittweise bei 4 °C durch Methacrylat-Mix ersetzt:

Dauer	Lösung	Mischungsverhältnis
über Nacht	Methacrylat-Mix:Ethanol	1:2 (v/v)
6 h	Methacrylat-Mix:Ethanol	1:1 (v/v)
über Nacht	Methacrylat-Mix:Ethanol	2:1 (v/v)
über Nacht	Methacrylat-Mix	
6 h	Methacrylat-Mix	
über Nacht	Methacrylat-Mix	

Zur Polymerisation wurden die Proben in ultradünne, zur Hälfte mit Methacrylat-Mix gefüllte 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße überführt und mit einer Präpariernadel positioniert. Das



Auspolymerisieren erfolgte für 18 h bei 4 °C durch Bestrahlung der Proben von unten mit UV-Licht (310 nm, ca. 10 cm Abstand).

Methacrylat-Mix:    75 % (v/v)    Butyl-Methacrylat  
                          25 % (v/v)    Methyl-Methacrylat  
                          0,5 % (w/v)   Ethylbenzoin  
                          10 mM         DTT  
                          vor jedem Gebrauch 15 min mit N<sub>2</sub> entgasen

### 2.17.3.2 Herstellung von Dünnschnitten

Von den in Methacrylat eingebetteten Objekten wurden an einem Ultramikrotom (Ultracut R; Fa. Leica, Bensheim) mit Glasmessern 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (Histobond; Fa. Marienfeld, Lauda-Königshofen) aufgebracht. Das Antrocknen erfolgte bei 40 °C. In diesem Zustand konnten die Schnitte für nahezu unbegrenzte Zeit bei 4 °C gelagert werden.

### 2.17.3.3 Behandlung der Schnitte mit Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen

Die Objektträger mit den Schnitten wurden in ein Becherglas gestellt und zum Entfernen des Methacrylats für 2 min in Aceton inkubiert. Die Rehydrierung erfolgte in einer Ethanolserie (100, 70, 30 %) mit Inkubationszeiten von je 30 sec. Anschließend wurden die Objektträger für 30 sec in TBS-Puffer und dann für 45 min in Blockpuffer stehen gelassen. Die Objektträger wurden nun auf der Unterseite gut abgetrocknet und auf die Schnitte Deckgläschen plaziert, die durch an den Ecken angebrachte Knetgummi-Stückchen etwas Abstand zum darunterliegenden Objektträger besaßen. In diesen Spalt wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in Blockpuffer pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht.

Am folgenden Tag wurden die Deckgläschen entfernt und die Objektträger in Bechergläsern dreimal für 10 min mit Blockpuffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 1 h mit dem sekundären Antikörper. Dies war Anti-Rabbit IgG-Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-Isomer 1-Konjugat (Sigma-Aldrich, Steinheim) 1:300 verdünnt mit Blockpuffer. Da der Fluoreszenzfarbstoff FITC lichtempfindlich ist, fand die Inkubation und anschließende Wäsche im Dunkeln statt. Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch eine Wäsche für fünfmal 5 min in Blockpuffer entfernt. Um alle Reste des Trockenmilchpulvers von den

Objektträgern zu beseitigen, folgten noch drei weitere Waschschrirte in H<sub>2</sub>O. Zum schnelleren Trocknen der Proben wurden die Objektträger zum Abschluß kurz in 99,6 % Ethanol getaucht. Zuletzt wurde ein Wassertropfen auf den Objektträger gegeben und die Schnitte mit Deckgläschen bedeckt. Die FITC-Fluoreszenz wurde durch Betrachtung der Schnitte in einem Fluoreszenz-Mikroskop mit Videokamera (BX51; Olympus, Hamburg) detektiert. Die Anregung erfolgte bei 450-490 nm.

TBS:            50 mM            Tris/HCl pH 7,5  
                  150 mM           NaCl

Blockpuffer: 1 % (w/v)    Trockenmilchpulver (Carl Roth, Karlsruhe) in TBS

## **2.18 Computergestützte Analyseverfahren**

### **2.18.1 Sequenzanalyse von DNA und Proteinen**

Für die Suche und den Vergleich von öffentlich zugänglichen Sequenzen wurden die GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, „BLAST“, Altschul *et al.* 1990) und die Datenbank des EMBL (<http://www.embl-heidelberg.de/Services/index.html>) genutzt. Bei der EMBL-Datenbank erfolgte auch die Veröffentlichung der in dieser Arbeit isolierten Sequenzen.

Die Analyse von DNA- und Proteinsequenzen erfolgte im wesentlichen mit der Version 9.1 des Wisconsin Package der Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA. Hierzu gehören u.a. Programme, mit denen Nukleotid- oder Aminosäure-Sequenzen paarweise verglichen (bestfit, gap) oder sogenannte Alignments von Sequenzgruppen erstellt werden können (pileup) und ein Programm (map), das Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen übersetzt und Restriktionsschnittstellen identifiziert. Nähere Beschreibungen der einzelnen Funktionen sind unter der Internet-Adresse <http://gcg.gwdg.de> abrufbar. Zur Untersuchung der Proteinsequenz auf mögliche zelluläre Lokalisationssignale dienten:

1. PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>)
2. TARGETP 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>)

Zur Untersuchung von Promotorsequenzen auf mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurden drei verschiedene Online-Ressourcen genutzt:

1. TRANSFAC (<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC>)
2. TFSEARCH (<http://pdap1.trc.rwcp.or.jp/research/db/TFSEARCH.html>)
3. PROMOTER SCAN II (<http://www.molbiol.ox.ac.uk/promoterscan.htm>)

### 2.18.2 Untersuchungen zur Proteinstruktur

Neben der reinen Primärstruktur sind Informationen über die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur von Proteinen sehr wichtig, da von diesen auf mögliche Funktionen und Eigenschaften geschlossen werden kann. Hier war v.a. die Analyse von putativen transmembranen  $\alpha$ -Helices wichtig.

Als Online-Ressource wurde das Programm PredictProtein (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein>) genutzt. Zur Erstellung von Hydropathie-Diagrammen diente der Protein Hydrophilicity Search and Comparison Server des Weizmann Institute of Science, Israel (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/index.html>). Desweiteren wurden diverse Proteinanalyse-Programme des Wisconsin Package der Genetics Computer Group (GCG) verwendet.

### 2.19 Statistische Auswertung der Experimente

Angegeben wurden entweder Ergebnisse, die den typischen Verlauf aller durchgeführten Experimente wiedergeben oder zusammengefaßte Ergebnisse. Im letzteren Fall wurde der arithmetische Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ( $n$ ) betrug mindestens 3, wenn dieses nicht anders im Text beschrieben ist.

$$\text{Mittelwert} = \frac{\Sigma \text{ Einzelmessungen}}{\text{Anzahl der Einzelmessungen (n)}}$$

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Feldversuche zur Variabilität der Stickstoffnutzung und -verteilung in *B. napus*

Zur Untersuchung der Variabilität der Stickstoffnutzung bei Raps wurden von 1999-2002 doppelt haploide (DH-) Linien aus einer Kreuzung der Winterrapsorten Apex und Mohican, sowie die beiden Elternsorten unter zwei verschiedenen Stickstoffbedingungen ( $N_0 = 0$  und  $N_{240} = 240 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ ) angebaut. DH-Linien wurden verwendet, weil sie für jedes Allel homozygot sind. In den Anbauperioden 1999/2000 und 2000/2001 wurden 45 DH-Linien verglichen, 2001/2002 acht (DH4, 5, 15, 18, 28, 29, 33 und 42). Diese acht DH-Linien waren aufgrund ihres extremen Verhaltens bezüglich verschiedener, aus züchterischer Sicht interessanter Merkmale ausgewählt worden. Die Elternsorten waren in allen drei Anbaujahren unter den Versuchspflanzen. Von jeder Linie und beiden N-Düngungsstufen wurden je zwei Versuchsreihen angelegt. In den Blättern wurden die Gesamt-Aminosäuregehalte, Nitratreduktaseaktivitäten (NRA) und Nitratgehalte bestimmt. Daten zum Proteingehalt der Samen der Versuchspflanzen wurden freundlicherweise von Prof. Becker (Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.1 faßt die Ergebnisse der Feldversuche zusammen. Die Proteingehalte im Samen variierten zwischen 12,9 und 16,8 %<sub>TG</sub> bei  $N_0$  und zwischen 17,8 und 21,3 %<sub>TG</sub> bei  $N_{240}$ , mit Mittelwerten von  $14,8 \pm 0,8$  bzw.  $19,2 \pm 0,9$  %<sub>TG</sub>. Die Blatt-Aminosäuregehalte lagen zwischen 4,8-17 ( $N_0$ ) und 12-24  $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  ( $N_{240}$ ) mit Mittelwerten von  $9,9 \pm 3,2$  ( $N_0$ ) und  $16,4 \pm 2,5$   $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  ( $N_{240}$ ). Blattproben von bei  $N_0$ -Bedingungen gewachsenen Pflanzen wiesen Nitratreduktaseaktivitäten von 11-47  $\text{nmol g}_{\text{FG}}^{-1} \text{ min}^{-1}$  auf (Mittelwert  $25,7 \pm 9,3$ ). Bei den  $N_{240}$ -Pflanzen lagen diese Werte in einem Bereich von 27-99  $\text{nmol g}_{\text{FG}}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , mit einem Mittelwert von  $60,6 \pm 15,5$ . Die Blatt-Nitratgehalte dieser Pflanzen variierten zwischen 8 und 19  $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  (Mittelwert:  $14,6 \pm 3,8$ ). Bei den  $N_0$ -Pflanzen wurden Nitratgehalte von  $<0,1$  bis 3  $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  gemessen, mit einem Mittelwert von  $0,1 \pm 0,1$   $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$ .

**Tabelle 3.1 (nächste Seite): Ergebnisse der Feldversuche zur Stickstoffnutzung bei Winterraps.** Blatt-Aminosäuregehalt, Blatt-Nitratreduktaseaktivität und Samen-Proteingehalt sind jeweils als Mittelwerte über alle Anbaujahre angegeben. Durch Fettdruck und graue Hinterlegung hervorgehobene Werte sind Mittelwerte aus drei, die nicht hervorgehobenen Daten Mittelwerte aus zwei Jahren. Gesamtmittelwerte für alle Sorten  $\pm$  Standardabweichungen.

Tab. 3.1: Ergebnisse der Feldversuche. (Legende auf S. 93)

Linie	Aminosäuregehalt im Blatt ( $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$ )		Nitratreduktase- Aktivität im Blatt ( $\text{nmol g}_{\text{FG}}^{-1} \text{min}^{-1}$ )		Nitratgehalt im Blatt ( $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$ )		Proteingehalt im Samen (% $\text{TG}$ )	
	N <sub>0</sub>	N <sub>240</sub>	N <sub>0</sub>	N <sub>240</sub>	N <sub>0</sub>	N <sub>240</sub>	N <sub>0</sub>	N <sub>240</sub>
DH 1	9,5	15,0	28,9	49,0	<0,1	12,4	13,8	18,0
DH 2	5,7	13,0	23,6	77,3	<0,1	11,3	14,4	18,9
DH 3	5,3	14,0	26,4	59,3	<0,1	13,5	13,8	17,8
DH 4	<b>9,6</b>	<b>16,0</b>	<b>23,7</b>	<b>55,3</b>	<b>&lt;0,1</b>	<b>14,5</b>	<b>12,9</b>	<b>17,8</b>
DH 5	<b>13,5</b>	<b>16,0</b>	<b>31,4</b>	<b>28,0</b>	<b>0,2</b>	<b>19,1</b>	<b>15,4</b>	<b>19,0</b>
DH 6	8,5	12,0	23,3	56,7	<0,1	11,8	13,6	17,8
DH 7	9,8	18,0	14,8	68,1	<0,1	21,4	15,7	20,0
DH 8	14,3	17,0	46,7	79,0	0,1	10,3	15,0	19,0
DH 9	9,6	21,0	11,3	74,1	<0,1	16,0	14,6	18,3
DH 10	13,0	17,0	36,5	76,6	<0,1	13,0	14,3	19,5
DH 11	4,8	13,0	45,9	62,6	<0,1	7,6	14,6	18,8
DH 13	6,0	16,0	25,4	61,3	<0,1	17,4	15,5	20,8
DH 14	6,7	17,0	16,3	79,2	<0,1	12,1	15,6	20,0
DH 15	<b>17,0</b>	<b>20,0</b>	<b>38,3</b>	<b>46,6</b>	<b>0,1</b>	<b>10,9</b>	<b>16,1</b>	<b>20,9</b>
DH 16	8,4	15,0	30,9	69,6	<0,1	11,0	14,0	17,8
DH 17	5,3	20,0	27,2	48,4	<0,1	18,0	15,1	19,6
DH 18	<b>10,8</b>	<b>16,0</b>	<b>21,0</b>	<b>49,6</b>	<b>&lt;0,1</b>	<b>18,9</b>	<b>14,5</b>	<b>19,0</b>
DH 19	7,3	16,0	22,4	59,3	0,1	14,9	14,8	18,6
DH 25	17,0	14,0	23,7	68,6	0,2	18,8	15,8	19,8
DH 27	10,7	25,0	20,2	39,6	<0,1	14,2	16,8	21,3
DH 28	<b>13,3</b>	<b>22,0</b>	<b>30,7</b>	<b>74,5</b>	<b>0,2</b>	<b>10,5</b>	<b>14,7</b>	<b>19,7</b>
DH 29	<b>10,5</b>	<b>19,0</b>	<b>23,2</b>	<b>65,8</b>	<b>&lt;0,1</b>	<b>15,8</b>	<b>13,7</b>	<b>18,4</b>
DH 30	14,6	17,0	19,6	68,4	<0,1	11,2	16,0	19,7
DH 31	11,5	14,0	26,5	47,9	<0,1	18,0	14,5	18,4
DH 32	6,7	19,0	35,0	59,4	0,1	8,6	13,6	18,4
DH 33	<b>11,5</b>	<b>16,0</b>	<b>29,3</b>	<b>36,7</b>	<b>0,1</b>	<b>15,3</b>	<b>14,0</b>	<b>18,6</b>
DH 34	12,8	17,0	31,1	98,9	<0,1	17,4	15,2	19,5
DH 35	11,3	16,0	36,2	55,5	0,1	12,0	15,6	19,9
DH 36	7,7	13,0	20,7	75,2	<0,1	17,9	14,6	18,4
DH 37	10,0	15,0	22,7	48,8	0,1	18,8	14,7	19,6
DH 40	6,0	14,0	28,5	65,9	<0,1	17,0	14,7	18,7
DH 41	6,8	16,0	38,5	82,6	0,1	17,9	14,1	18,2
DH 42	<b>12,8</b>	<b>18,0</b>	<b>52,1</b>	<b>54,5</b>	<b>0,1</b>	<b>12,6</b>	<b>15,9</b>	<b>20,0</b>
DH 43	10,1	11,0	16,2	51,3	0,1	17,5	15,1	19,5
DH 44	9,3	13,0	28,6	69,3	0,1	28,8	14,6	18,9
DH 45	6,2	12,0	16,0	72,6	0,1	12,2	14,8	18,5
DH 47	8,3	14,0	32,7	27,2	0,1	12,5	14,0	18,4
DH 48	7,4	15,0	19,7	63,2	0,1	13,5	15,4	19,8
DH 49	7,8	22,0	42,6	57,2	0,2	11,5	15,1	20,1
DH 50	10,7	16,0	36,1	38,3	0,1	14,1	15,7	20,1
DH 52	10,1	15,0	13,8	69,3	0,3	12,7	15,3	19,7
DH 53	13,8	19,0	37,7	67,4	0,1	13,1	14,9	20,0
DH 59	11,9	14,0	15,6	48,3	0,1	12,0	15,1	20,7
DH 69	5,6	12,0	22,2	48,9	0,1	14,9	13,7	18,8
DH 70	11,0	13,0	35,0	49,9	0,1	12,4	16,2	20,6
Apex	<b>12,3</b>	<b>17,0</b>	<b>34,8</b>	<b>73,8</b>	<b>0,1</b>	<b>18,5</b>	<b>14,5</b>	<b>19,7</b>
Mohican	<b>14,8</b>	<b>18,0</b>	<b>50,1</b>	<b>41,9</b>	<b>0,2</b>	<b>11,1</b>	<b>14,1</b>	<b>18,4</b>
Mittelwert	<b>9,9 ± 3,2</b>	<b>16,1 ± 3,0</b>	<b>28,4 ± 9,8</b>	<b>60,0 ± 14,8</b>	<b>0,1 ± 0,1</b>	<b>14,6 ± 3,8</b>	<b>14,8 ± 0,8</b>	<b>19,2 ± 0,9</b>

Eine höhere Stickstoffversorgung führte bei allen untersuchten Rapslinien zu einem Anstieg in jedem getesteten Parameter des Stickstoffhaushalts. Außerdem nahm bei höherem N-Angebot die Standardabweichung aller Parameter relativ zum Mittelwert ab, d.h. die relative Variabilität zwischen den Sorten war geringer.

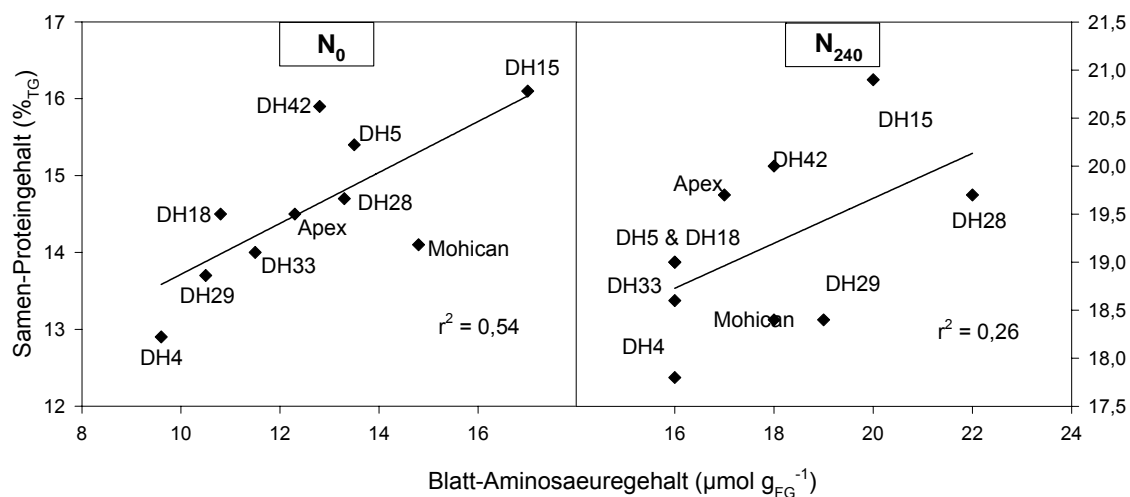
Alle gemessenen Parameter wurden jeweils paarweise durch lineare Regression auf mögliche Zusammenhänge getestet (Tab. 3.2). Dabei zeigte sich lediglich für die Proteingehalte im Samen bei  $N_0$  und  $N_{240}$  ein Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von  $r^2 = 0,72$ . Das heißt, daß im Mittel Sorten, die bei niedriger N-Versorgung mehr Protein im Samen akkumulierten, dies auch bei hoher N-Versorgung taten. Für den Nitrat- und Aminosäuregehalt sowie die NRA in den Blättern ergab sich kein Zusammenhang zwischen  $N_0$  und  $N_{240}$ . Diese Parameter veränderten sich also in verschiedenen Sorten sehr unterschiedlich in Reaktion auf ein erhöhtes Stickstoffangebot.

**Tabelle 3.2: Korrelationen zwischen Parametern des Stickstoffhaushalts.** Die Korrelationen zwischen verschiedenen gemessenen Parametern wurden jeweils durch lineare Regression analysiert. Die rechten zwei Spalten zeigen die Ergebnisse für den reduzierten Datensatz aus den in allen drei Anbaujahren getesteten Sorten. Angegeben sind Steigung (m) und Bestimmungsmaß ( $r^2$ ) für jede Regression. Der einzige signifikante Zusammenhang ist durch Fettdruck und graue Hinterlegung hervorgehoben.

Faktor	Variable	alle Linien		8 DH- & Elternlinien	
		m	$r^2$	m	$r^2$
Aminosäuregehalt $_{N_0}$	Nitratreduktaseaktivität $_{N_0}$	0,1	0,08	0,1	0,40
Aminosäuregehalt $_{N_{240}}$	Nitratreduktaseaktivität $_{N_{240}}$	0,0	0,05	0,1	0,28
Aminosäuregehalt $_{N_0}$	Nitratgehalt $_{N_0}$	0,3	0,51	19,0	0,37
Aminosäuregehalt $_{N_{240}}$	Nitratgehalt $_{N_{240}}$	0,1	0,01	-0,4	0,53
Nitratreduktaseaktivität $_{N_0}$	Nitratgehalt $_{N_0}$	0,1	0,01	49,7	0,11
Nitratreduktaseaktivität $_{N_{240}}$	Nitratgehalt $_{N_{240}}$	0,4	0,01	-0,7	0,02
Proteingehalt $_{N_0}$	Aminosäuregehalt $_{N_0}$	0,1	0,12	0,3	0,54
Proteingehalt $_{N_{240}}$	Aminosäuregehalt $_{N_{240}}$	0,1	0,14	0,2	0,26
Proteingehalt $_{N_0}$	Nitratreduktaseaktivität $_{N_0}$	0,0	0,00	0,0	0,27
Proteingehalt $_{N_{240}}$	Nitratreduktaseaktivität $_{N_{240}}$	0,0	0,01	0,0	0,03
Proteingehalt $_{N_0}$	Nitratgehalt $_{N_0}$	3,6	0,06	5,8	0,17
Proteingehalt $_{N_{240}}$	Nitratgehalt $_{N_{240}}$	0,0	0,00	-0,1	0,07
Aminosäuregehalt $_{N_{240}}$	Aminosäuregehalt $_{N_0}$	0,3	0,09	0,5	0,24
Nitratreduktaseaktivität $_{N_{240}}$	Nitratreduktaseaktivität $_{N_0}$	-0,2	0,01	-0,2	0,02
Nitratgehalt $_{N_{240}}$	Nitratgehalt $_{N_0}$	-3,0	0,00	-7,1	0,02
<b>Proteingehalt<math>_{N_{240}}</math></b>	<b>Proteingehalt<math>_{N_0}</math></b>	1,0	<b>0,72</b>	0,8	<b>0,78</b>

Auch untereinander zeigten die verschiedenen Parameter des Stickstoffmetabolismus keine signifikanten Abhängigkeiten: Der Aminosäuregehalt der Blätter hing weder von der N-Assimilationsrate (NRA) noch vom Nitratgehalt ab. Auch die Nitratreduktaseaktivität war nicht abhängig vom Nitratgehalt der Blätter. Der Proteingehalt im Samen war weder bei  $N_0$  noch bei  $N_{240}$  signifikant von den drei anderen Parametern beeinflusst.

Da die Auswirkungen jahresabhängiger Klima-Unterschiede mögliche Zusammenhänge zwischen den gemessenen Größen des Stickstoffhaushalts überdecken könnten, wurden dieselben Regressionsanalysen auch nur für die Daten der zehn in allen drei Jahren angebauten Sorten (acht DH-Linien und die Elternsorten) durchgeführt. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3.2 dargestellt. In fast allen Fällen erhöhte sich durch die Einschränkung des Datensatzes das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  der Regression, aber auch hier war nur für die Proteingehalte der Samen bei  $N_0$  und  $N_{240}$  ein signifikanter Zusammenhang auszumachen. Zumindest als Tendenz ist erkennbar, daß bei  $N_0$  der Proteingehalt im Samen mit dem Aminosäuregehalt im Blatt ansteigt (Abb. 3.1) und bei  $N_{240}$  die Nitrat- und Aminosäuregehalte des Blattes negativ korrelieren.



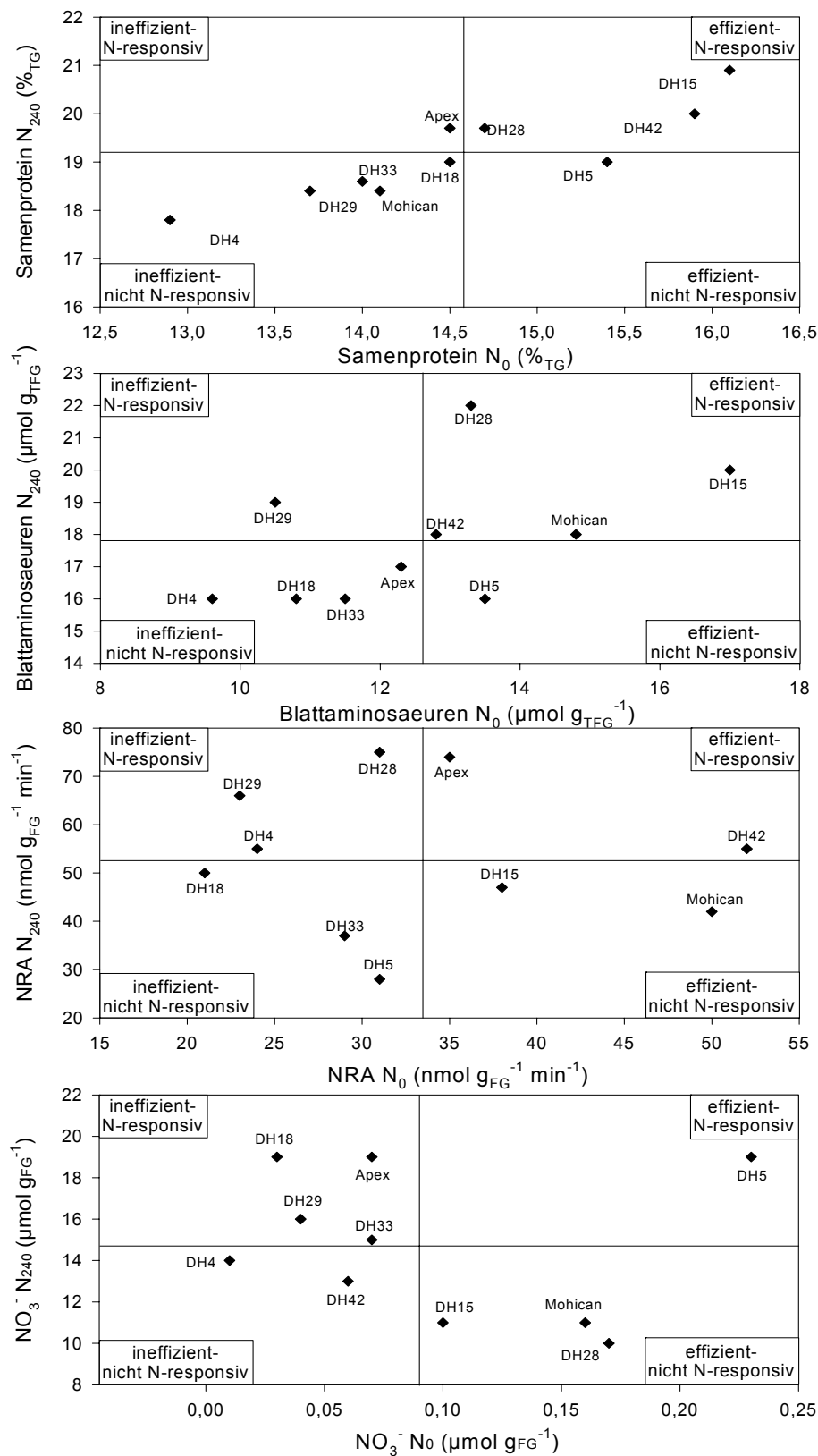
**Abb. 3.1: Samen-Proteingehalt in Abhängigkeit vom Blatt-Aminosäuregehalt.** Dargestellt sind die Daten der acht ausgewählten DH-Linien und zwei Elternsorten, die in allen drei Versuchsjahren angebaut wurden. Regressionsgeraden und Bestimmtheitsmaße sind eingezeichnet.

Zur Beurteilung einzelner Sorten erlaubt eine graphische Auftragung der  $N_{240}$ - gegen die  $N_0$ -Werte für jeden Parameter eine Zuordnung zu einer von vier Kategorien (Kessel 2000): N-ineffiziente Sorten liegen bei niedriger N-Versorgung über dem Sortendurchschnitt, N-ineffiziente darunter. N-responsive Sorten reagieren auf ein erhöhtes N-Angebot mit einer verstärkten N-Akkumulation bzw. stärkerer Nitratreduktaseaktivität und weisen Werte größer als der Mittelwert auf. Nicht N-responsive Sorten bleiben bei  $N_{240}$  unter dem Mittel. Unter diesem Gesichtspunkt sagt eine signifikante Korrelation in der Regressionsanalyse aus, daß bezüglich dieses Parameters fast alle Sorten in die Kategorien ineffizient/nicht N-responsiv oder effizient/N-responsiv fallen. Bei einer nicht signifikanten Korrelation der  $N_0$  und  $N_{240}$ -Werte sind auch einige Sorten bei geringer N-Versorgung effizient, reagieren aber unterdurchschnittlich auf eine erhöhte N-Düngergabe, während andere Sorten so extrem auf die höhere Stickstoffmenge reagieren daß sie bei  $N_0$  unter dem Sortendurchschnitt liegen und bei  $N_{240}$  darüber. Diese Zusammenhänge sind in Abb. 3.2 (S. 98) dargestellt. Es zeigte sich dabei, daß die Hälfte der in allen Anbauperioden untersuchten zehn Linien bezüglich der N-Effizienz eine große Konstanz aufwies und in allen vier getesteten Parametern dasselbe Verhalten zeigte (Tab. 3.3).

**Tabelle 3.3: Reaktion ausgewählter Rapssorten auf ein erhöhtes Stickstoffangebot.** Einteilung der Rapssorten in ineffiziente/effiziente und nicht N-responsive/N-responsive Sorten nach Abb. 3.2. Konstantes Verhalten in allen vier Parametern ist durch graue Hinterlegung und Fettdruck hervorgehoben.

	<b>Nitratgehalt im Blatt</b>	<b>NRA im Blatt</b>	<b>Aminosäuregehalt im Blatt</b>	<b>Proteingehalt im Samen</b>
<b>DH4</b>	<b>ineffizient</b> nicht N-responsiv	<b>ineffizient</b> N-responsiv	<b>ineffizient</b> nicht N-responsiv	<b>ineffizient</b> nicht N-responsiv
<b>DH5</b>	effizient N-responsiv	ineffizient nicht N-responsiv	effizient nicht N-responsiv	effizient nicht N-responsiv
<b>DH15</b>	<b>effizient</b> nicht N-responsiv	<b>effizient</b> nicht N-responsiv	<b>effizient</b> N-responsiv	<b>effizient</b> N-responsiv
<b>DH18</b>	<b>ineffizient</b> N-responsiv	<b>ineffizient</b> nicht N-responsiv	<b>ineffizient</b> nicht N-responsiv	<b>ineffizient</b> nicht N-responsiv
<b>DH28</b>	effizient nicht N-responsiv	ineffizient N-responsiv	effizient N-responsiv	effizient N-responsiv
<b>DH29</b>	<b>ineffizient</b> N-responsiv	<b>ineffizient</b> N-responsiv	<b>ineffizient</b> N-responsiv	<b>ineffizient</b> nicht N-responsiv
<b>DH33</b>	<b>ineffizient</b> N-responsiv	<b>ineffizient</b> nicht N-responsiv	<b>ineffizient</b> nicht N-responsiv	<b>ineffizient</b> nicht N-responsiv
<b>DH42</b>	ineffizient nicht N-responsiv	effizient N-responsiv	effizient N-responsiv	effizient N-responsiv
<b>Apex</b>	ineffizient N-responsiv	effizient N-responsiv	ineffizient nicht N-responsiv	ineffizient N-responsiv
<b>Mohican</b>	effizient nicht N-responsiv	effizient nicht N-responsiv	effizient N-responsiv	ineffizient nicht N-responsiv





**Abb. 3.2: Klassifizierung von Rapsorten anhand ihres N-Stoffwechsels.** Die zehn in allen Anbauperioden getesteten Rapslinien wurden für jeden gemessenen Parameter anhand ihres Verhaltens bei N<sub>0</sub> und N<sub>240</sub> in vier Kategorien eingeteilt (siehe Text). Senkrechte Linien repräsentieren Gesamtmittelwerte aller zehn Linien. Datenpunkte repräsentieren dreijährige Mittelwerte einzelner Sorten.

### 3.2 Aminosäurekonzentrationen in subzellulären Kompartimenten von Mesophyllzellen

Die Konzentrationen verschiedener, für den N-Metabolismus wichtiger Metabolite in den Kompartimenten Zytosol, Vakuole und Chloroplast von Mesophyllzellen aus Rapsblättern der Sorte Lirajet wurden durch nichtwässrige Fraktionierung und anschließende HPLC-Analyse bestimmt. Es wurden sehr kleine, aber bereits voll ergrünte Blätter, voll ausgewachsene grüne Blätter und bereits deutlich blaßgelbe, seneszierende Blätter untersucht, die im folgenden als „jung“, „mittelalt“ und „alt“ bezeichnet werden. Die Pflanzen wurden hydroponisch mit 0,5 mM Nitrat („0,5 mM Nitrat-Pflanzen“) oder 4 mM Nitrat („4 mM Nitrat-Pflanzen“) in der Nährlösung als einziger N-Quelle angezogen.

Für jede Pflanzenart und jedes Gewebe müssen die Bedingungen der Dichtegradienten-Zentrifugation neu optimiert werden. Als Auftrennungskriterium dient die Verteilung der Markerenzyme im Gradienten. Die NADPH-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAP-DH), das plastidäre Markerenzym, sollte dabei am stärksten in den obersten, z.T. durch ihren Plastidengehalt deutlich grün gefärbten Gradientenfractionen aktiv sein und in der untersten, farblosen Fraktion fehlen. Die Aktivität des vakuolischen Markerenzym saure Phosphatase (bzw.  $\alpha$ -Mannosidase) sollte dagegen hauptsächlich in den unteren Fraktionen nachweisbar sein. Die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEP<sub>CX</sub>), Marker für das Zytosol, sollte sich auf den gesamten Gradienten verteilen, mit maximalen Aktivitäten in den mittleren Fraktionen. Es wurden jeweils so viele Fraktionierungen durchgeführt, bis für jedes Blattalter und jede N-Stufe drei Gradienten mit einer ausreichend guten Auftrennung der Markerenzyme zur Verfügung standen. Die optimierten Dichtestufen und die Verteilung der Markerenzyme in den verwendeten Gradienten sind in Anhang 8.1 dargestellt. Die im folgenden angegebenen Metabolitenkonzentrationen sind Mittelwerte aus jeweils drei Gradienten. Um die Konzentrationen aus der Verteilung der Gradientenfractionen von  $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  in die Konzentrationen in subzellulären Kompartimenten (in mM) umzurechnen, wurden folgende Volumina zugrunde gelegt: Vakuole: 600  $\mu\text{l g}_{\text{FG}}^{-1}$ ; Chloroplast: 70  $\mu\text{l g}_{\text{FG}}^{-1}$ ; Zytosol: 40  $\mu\text{l g}_{\text{FG}}^{-1}$ . Die Werte sind Mittelwerte der entsprechenden Volumina aus Spinat, Gerste und Kartoffel (Winter *et al.* 1993, 1994, Leidreiter *et al.* 1995).

Tabellen 3.4 und 3.5 (S. 101-102) stellen die Ergebnisse der nichtwässrigen Fraktionierung dar. Unter den Kohlenhydraten waren die Hexosen Glukose und Fruktose überwiegend in der Vakuole verteilt, Saccharose trat hauptsächlich im Zytosol auf. Die Hexosekonzentrationen erreichten maximal ca. 60 mM, Saccharose ca. 180 mM. Mit dem Blattalter nahmen die Konzentrationen dieser Zucker tendenziell etwas ab. Zwischen den Kohlenhydratkonzentrationen bei 0,5 und 4 mM Nitrat im Anzuchtmedium bestanden keine signifikanten

Unterschiede. Die organische Säure Malat fand sich überwiegend in der Vakuole, wo ihre Konzentration bis zu 150 mM betrug und bei 0,5 mM Nitrat-Pflanzen mit dem Blattalter zunahm. Bei den 4 mM Nitrat-Pflanzen war keine derartige Tendenz feststellbar.

Die Ammoniumkonzentrationen waren in allen Kompartimenten und Blattaltern niedrig, sowohl bei 0,5 mM als auch bei 4 mM Nitrat im Anzuchtmedium. Die höchsten Werte von bis zu 6,3 mM im Zytosol, 4,4 mM im Chloroplasten und 3,6 mM in der Vakuole traten bei den 0,5 mM Nitrat-Pflanzen auf, bei den 4 mM Nitrat-Pflanzen war  $\text{NH}_4^+$  häufig gar nicht nachweisbar. Nitrat war wie Malat vor allem in der Vakuole kompartimentiert, im Zytosol und Chloroplasten blieb seine Konzentration meist unter 10 mM. Höhere Werte traten bei jungen Blättern von 4 mM Nitrat-Pflanzen auf. Die Nitratkonzentration in der Vakuole stieg bei 0,5 mM Nitrat im Medium mit dem Blattalter an und war mit maximal 18,1 mM (alte Blätter) signifikant niedriger als bei allen Blattaltern von 4 mM Nitrat-Pflanzen. Bei den Pflanzen mit 4 mM  $\text{NO}_3^-$  im Medium zeigte die vakuoläre Nitratkonzentration keinen klaren Trend mit dem Blattalter: Wie im Zytosol und im Chloroplasten fand sich bei jungen Blättern auch in der Vakuole eine besonders hohe Nitratkonzentration von 161,2 mM, bei mittelalten und alten Blättern blieb die Konzentration dann auf einem niedrigeren Niveau von etwa 60-70 mM konstant.

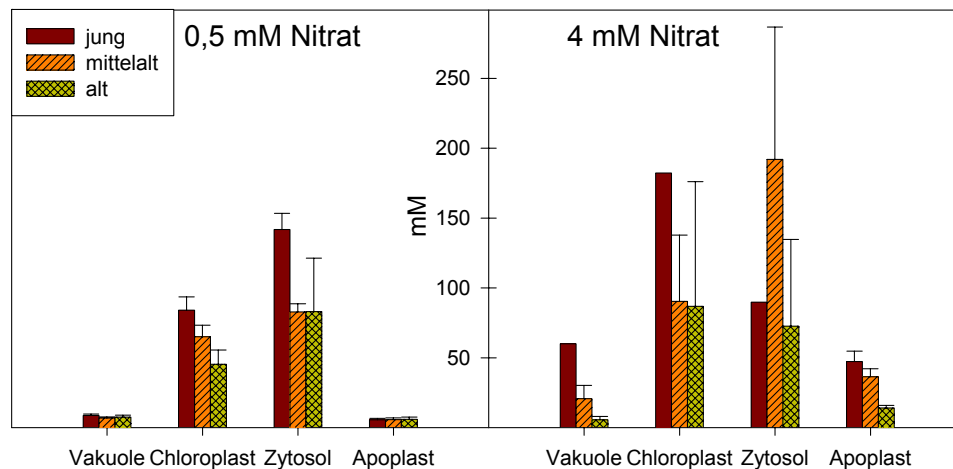
Aminosäuren waren über alle drei Kompartimente verteilt, mit annähernd gleichen Gesamtkonzentrationen im Zytosol und im Chloroplasten (unter Berücksichtigung der Standardabweichungen) und deutlich niedrigeren Werten in der Vakuole. In allen Kompartimenten und bei beiden N-Versorgungsstufen nahm die Aminosäure-Gesamtkonzentration mit dem Blattalter tendenziell ab, wobei sowohl bei 4 mM als auch bei 0,5 mM Nitrat auch alte Blätter noch signifikante Mengen enthielten. Zytosolische Aminosäurekonzentrationen blieben bei beiden N-Stufen unter 200 mM. Bei 4 mM Nitrat im Medium waren signifikant erhöhte Aminosäurewerte nur in der Vakuole feststellbar. Die maximale Gesamtkonzentration betrug dort in jungen Blättern 60 mM, gegenüber <10 mM in 0,5 mM Nitrat-Pflanzen. Im Verlauf des Rückgangs der Aminosäure-Gesamtkonzentration mit dem Blattalter glichen sich die Werte bei alten Blättern wieder denen der 0,5 mM Nitrat-Pflanzen an. Abb. 3.3 (S. 103) faßt die Aminosäurekonzentrationen in den untersuchten subzellulären Kompartimenten nochmals zusammen.

**Tab. 3.4 & 3.5 (folgende Seiten): Metabolitkonzentrationen in Mesophyllzellen aus Blättern von bei 0,5 bzw. 4 mM  $\text{NO}_3^-$  hydroponisch angezogenen Rapspflanzen.** Alle Werte in mM. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Gradienten  $\pm$  Standardabweichungen. Wenn keine Standardabweichungen angegeben sind, lagen Meßwerte nur für 1-2 Gradienten vor. GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure.

**Tab. 3.4: Ergebnisse der nichtwässrigen Fraktionierung von bei 0,5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> hydroponisch angezogenen Rapspflanzen**

mM	Junge Blätter			Mittelalte Blätter			Alte Blätter		
	Vakuole	Chloroplast	Zytoplast	Vakuole	Chloroplast	Zytoplast	Vakuole	Chloroplast	Zytoplast
Glutamat	2,8 ± 0,3	36,8 ± 3,0	61,5 ± 1,8	2,4 ± 0,4	32,8 ± 2,7	38,1 ± 4,4	1,9 ± 0,1	16,0 ± 0,7	14,1 ± 13,5
Glutamin	1,2 ± 0,1	12,7 ± 0,2	0,3 ± 0,4	0,8 ± 0,1	4,8 ± 0,9	1,7 ± 1,0	1,1 ± 0,1	1,9 ± 2,5	31,8 ± 11,8
Aspartat	0,7 ± 0,0	8,1 ± 1,0	14,1 ± 0,9	0,7 ± 0,1	7,5 ± 1,0	5,6 ± 1,2	0,8 ± 0,3	5,3 ± 1,0	4,1 ± 4,4
Asparagin	0,3 ± 0,0	2,5 ± 0,1	0,3 ± 0,5	0,3 ± 0,0	1,2 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,3	3,3 ± 1,8
Serin	1,1 ± 0,2	8,3 ± 1,9	30,6 ± 2,4	0,8 ± 0,1	7,3 ± 1,2	14,5 ± 0,9	0,4 ± 0,2	3,7 ± 1,5	7,0 ± 8,0
Glycin	0,5 ± 0,1	3,2 ± 1,3	1,3 ± 2,3	0,3 ± 0,0	1,6 ± 1,0	7,1 ± 2,3	0,6 ± 0,5	9,3 ± 5,1	7,3 ± 6,3
Arginin	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,9 ± 0,8	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,2	1,4 ± 0,5
Lysin	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,6	0,1
Methionin	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2
Threonin	0,5 ± 0,1	4,2 ± 0,9	7,7 ± 1,6	0,3 ± 0,0	2,8 ± 0,5	2,5 ± 0,2	0,4 ± 0,0	1,4 ± 0,4	2,1 ± 1,3
Alanin	0,4 ± 0,1	1,4 ± 0,5	9,0 ± 1,4	0,2 ± 0,0	1,7 ± 0,3	4,0 ± 0,4	0,2 ± 0,1	1,7 ± 0,7	3,3 ± 3,2
Valin	0,2 ± 0,0	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,7	0,1 ± 0,0	0,9 ± 0,3	1,3 ± 0,3	0,6 ± 0,2	1,8 ± 0,7	2,7 ± 2,5
Leucin	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	2,1 ± 2,1
Isoleucin	0,2 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,5	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,6
Tyrosin	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,6
Phenylalanin	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,4	1,6 ± 2,2
Tryptophan	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0,9 ± 0,7
Phosphoserin	0,1 ± 0,0	0,9 ± 1,0	13,2 ± 1,7	0,1 ± 0,0	1,7 ± 0,0	4,3 ± 1,1	0,1 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,1 ± 1
GABA	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2
<b>Summe Aminosäuren</b>	<b>8,7 ± 1,0</b>	<b>84,1 ± 9,5</b>	<b>141,8 ± 11,5</b>	<b>6,9 ± 0,8</b>	<b>65,0 ± 8,3</b>	<b>82,8 ± 5,9</b>	<b>7,5 ± 1,4</b>	<b>45,3 ± 10,2</b>	<b>83,1 ± 38,2</b>
Glukose	59,7 ± 15,9	5,2 ± 1,4	9,1 ± 2,4	38,3 ± 8,0	3,4 ± 0,7	5,9 ± 1,2	23,4 ± 3,4	2,0 ± 0,3	3,6 ± 0,5
Fruktose	46,4 ± 13,9	4,1 ± 1,2	7,1 ± 2,1	33,5 ± 6,8	2,9 ± 0,6	5,1 ± 1,0	19,5 ± 3,4	1,2 ± 1,1	6,9 ± 6,7
Saccharose	6,8 ± 1,7	0,4 ± 0,7	177,9 ± 54,4	3,1 ± 0,7	0,0 ± 0,0	99,4 ± 22,4	4,2 ± 3,6	4,8 ± 5,4	61,5 ± 68,9
Malat	31,2 ± 25,8	2,7 ± 2,3	4,8 ± 3,9	69,3 ± 11,0	6,1 ± 1,0	10,6 ± 1,7	99,2 ± 25,2	8,7 ± 2,2	15,2 ± 3,8
Nitrat	1,6 ± 1,8	0,9 ± 0,6	0,2 ± 0,3	12,2 ± 2,2	1,1 ± 0,2	1,8 ± 0,4	18,1 ± 2,6	1,6 ± 0,3	2,7 ± 0,4
Ammonium	3,6 ± 1,1	4,4	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,0 ± 1,0	6,3	0,0 ± 0,0	1,8 ± 1,6	5,7





**Abb. 3.3: Aminosäurekonzentrationen in subzellulären Kompartimenten verschieden alter Rapsblätter.** 0,5 mM und 4 mM Nitrat: N-Konzentration in der Nährlösung. Die Abbildung kombiniert die Ergebnisse der nichtwässrigen Fraktionierung (3.2) mit denen der apoplastischen Infiltrationsexperimente (3.3).

### 3.3 Aminosäurekonzentrationen im Apoplasten und Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung in den untersuchten Kompartimenten

Zur Ergänzung der Daten aus der nichtwässrigen Fraktionierung und, um die tatsächlichen Substratkonzentrationen für Aminosäuretransporter bei der apoplastischen Phloembeladung zu ermitteln, wurde die Aminosäurekonzentration im Apoplast bestimmt (Tab. 3.6 und Abb. 3.3). Bei mit 0,5 mM Nitrat in der Nährlösung angezogenen Pflanzen blieb die apoplastische Aminosäure-Gesamtkonzentration während der Blattentwicklung konstant niedrig bei etwa 5-6 mM. Das entspricht einem Konzentrationsgefälle von 10-40fach gegenüber dem Zytosol der Mesophyllzellen (Tab. 3.4 und 3.5, Abb. 3.3.). Im Apoplasten junger Blätter von 4 mM Nitrat-Pflanzen fanden sich dagegen mit  $47,3 \pm 7,4$  mM etwa zehnfach höhere Werte und entsprechend nur ein- bis vierfacher Konzentrationsgradient zum umgebenden Gewebe. Anders als bei den 0,5 mM Nitrat-Pflanzen nahm die apoplastische Aminosäurekonzentration hier mit dem Blattalter ab. Alte Blätter enthielten noch etwa doppelt so viele Aminosäuren im Apoplasten wie bei 0,5 mM Nitrat in der Nährlösung. Bei beiden N-Versorgungsstufen entspricht die jeweilige Gesamtkonzentration von Aminosäuren im Apoplasten in etwa der in der Vakuole.

**Tab. 3.6: Apoplastische Aminosäurekonzentrationen in Blättern von hydroponisch mit 0,5 mM und 4 mM Nitrat im Medium angezogenen Rapspflanzen.** Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (n = 6). GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure.

mM	0,5 mM Nitrat			4 mM Nitrat		
	jung	mittelalt	alt	jung	mittelalt	alt
Glutamat	0,8 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,2	10,4 $\pm$ 1,7	8,0 $\pm$ 1,5	2,8 $\pm$ 0,8
Glutamin	0,2 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,0	12,3 $\pm$ 2,1	9,9 $\pm$ 1,0	4,3 $\pm$ 0,7
Aspartat	0,9 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,6	10,2 $\pm$ 2,1	7,0 $\pm$ 1,5	1,8 $\pm$ 0,4
Asparagin	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0
Serin	0,9 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 1,3	2,8 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,3
Glycin	0,8 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,5
Arginin	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0
Lysin	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0
Histidin	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
Methionin	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Threonin	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,1
Alanin	0,4 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,1
Valin	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0
Leucin	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0
Isoleucin	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0
Tyrosin	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Phenylalanin	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0
Tryptophan	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Phosphoserin	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0
GABA	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1
<b>Summe</b>	<b>5,6 <math>\pm</math> 1,1</b>	<b>5,7 <math>\pm</math> 1,3</b>	<b>5,9 <math>\pm</math> 1,6</b>	<b>47,3 <math>\pm</math> 7,4</b>	<b>36,4 <math>\pm</math> 5,8</b>	<b>14,1 <math>\pm</math> 1,8</b>

Um in den untersuchten Kompartimenten die Aminosäurezusammensetzung vergleichen zu können, wurden ihre prozentualen Anteile an der jeweiligen Gesamtkonzentration berechnet (Tab. 3.7). Für Prolin liegen keine Daten vor, da diese Aminosäure mit der verwendeten Derivatisierungsmethode nicht meßbar ist. Die Konzentration von Cystein lag in der Regel unter der Nachweisgrenze. Bei der nichtwässrigen Fraktionierung liegen auch für Histidin keine Daten vor, da diese Aminosäure abhängig von der Säulencharge meistens nicht von Glutamin getrennt werden konnte. In einzelnen Proben zeigte sich aber, daß die Histidin-Konzentration sehr niedrig war.

**Tab. 3.7: Prozentuale Anteile einzelner Aminosäuren an der Gesamt-Aminosäurekonzentration in verschiedenen Kompartimenten von Mesophyllzellen und im Apoplast von Rapsblättern.** Alle Werte in % der Gesamtkonzentration im jeweiligen Kompartiment. Bei der nichtwässrigen Fraktionierung wurde kein Histidin gemessen. 0,5 mM und 4 mM Nitrat bezeichnen die  $\text{NO}_3^-$ -Konzentrationen in den hydroponischen Medien. Vak.: Vakuole, Chl.: Chloroplast, Zyt.: Zytosol, Apo.: Apoplast, GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure, ND: nicht detektiert.

0,5 mM Nitrat	junge Blätter				mittelalte Blätter				alte Blätter			
	Vak. (%)	Chl. (%)	Zyt. (%)	Apo. (%)	Vak. (%)	Chl. (%)	Zyt. (%)	Apo. (%)	Vak. (%)	Chl. (%)	Zyt. (%)	Apo. (%)
Glutamat	32,1	43,8	43,4	14,1	34,8	50,6	46,0	16,2	25,4	35,4	16,9	21,9
Glutamin	13,2	15,1	0,2	3,8	11,8	7,4	2,1	12,1	14,2	4,2	38,3	6,1
Aspartat	7,6	9,6	10,0	16,0	9,9	11,6	6,7	15,6	10,1	11,8	5,0	26,4
Asparagin	3,6	3,0	0,2	2,0	4,2	1,8	0,4	2,5	1,2	0,7	4,0	1,9
Serin	12,8	9,9	21,6	16,9	11,3	11,2	17,5	12,8	5,7	8,1	8,4	6,5
Glycin	5,2	3,8	0,9	14,4	4,8	2,5	8,6	7,6	7,5	20,5	8,8	3,4
Arginin	4,3	0,6	0,6	1,9	4,2	0,6	0,3	1,9	0,5	0,7	1,6	1,5
Lysin	1,6	0,8	0,1	2,5	1,5	0,6	0,6	2,0	0,0	3,5	0,1	1,8
Histidin	ND	ND	ND	1,9	ND	ND	ND	1,4	ND	ND	ND	1,2
Methionin	1,8	0,5	0,0	0,7	0,9	0,3	0,5	1,4	0,1	0,1	0,2	2,2
Threonin	5,4	5,0	5,4	4,6	4,6	4,3	3,0	3,9	5,8	3,1	2,5	3,6
Alanin	4,2	1,7	6,3	7,2	3,5	2,6	4,8	5,7	3,2	3,7	4,0	6,0
Valin	2,6	2,1	1,3	0,4	1,7	1,4	1,5	3,9	7,3	4,0	3,3	3,6
Leucin	0,8	0,6	0,0	3,8	0,9	0,7	0,9	2,8	2,7	1,0	2,5	2,6
Isoleucin	2,0	1,1	0,3	2,5	1,7	0,6	0,8	2,6	4,4	0,9	0,5	2,1
Tyrosin	0,4	0,4	0,1	1,5	0,6	0,3	0,3	1,5	0,2	0,3	0,7	1,2
Phenylalanin	0,5	0,4	0,2	2,1	0,7	0,4	0,6	1,8	3,5	1,0	1,9	1,8
Tryptophan	0,5	0,3	0,1	1,2	0,7	0,3	0,2	1,1	6,4	0,4	1,0	1,5
Phosphoserin	1,2	1,1	9,3	1,0	2,1	2,7	5,1	0,9	1,5	1,5	0,1	1,9
GABA	0,3	0,1	0,0	1,4	0,4	0,0	0,1	2,1	0,2	0,5	0,3	2,6
4 mM Nitrat	junge Blätter				mittelalte Blätter				alte Blätter			
	Vak. (%)	Chl. (%)	Zyt. (%)	Apo. (%)	Vak. (%)	Chl. (%)	Zyt. (%)	Apo. (%)	Vak. (%)	Chl. (%)	Zyt. (%)	Apo. (%)
Glutamat	14,6	33,4	48,3	21,9	13,8	31,5	28,5	21,9	37,9	52,5	26,3	19,7
Glutamin	11,6	14,4	6,6	25,9	46,8	9,0	11,9	27,3	6,7	8,1	5,0	30,2
Aspartat	5,0	7,4	8,6	21,5	6,4	7,8	4,8	19,4	9,7	12,8	4,9	12,4
Asparagin	3,4	3,4	0,9	1,9	3,1	4,4	6,3	1,6	1,6	1,1	1,8	1,2
Serin	8,3	15,7	16,9	10,8	2,9	12,2	9,0	7,8	13,9	10,8	27,4	11,5
Glycin	3,0	2,3	0,0	1,3	3,7	11,7	8,0	2,5	8,2	0,5	9,0	7,4
Arginin	27,0	0,8	2,8	0,6	0,6	1,8	1,1	0,7	0,7	0,0	0,9	0,3
Lysin	3,4	0,2	0,3	0,5	1,3	1,6	2,0	0,7	1,1	0,2	1,2	0,4
Histidin	ND	ND	ND	0,2	ND	ND	ND	0,5	ND	ND	ND	0,4
Methionin	11,4	4,6	2,0	0,3	1,0	3,3	1,8	0,3	0,5	0,1	0,7	0,2
Threonin	5,2	8,2	3,0	5,7	4,3	3,7	3,5	5,4	6,0	6,1	3,4	3,8
Alanin	1,9	3,1	2,4	3,7	1,1	3,7	4,6	4,8	4,0	2,5	6,3	6,9
Valin	1,8	1,8	0,0	1,5	6,3	2,5	5,3	1,7	2,4	1,0	4,1	1,2
Leucin	0,6	0,4	0,4	0,7	1,0	1,8	2,0	0,7	1,4	0,4	1,3	0,4
Isoleucin	1,9	0,8	0,0	1,0	2,9	1,9	3,2	1,2	2,5	0,3	1,6	1,1
Tyrosin	0,2	0,2	0,5	0,3	0,1	1,0	0,7	0,3	0,5	0,2	0,4	0,2
Phenylalanin	0,1	0,1	0,9	0,4	0,1	1,0	6,3	0,5	0,8	0,2	0,8	0,4
Tryptophan	0,2	0,1	0,0	0,3	3,0	0,7	0,6	0,3	0,4	0,1	0,5	0,3
Phosphoserin	0,2	2,9	5,9	0,4	0,6	0,3	0,1	0,4	1,4	3,2	4,4	0,1
GABA	0,1	0,0	0,3	1,2	0,8	0,2	0,3	2,1	0,5	0,1	0,1	1,7



Beim Vergleich der Kompartimente, zunächst nur innerhalb der Mesophyllzellen, zeigte sich, daß Glutamat mit bis zu 52,5 % Anteil fast überall die dominierende Aminosäure war, häufig gefolgt von Glutamin (bis zu 46,8 %) oder dem Photorespirations-Intermediat Serin (bis zu 27,4 %). In der Vakuole junger Blätter von 4 mM Nitrat-Pflanzen dominierte die sonst eher seltene Aminosäure Arginin (27,0 % Anteil), allerdings lag in diesem Fall nur ein Meßwert vor. Glutamat war stets zumindest die zweithäufigste Aminosäure. Neben Glutamat, Glutamin und Serin erreichten auch Glycin (bis 20,5 %), ebenfalls ein Intermediat der Photorespiration, und Aspartat (bis 12,8 %) relativ hohe Anteile an der Gesamt-Aminosäurekonzentration. Unter den übrigen Aminosäuren waren Methionin (bis zu 11,4) sowie Threonin und Alanin mit in der Regel >2 % Anteil am häufigsten, gefolgt von Valin, Asparagin und Isoleucin. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin waren am seltensten, Tyrosin machte nie mehr als 1 % aller Aminosäuren aus.

Bei den 0,5 mM Nitrat-Pflanzen nahmen im Zytosol alter Blätter die relativen Anteile der häufigen Aminosäuren Glutamat, Aspartat, Serin und Alanin, sowie von Threonin und Phosphoserin ab. Die Anteile von Glutamin, Asparagin, Glycin, Arginin, Valin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan stiegen dagegen an. Tendenziell wurden seltenere Aminosäuren häufiger und es fand eine Umverteilung von den Säuren Glutamat und Aspartat zu den Amidien Glutamin und Asparagin statt. Bei den 4 mM Nitrat-Pflanzen waren solche Tendenzen nicht deutlich erkennbar. Auch hier nahmen die zytosolischen Anteile von Glutamat und Aspartat mit dem Blattalter ab. Die deutlichsten Zunahmen zeigten sich bei Serin, Glycin und Alanin, wogegen seltenere Aminosäuren eher in den mittelalten Blättern die höchsten Anteile erreichten und dann zu den alten Blättern hin wieder prozentual abnahmen.

Im Apoplasten gehörte Glutamat ebenfalls stets zu den häufigsten Aminosäuren, war aber im Gegensatz zum Zellinneren nur in einem Fall dominierend. Bei 0,5 mM Nitrat im Medium waren bei jungen Blättern Serin und Aspartat am häufigsten, bei mittelalten und alten Blättern Glutamat und Aspartat. Bei 4 mM Nitrat war dagegen stets Glutamin dominierend und Glutamat stellte die zweithäufigste Aminosäure dar.

Bei den 0,5 mM Nitrat-Pflanzen war die Zunahme von Glutamin mit dem Blattalter im Apoplasten weniger deutlich als im Zytosol, und Glutamat und Aspartat nahmen anteilmäßig zu während sie im Zytosol relativ weniger wurden. Bis auf Methionin, Valin und Tryptophan nahmen auch die Anteile der anderen Aminosäuren im Apoplasten mit dem Blattalter ab. Bei 4 mM Nitrat war im Apoplasten für Glutamin, Glycin und Alanin eine Zunahme des relativen Anteils mit dem Blattalter feststellbar, die bei Glycin und Alanin auch einer zytosolischen Zunahme entsprach. Der Anteil von Histidin an den apoplastischen Aminosäuren nahm

ebenfalls mit dem Blattalter zu, während Aspartat, Asparagin, Arginin, Threonin, Valin und Leucin abnehmen.

### 3.4 Identifizierung von *Brassica napus* Aminosäuretransportern

Um die Phloembeladung mit Aminosäuren in Rapsblättern auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden cDNA-Fragmente von *Brassica napus* Aminosäuretransportern durch PCR bzw. RT-PCR identifiziert. Dazu wurden Kombinationen spezifischer und degenerierter Primer verwendet. Der spezifische Primer BA6r2 (Tab. 2.1) war aus einem *B. napus* „Expressed Sequence Tag“ (EST) mit 86,5 % Homologie zu *AtAAP6* abgeleitet (Sohn *et al.* 1995, GenBank Acc. No. H07512). Degenerierte Primer wurden anhand eines Vergleichs von elf Aminosäuretransportern aus *Arabidopsis thaliana*, Tomate (*Lycopersicon esculentum*) und *Ricinus communis* abgeleitet. Dazu wurden Bereiche mit vollständig konservierter Aminosäuresequenz in eine Nukleotidsequenz rückübersetzt (Knop 1998). Zusätzlich wurden entsprechende degenerierte Primer mit Inosin an variablen Nukleotidpositionen, an denen alle vier Basen möglich waren, verwendet (CKAA1i, CKAA2i, CKAA4ri; Tab. 2.1). Die durch PCR bzw. RT-PCR erhaltenen partiellen cDNAs wurden in pGEM-T Easy kloniert und sequenziert. cDNA-Fragmente, die eine Homologie zu Arabidopsis AAPs aufwiesen, wurden durch 5' und 3' RACE vervollständigt. Die Benennung der *BnAAP*-Gene erfolgte nach dem jeweils nächstverwandten Arabidopsis-Gen.

**Tab. 3.8: Homologie von Aminosäuretransportern aus *B. napus* und *A. thaliana*.** Angegeben sind die Sequenzidentität („Identity“) und Sequenzähnlichkeit („Similarity“) auf Aminosäureebene in Prozent. Die für den Sequenzvergleich verwendete Sequenz von BnAAP2 ist unvollständig. Die jeweils größten Homologien zu Arabidopsis-Transportern sind durch Fettdruck und graue Hinterlegung hervorgehoben.

	%	Bn AAP2	Bn AAP6	At AAP1	At AAP2	At AAP3	At AAP4	At AAP5	At AAP6	At AAP7	At AAP8
Identität	BnAAP1	55,7	75,1	<b>91,1</b>	57,3	58,9	59,1	57,5	73,8	51,0	77,7
	BnAAP2		59,8	56,9	<b>93,5</b>	74,0	87,0	65,0	57,5	45,3	52,4
	BnAAP6			75,8	60,0	59,9	59,5	58,5	<b>91,9</b>	51,6	69,6
Ähnlichkeit	BnAAP1	65,9	81,0	<b>94,4</b>	67,8	69,9	69,1	67,9	80,7	60,7	85,4
	BnAAP2		70,3	67,1	<b>94,3</b>	82,1	89,8	74,0	68,0	59,6	63,8
	BnAAP6			83,2	70,1	70,0	69,4	68,6	<b>93,9</b>	61,7	77,7

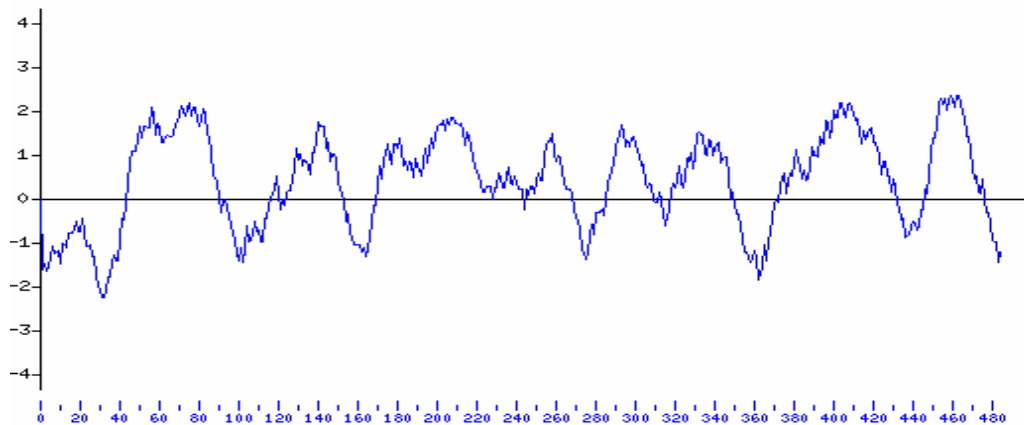
### 3.4.1 *BnAAP1*

Eine partielle cDNA (616 bp) von *BnAAP1* wurde durch RT-PCR mit den degenerierten Primern CKAA2i und CKAA4ri (Tab. 2.1) und zweifache Reamplifikation erhalten. Als Matrize diente Erststrang-cDNA aus Gesamt-RNA junger Blätter der Rapssorte Lirajet. Das 5' cDNA-Ende wurde durch 5' RACE mit den Primern A1-5R-1C und A1-5R-2 erhalten. Für das 3' RACE wurde zunächst eine Voramplifikation mit dem Primer BA1f1 und dem unspezifischen dT<sub>20</sub> Primer durchgeführt. Die Primer für die eigentlichen 3' RACE PCRs waren A1-3R-1 und A1-3R-2C. Die vollständige kodierende Sequenz wurde durch PCR mit den Primern A1TskNf und A1TskNr und einer 3'→5' korrekturlesenden *Pwo* DNA-Polymerase erhalten und über *XhoI* und *PstI* Restriktionsschnittstellen in den Primern direktional in den Vektor pBF1 kloniert. Das daraus resultierende Plasmid p1ORF ist im Anhang in Abb. 8.3 abgebildet. Aus dem in *Xenopus*-Oozyten funktionell exprimierten Klon (3.5) wurde die kodierende Sequenz über *NcoI* und *PvuII* ausgeschnitten und in den *E. coli*-Expressionsvektor pET-15b ligiert. Der Vektor wurde dafür mit *XhoI* linearisiert, die überstehenden Enden durch Klenow DNA-Polymerase aufgefüllt und der N-terminale His-Tag durch einen *NcoI*-Verdau entfernt. Dieses Konstrukt wurde für eine vollständige beidseitige Sequenzierung durch die Firma Seqlab, Göttingen verwendet. Die Sequenzierungsprimer waren T7 Promotor, T7 Terminator (beide vektorspezifisch), BA1f1, A1-3R-1, BA1r1 und A1-5R-1C (alle genspezifisch). Die vollständige cDNA-Sequenz von *BnAAP1* ist mit der Accession No. AJ565847 in den Datenbanken hinterlegt und findet sich in Anhang 8.2 dieser Arbeit.

Die cDNA von *BnAAP1* ist inklusive 3' PolyA-Ende 1739 bp lang und kodiert von bp 91 bis 1548 ein Polypeptid aus 485 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 53,1 kDa. Die Sequenzidentität des offenen Leserasters mit *AtAAP1* beträgt 88,6 % auf Nukleotid- und 91,1 % auf Aminosäureebene, die Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene ist 94,4 % (Tab. 3.8, Abb. 3.6). Im Verlauf dieser Arbeit wurde von Noiraud *et al.* 2002 eine partielle cDNA von *BnAAP1* in den Datenbanken hinterlegt (Acc. No. AY188953). Dieses 552 bp-Fragment weist zu dem hier beschriebenen Vollängenklon eine Sequenzidentität von 96,2 % auf Nukleotidebene auf.

Die PredictProtein-Strukturvorhersage (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein>; Rost 1996) ergab für *BnAAP1* elf potentielle Transmembranhelices mit dem N-Terminus im Zytosol und dem C-Terminus außerhalb der Zelle (Abb. 3.4). An den Aminosäurepositionen 104 und 226 wurden zwei mögliche N-Glykosylierungsstellen gefunden, wobei die erstere nach der Strukturvorhersage in einer intrazellulären Schleife, die zweite aber in einem

extrazellulären Proteinbereich liegt. Außerdem wurden verschiedene mögliche Phosphorylierungs- und N-Myristoylierungsstellen erkannt. Eine Analyse der der potentiellen zellulären Lokalisation von BnAAP1 mit dem Programm PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>) ergab die Plasmamembran als wahrscheinlichste zelluläre Lokalisation. Das Programm TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>; Emanuelsson *et al.* 2000) sagt voraus, daß das Protein nicht in Mitochondrien oder Chloroplasten lokalisiert ist und nicht aus der Zelle sekretiert wird.



**Abb. 3.4: Hydropathie-Analyse von BnAAP1 .** Die X-Achse gibt die Position in der Aminosäuresequenz an, die Y-Achse den Kyte-Doolittle-Wert (Kyte & Doolittle 1982). Positive Werte zeigen hydrophobe Bereiche an. Die Abbildung wurde mit dem Protein Hydrophilicity Search and Comparison Server des Weizmann Institute of Science, Israel erstellt (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/index.html>).

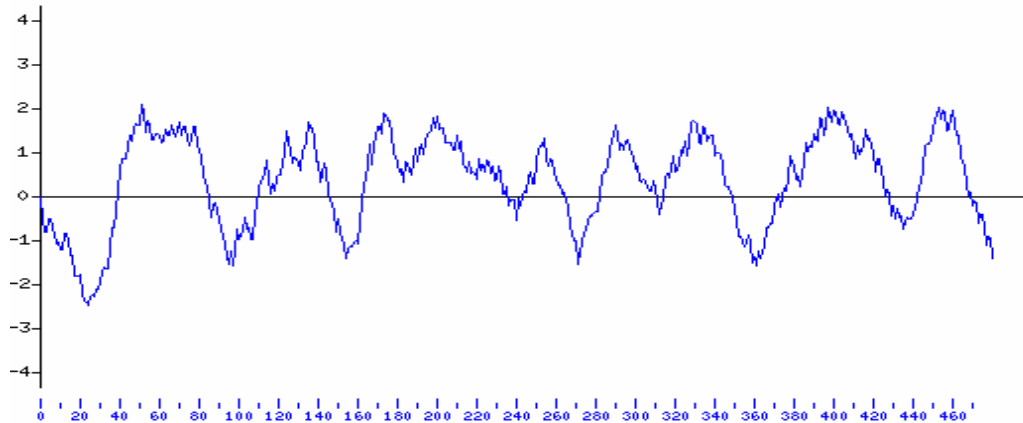
### 3.4.2 *BnAAP6*

Von *BnAAP6* wurde zunächst eine partielle cDNA (888 bp) durch RT-PCR mit den Primern CKAA2 und BA6r2 (Tab. 2.1) und einmalige Reamplifikation erhalten. Ausgangsmaterial war Erststrang-cDNA aus Gesamt-RNA ausgewachsener Blätter einer Kreuzung der Rapssorten Bristol x Mansholts. Die cDNA-Enden wurden durch 5' RACE mit den Primern BAA5-1 und BAA5-2 und 3' RACE mit den Primern BAA3-1 und BAA3-2 erhalten. Wie bei *BnAAP1* wurde die vollständige kodierende Sequenz durch PCR mit einer 3'→5' korrekturlesenden *Pwo* DNA-Polymerase amplifiziert (Primer A6TskNf und A6TskNr) und über in den Primersequenzen enthaltene *XhoI* und *PstI* Restriktionsschnittstellen zunächst direktional in den Vektor pBF1 kloniert, wodurch das Plasmid p6ORF erhalten wurde (Abb.

8.3, im Anhang). Nach Verifikation der Funktionalität des Genprodukts durch Expression in *Xenopus*-Oozyten (3.5) wurde der entsprechende Klon über *NcoI* und *PvuII* ausgeschnitten und zur vollständigen beidseitigen Sequenzierung in pET-15b kloniert wie oben beschrieben. Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern T7 Promotor, T7 Terminator (beide vektorspezifisch), BA6f2, BAA3-1, BA6r2 und BAA5-2 (alle genspezifisch). Die vollständige cDNA-Sequenz von *BnAAP6* ist mit der Accession No. AJ565848 in den Datenbanken hinterlegt und findet sich im Anhang 8.3 dieser Arbeit.

Die gesamte *BnAAP6* cDNA inklusive PolyA-Ende ist 1697 bp lang und kodiert von bp 65 bis 1510 ein Polypeptid aus 481 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 52,8 kDa. Die Sequenzidentität des offenen Leserasters mit *AtAAP1* beträgt 88,1 % auf Nukleotid- und 91,9 % auf Aminosäureebene, die Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene ist 93,9 % (Tab. 3.8, Abb. 3.6). Die Sequenzidentität mit dem zur Primerableitung verwendeten EST von Sohn *et al.* 1995 (175 bp, Acc. No. H07512) beträgt 96,0 %. Die vollständigen cDNAs von *BnAAP6* und *BnAAP1* besitzen eine Sequenzidentität von 65,1 % auf Nukleotid- und von 75,1 % auf Aminosäureebene. Die Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene beträgt 81,0 % (Tab. 3.8).

Eine Strukturvorhersage (PredictProtein, <http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein>; Rost 1996) ergab für das BnAAP6-Protein elf potentielle Transmembranhelices mit dem N-Terminus im Zytosol und dem C-Terminus außerhalb der Zelle (Abb. 3.5). BnAAP6 hat zwei mögliche N-Glykosylierungsstellen (Aminosäuren 100 und 186), von denen die erste in einer putativen zytosolischen Schleife und die zweite am intrazellulären Ende einer Transmembranhelix liegt. Außerdem wurden verschiedene mögliche Phosphorylierungs- und N-Myristoylierungsstellen erkannt. Eine Analyse der möglichen zellulären Lokalisation von BnAAP6 ergab mit dem Programm PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>) die höchste Wahrscheinlichkeit für die Plasmamembran und mit dem Programm TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>; Emanuelsson *et al.* 2000), daß das Protein nicht in Mitochondrien oder Chloroplasten lokalisiert ist und nicht aus der Zelle sekretiert wird.



**Abb. 3.5: Hydropathie-Analyse von BnAAP6.** Die X-Achse gibt die Position in der Aminosäuresequenz an, die Y-Achse den Kyte-Doolittle-Wert (Kyte & Doolittle 1982). Positive Werte zeigen hydrophobe Bereiche an. Die Abbildung wurde mit dem Protein Hydrophilicity Search and Comparison Server des Weizmann Institute of Science, Israel erstellt (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/index.html>).

### 3.4.3 *BnAAP2*

Ein 730 bp langes cDNA-Fragment von *BnAAP2* wurde durch PCR und einmalige Reamplifikation mit den degenerierten Primern CKAA1i, CKAA4ri (Tab. 2.1) aus einer einmal amplifizierten cDNA-Bank aus reifenden *Brassica napus* Schoten (Fulda *et al.* 1997) erhalten. Die Sequenzierung des klonierten Fragments ergab, daß bei der PCR beidseitig CKAA4ri an die Matrize gebunden hatte. Die Sequenzidentität dieses Fragments zu *AtAAP2* betrug 86,7 % auf Nukleotid- und 93,5 % auf Aminosäureebene, die Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene 94,3 %. Die Sequenzidentität zu BnAAP1 und BnAAP6 war 59,7 bzw. 60,2 % auf Nucleotid- und 55,7 bzw. 59,8 % auf Aminosäureebene. Die Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene betrug zwischen BnAAP2 und BnAAP1 65,9 % und zwischen BnAAP2 und BnAAP6 70,3 % (Tab. 3.8). Im Verlaufe dieser Promotionsarbeit wurde von Noiraud *et al.* 2002 die Sequenz eines 558 bp cDNA-Fragments von *BnAAP2* in die Datenbanken eingegeben (Acc. No. AY188954). Dieses Fragment deckt einen ca. 120 bp weiter 5' liegenden Bereich des *BnAAP2* Gens ab als die hier beschriebene Teilsequenz. Die Sequenzidentität beider Fragmente im überlappenden Bereich beträgt 87,8 % auf Nukleotidebene.

**Abb. 3.6: Sequenzvergleich der Aminosäuretransporter BnAAP1 und BnAAP6 aus *B. napus* mit homologen Proteinen aus *Arabidopsis*.** Graue Hinterlegung zeigt Sequenzidentität zwischen den homologen Transportern aus *B. napus* und *A. thaliana* an, schwarze Hinterlegung Sequenzidentität aller vier Proteine. In dieser Darstellungsweise sind Sequenzübereinstimmungen der *B. napus* bzw. der *A. thaliana* AAPs untereinander nicht markiert und auch nicht Übereinstimmungen von drei der vier Proteine. Lücken wurden eingefügt, um die AAP1- und AAP6-Sequenzen optimal zur Deckung zu bringen.

BnAAP1	1	M...KSFNTDQHGHSAAES	GDVYAMSDPTK	KNVDD	DDGREKRTGTWLT	SAHIITAVIGSGV	57																																																			
AtAAP1	1	M...KSFNTEGHNHSTAES	GDAYTVSDPTK	KNVDE	DDGREKRTGTWLT	SAHIITAVIGSGV	57																																																			
BnAAP6	1	ME.KKSMFIEQSFTDHK.S	GDMN.....	KNFDD	DDGROKRTGTWMT	SAHIITAVIGSGV	52																																																			
AtAAP6	1	MEKKKSMFVEQSFPPEHE.I	GDITN.....	KNFDE	DDGRDKRTGTWMT	SAHIITAVIGSGV	53																																																			
*																																																										
BnAAP1	58	LSLAWAIAQLGWIAGTLILII	IFS	FITYFTSTMLADCYR	APDPLTGKRN	TYMDV	VRSYLG	117																																																		
AtAAP1	58	LSLAWAIAQLGWIAGTISILLI	IFS	FITYFTSTMLADCYR	APDPVTGKRN	TYMDV	VRSYLG	117																																																		
BnAAP6	53	LSLAWAIAQLGWWAGPAVLMA	FS	FITYFTSTMLADCYR	SPDPVTGKRN	TYMEV	VRSYLG	112																																																		
AtAAP6	54	LSLAWAIAQLGWWAGPAVLMA	FS	FITYFTSTMLADCYR	SPDPVTGKRN	TYMEV	VRSYLG	113																																																		
*																																																										
BnAAP1	118	GRKVQLCGVAQYGNLIGIT	IVGYTITASISL	VAI	GKANCYHNK	GHHADCTIS	SNYPYMAAF	177																																																		
AtAAP1	118	GRKVQLCGVAQYGNLIGVT	IVGYTITASISL	VAVGKSNCF	HDKGHTADCTIS	SNYPYMAV	AF	177																																																		
BnAAP6	113	GRKVMLCGLAQYGNLIGITI	IGYTITASISM	VAVKRSNCF	HKNGHNVKC	STSNTPFMI	IFA	172																																																		
AtAAP6	114	GRKVQLCGLAQYGNLIGITI	IGYTITASISM	VAVKRSNCF	HKNGHNVKC	ATSNTPFMI	IFA	173																																																		
*																																																										
BnAAP1	178	IIQIILLSQIPNFHKL	SFLS	ILMAAVMSFAYAS	IGI	GLA	IATVAGGKV.GK	TNMTGT	VVGVD	236																																																
AtAAP1	178	IIQVILS	QIPNFHKL	SFLS	SILMAAVMSF	TYATIGI	GLA	IATVAGGKV.GK	TSMTGT	VAVGVD	236																																															
BnAAP6	173	CIQIVLS	QIPNFHNL	SWLS	SILAAVMSF	YASIGI	GLS	IAKVAGGCVH	ARTAL	TGVTVGVD	232																																															
AtAAP6	174	IIQIIL	SQIPNFHNL	SWLS	SILAAVMSF	CYASIG	VGLS	IAKAAGGGEH	VRTITL	TGVTVGID	233																																															
*																																																										
BnAAP1	237	VTAAQKI	IWR	SFQAVG	DI	AFAYAYAT	VL	IEIQD	TLR	SS.PAENKAMKRAS	EV	GVSTTTFF	295																																													
AtAAP1	237	VTAAQKI	IWR	SFQAVG	DI	AFAYAYAT	VL	IEIQD	TLR	SS.PAENKAMKRAS	EV	GVSTTTFF	295																																													
BnAAP6	233	VTGSEK	VWRT	FQAVG	DI	AFAYAYS	TV	IEIQD	TLK	ASPPSENKAMKRAS	EV	GVSTTTFF	292																																													
AtAAP6	234	VSGAEK	IWR	TFOA	I	GDI	AFAYAYS	TV	IEIQD	TLK	AGPPSENKAMKRAS	EV	GVSTTTFF	293																																												
*																																																										
BnAAP1	296	ILCGCL	GYAAF	GNKAP	GDFL	TN	FGFY	EP	FWL	IDFANACIA	VH	LIGAYQVFA	QPI	FQFVEK	355																																											
AtAAP1	296	ILCGCI	GYAAF	GNNA	P	GDFL	T	D	FGFY	EP	FWL	IDFANACIA	VH	LIGAYQVFA	QPI	FQFVEK	355																																									
BnAAP6	293	MLCGCV	GYAAF	GNNA	P	GDFL	T	G	FGFY	EP	FWL	IDFANVCI	VH	LIGAYQVFC	QPI	FQFVES	352																																									
AtAAP6	294	MLCGCV	GYAAF	GNNA	P	GDFL	T	G	FGFY	EP	FWL	IDFANVCI	VH	LIGAYQVFC	QPI	FQFVES	353																																									
*																																																										
BnAAP1	356	KCNRN	WPD	NKF	FIT	SEYS	VNI	P	FL	GK	F	SIN	L	FRL	V	WRT	AY	V	V	I	T	L	V	A	M	I	F	P	F	F	N	A	I	L	G	L	I	415																				
AtAAP1	356	KCNRN	Y	P	D	N	K	F	I	T	S	E	Y	S	V	N	V	P	F	L	G	K	F	N	I	S	L	F	R	L	V	W	R	T	A	Y	V	V	I	T	V	V	A	M	I	F	P	F	F	N	A	I	L	G	L	I	415	
BnAAP6	353	QSAKR	W	P	D	N	K	F	I	T	G	E	Y	K	M	N	V	P	C	G	D	F	G	I	S	L	F	R	L	V	W	R	T	S	Y	V	V	V	T	A	V	V	A	M	I	F	P	F	F	N	D	F	L	G	L	I	412	
AtAAP6	354	QSAKR	W	P	D	N	K	F	I	T	G	E	Y	K	I	H	V	P	C	C	G	D	F	S	I	N	F	L	R	L	V	W	R	T	S	Y	V	V	V	T	A	V	V	A	M	I	F	P	F	F	N	D	F	L	G	L	I	413
*																																																										
BnAAP1	416	GAASF	W	P	L	T	V	Y	F	P	V	E	M	H	I	A	Q	T	K	V	K	K	Y	S	R	W	I	G	L	K	M	L	C	W	V	C	L	I	V	S	L	L	A	A	A	G	S	I	A	G	L	I	S	S	V	K	475	
AtAAP1	416	GAASF	W	P	L	T	V	Y	F	P	V	E	M	H	I	A	Q	T	K	I	K	K	Y	S	A	R	W	I	A	L	K	T	M	C	Y	V	C	L	I	V	S	L	L	A	A	A	G	S	I	A	G	L	I	S	S	V	K	475
BnAAP6	413	GAASF	W	P	L	T	V	Y	F	P	I	E	M	H	I	A	Q	K	N	M	K	K	F	S	F	T	W	T	W	L	K	I	L	S	W	A	C	F	L	V	S	L	V	A	A	A	G	S	V	Q	G	L	I	Q	S	L	K	472
AtAAP6	414	GAASF	W	P	L	T	V	Y	F	P	I	E	M	H	I	A	Q	K	K	I	P	K	F	S	F	T	W	T	W	L	K	I	L	S	W	T	C	F	I	V	S	L	V	A	A	A	G	S	V	Q	G	L	I	Q	S	L	K	473
*																																																										
BnAAP1	476	TYK	P	F	R	T	I	H	E	485																																																
AtAAP1	476	TYK	P	F	R	T	M	H	E	485																																																
BnAAP6	473	D	F	K	P	F	Q	A	P	.E	481																																															
AtAAP6	474	D	F	K	P	F	Q	A	P	481																																																

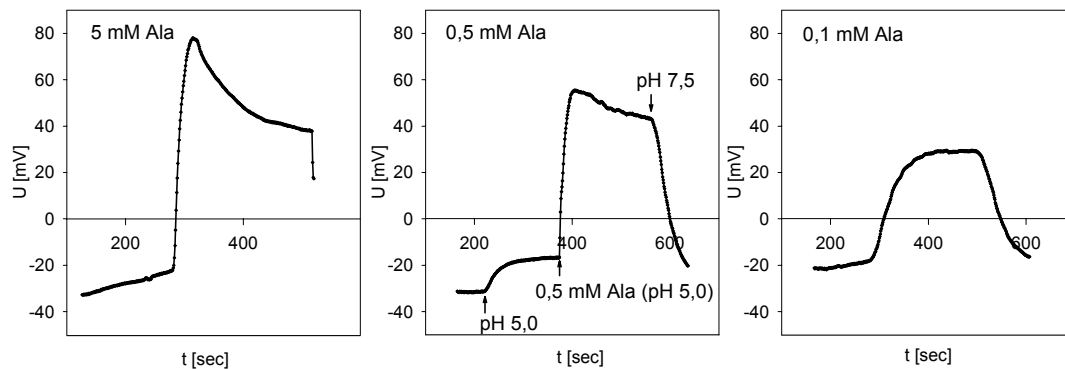
Da es nicht gelang, das *BnAAP2* cDNA-Fragment mit den genspezifischen Primern BA2f1 und BA2r1 erneut über eine RT-PCR zu amplifizieren und 5' und 3' RACE PCR-Reaktionen keine Produkte lieferten, wurde *BnAAP2* in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Sequenz des 730 bp cDNA Fragments ist in Anhang 8.5 dieser Arbeit enthalten.

### **3.5 Elektrophysiologische Untersuchungen zur Substratspezifität von BnAAP1 und BnAAP6 durch funktionelle Expression in *Xenopus* Oozyten**

Um die Funktionalität der identifizierten *B. napus* AAP-Gene *in vivo* zu testen, wurden die von ihnen kodierten Transportproteine in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* exprimiert. Dazu wurden die offenen Leseraster von BnAAP1 und BnAAP6 vom Start- bis zum Stopcodon durch PCR mit einer korrekturlesenden *Pwo* DNA-Polymerase und Primern mit *XhoI* und *PstI* Schnittstellen (A1TskNf und A1TskNr bzw. A6TskNf und A6TskNr, Tab. 2.1) amplifiziert. Die in den Primern enthaltenen Schnittstellen erlaubten anschließend, die DNA-Fragmente directional in den Vektor pBF1 (W. Frommer, Tübingen) zu klonieren, der einen T7 Promotor, eine 40 Nukleotide lange Poly-A-Sequenz, und einen T7 Transkriptions-Terminator enthält. Von diesen Konstrukten, p1ORF und p6ORF (Abb. 8.3, im Anhang), wurden durch *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase cRNAs hergestellt und zur Expression in die Oozyten injiziert. Als Negativkontrolle wurden einige Oozyten mit Wasser statt cRNA-Lösung injiziert. Die Messung der Aufnahme von Aminosäuren in die Oozyten erfolgte indirekt über das Membranpotential der Zellen, das durch eine in die Oozyte injizierte Mikroelektrode und eine Referenzelektrode in der umgebenden Waschlösung abgenommen wurde (s. 2.15).

Bei den Wasser-injizierten Kontrolloozyten bewirkte keine der getesteten Aminosäuren eine Veränderung des Membranpotentials. Dagegen führte die Addition von 5 mM, 0,5 mM oder 0,1 mM einer proteinogenen Aminosäure bei allen *BnAAP1*- oder *BnAAP6*-injizierten Oozyten zu einer Membrandepolarisation, deren Intensität von der Aminosäure und ihrer Konzentration abhing. Abb. 3.7 zeigt die Depolarisation derselben *BnAAP1*-injizierten Oozyte durch drei verschiedene Konzentrationen von Alanin. Die Stärke der Depolarisation nahm mit der Aminosäurekonzentration zu, allerdings nicht in proportionaler Weise.

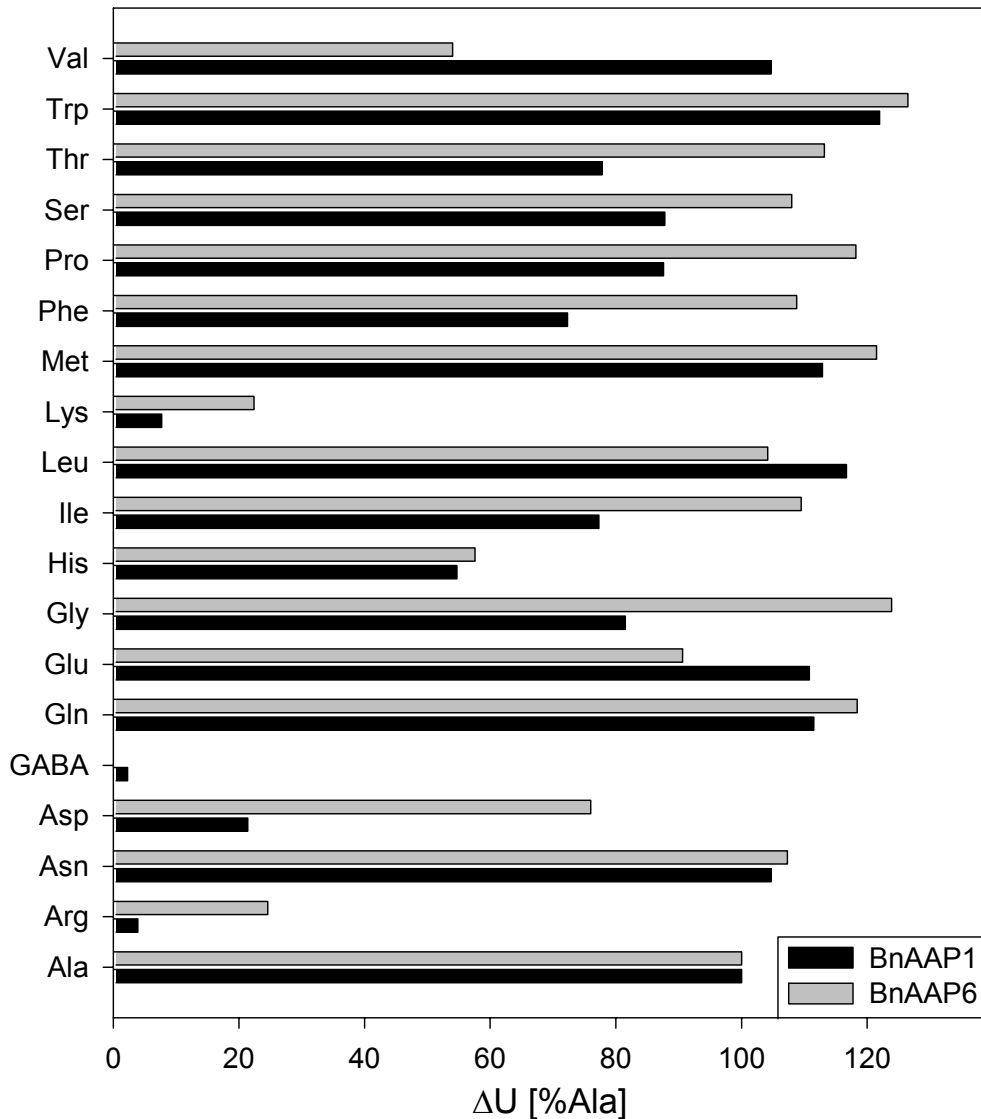




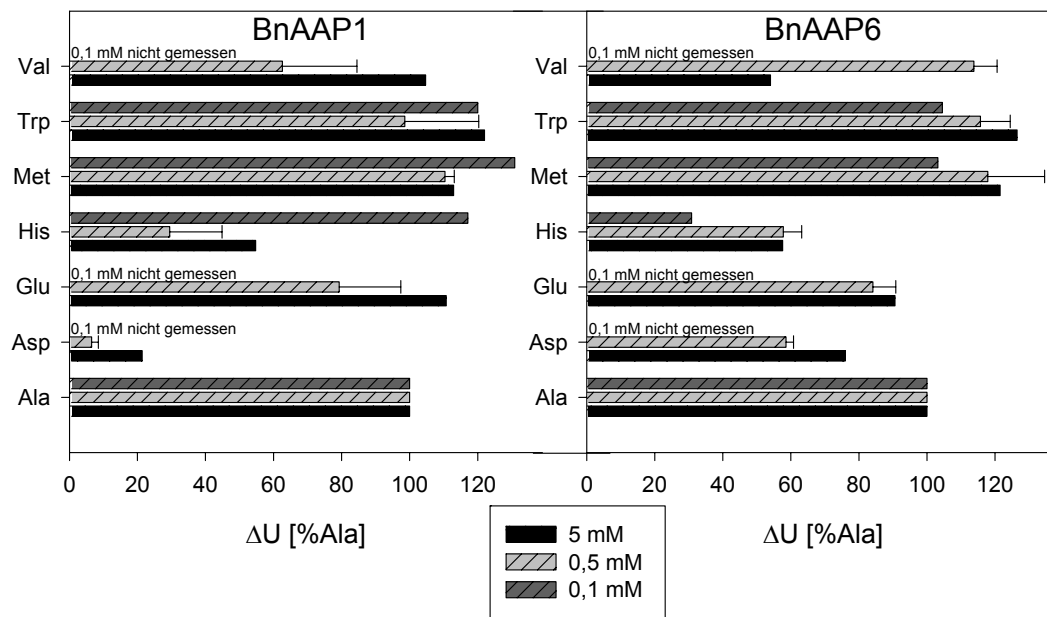
**Abb. 3.7: Depolarisation der Membran einer *BnAAP1*-injizierten Oozyte durch drei verschiedene Konzentrationen von Alanin.** Die Änderung des Membranpotentials ist der Aminosäurekonzentration in der Waschlösung nicht direkt proportional. In der mittleren Abbildung sind die Zeitpunkte markiert, an denen die Zusammensetzung der Waschlösung geändert wurde (s. 2.15).

Zur Untersuchung der Substratspezifität der Transporter wurden zunächst *BnAAP1*- und *BnAAP6*-injizierte Oozyten jeweils mit 5 mM Lösungen aller proteinogenen Aminosäuren (ausgenommen Cystein und Tyrosin) sowie 5 mM  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) getestet. Alle Membranpotentialänderungen wurden relativ zu der durch Alanin erzeugten Depolarisation in Prozent umgerechnet. Dabei wurden wegen der besseren Vergleichbarkeit möglichst viele Aminosäuren pro Oozyte gemessen. Da die Membran der Zellen aber durch die Injektion der Elektrode geschädigt wird und die mehrfachen Depolarisationen und Repolarisationen die Regenerationsfähigkeit der Oozyte erschöpfen, war es meistens nicht möglich, alle Aminosäuren an einer einzigen Zelle zu testen. In diesem Falle wurde für jede neue Oozyte wiederum Alanin als Bezugsgröße gemessen. Für *BnAAP1* wurden alle Aminosäuren 2-3 mal bei 5 mM getestet, für *BnAAP6* nur einmal, in diesem Fall aber an einer einzigen Oozyte. Die Substratspezifität der Transporter ist in Abb. 3.8 dargestellt.

Sowohl *BnAAP1* als auch *BnAAP6* transportierten alle angebotenen proteinogenen ( $\alpha$ -) Aminosäuren, nicht jedoch die  $\gamma$ -Aminosäure GABA. Am schlechtesten wurden von beiden Transportern die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin transportiert. Deutlich geringere Membrandepolarisationen als Alanin rief bei *BnAAP1* und *BnAAP6* auch die basische Aminosäure Histidin hervor, sowie bei *BnAAP1* die saure Aminosäure Aspartat und bei *BnAAP6* die neutrale Aminosäure Valin. Alle übrigen Aminosäuren erzeugten Depolarisationen in einer ähnlichen Größenordnung wie Alanin, einschließlich der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan.



**Abb. 3.8:** Depolarisation der Membran von *BnAAP1*- bzw. *BnAAP6*-injizierten Oozyten in Abhängigkeit von der getesteten Aminosäure. Alle Aminosäuren wurden in 5 mM Konzentration getestet. Die Werte sind jeweils relativ zu Alanin angegeben. Die Aminosäuren sind mit ihrem Drei-Buchstaben-Code bezeichnet. GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure.



**Abb. 3.9: Substratspezifität von BnAAP1 und BnAAP6 in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.** Alle Werte sind jeweils bezogen auf die durch dieselbe Konzentration von Alanin hervorgerufene Depolarisation. Die Aminosäuren sind mit ihrem Drei-Buchstaben-Code bezeichnet. Für die Messungen bei 5 mM und 0,1 mM ist  $n=1-2$ , für 0,5 mM ist  $n=3$ . In diesem Fall sind Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt.

Für insgesamt sieben saure (Aspartat, Glutamat), basische (Histidin), neutrale (Alanin, Methionin und Valin) und aromatische (Tryptophan) Aminosäuren wurde die Substratspezifität bei je drei Konzentrationen, 0,1 mM, 0,5 mM und 5 mM, bestimmt. Um unabhängige Experimente zu erhalten, wurden zahlreiche Oozyten verwendet und jeweils nur einige Aminosäuren und Konzentrationen mit jeder Zelle gemessen. Als Bezugsgröße diente in jeder Meßreihe die entsprechende Konzentration von Alanin (Abb. 3.9). Alle bei 0,1 mM getesteten Aminosäuren wurden von BnAAP1 und BnAAP6 transportiert. Eine Veränderung gegenüber der relativen Depolarisation bei 5 mM zeigte sich nur für Histidin und Valin. Bei BnAAP1 erzeugten 5 mM Histidin 54,7 % der durch 5 mM Alanin hervorgerufenen Membran-Depolarisation, 0,1 mM Histidin aber 117,1 % des Wertes für 0,1 mM Alanin. Bei BnAAP6 riefen 5 mM Valin 54,0 % der Depolarisation bei 5 mM Alanin hervor, 0,5 mM Valin aber  $113,8 \pm 6,8$  % der Depolarisation bei 0,5 mM Alanin.

### 3.6 Untersuchungen zur Expression von *BnAAP1* und *BnAAP6* in der Pflanze

Parallel zur vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen einer Diplomarbeit die organspezifische Expression von *BnAAP1* und *BnAAP6* anhand von Northern Blot-Analysen und RT-PCR untersucht (Kassner 2003). Im Folgenden werden darüber hinausgehende weitere Experimente zur Genexpression beschrieben: die Untersuchung der Promotoraktivität von *BnAAP6* mittels einer GUS-Reporterengenfusion, die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen BnAAP6 für eine Immunlokalisation des Proteins und die Analyse der Expression beider Gene im Verlauf der Blattentwicklung auf mRNA-Ebene. Für alle Experimente wurde Winterraps der Sorte Lirajet verwendet.

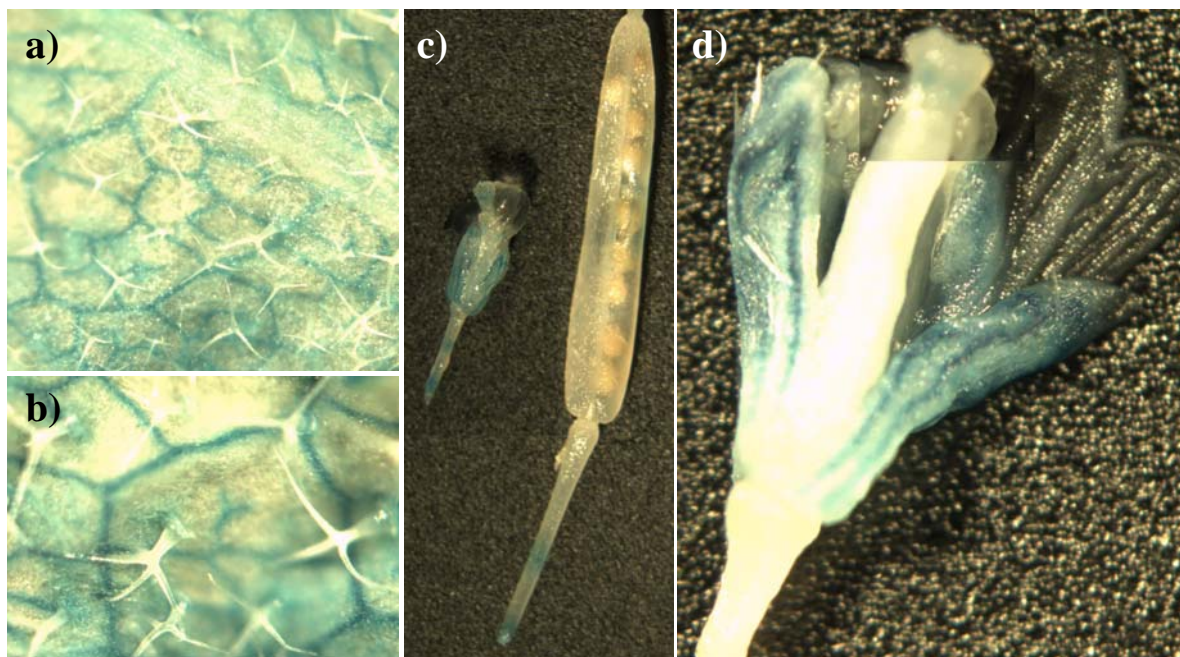
#### 3.6.1 Untersuchung einer *BnAAP6*-Promotor-Reporterengenfusion

Ein 2310 bp Promotor-Fragment von *BnAAP6* wurde durch Genome Walking mit den Primern walk1 und walk2 (Tab. 2.1) aus einer *PvuII*-Walking-Bibliothek amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in pGEM-T Easy kloniert und mit den Primern T7 Promotor, M13 rev (vektorspezifisch), P6f2, P6f3, P6r2 und P6r3 (promotorspezifisch) vollständig beidseitig durchsequenziert. Die Sequenz ist mit der Accession No. AJ580452 in den Datenbanken hinterlegt und findet sich in Anhang 8.4 dieser Arbeit.

Der *BnAAP6*-Promotor weist keinerlei signifikante Homologie zu irgendeiner Sequenz in den Datenbanken auf, insbesondere nicht zur Promotorsequenz von *AtAAP6* (Sequenzidentität 40,4 %). Es sind keine genau den Konsensus-Sequenzen TATA<sup>A</sup>/<sub>T</sub>A<sup>A</sup>/<sub>T</sub> bzw. GG<sup>C</sup>/<sub>T</sub>CAATCT entsprechenden TATA- (Hogness-) und CAAT-Boxen vorhanden, aber ein Vorhersageprogramm für eukaryotische Promotoren (Promoter predictor, Reese 2001; [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) sagt aufgrund typischer Promotorelemente den tatsächlichen Transkriptionsstart auf fünf Nukleotide genau voraus. Eine Suche in der TRANSFAC-Datenbank (Heinemeyer *et al.* 1998) mit dem Programm TFSEARCH (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH>) ergab nur eine signifikante Homologie zu bekannten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen: Die Basenpaare 938-951 der *BnAAP6*-Promotor-Sequenz enthalten eine potentielle Bindungsstelle für das Protein SBF-1, das eine Silencer-Region im Promotor der Chalcon-Synthase von *Phaseolus vulgaris* bindet, eines Schlüsselenzyms der Flavonoid-Biosynthese (Lawton *et al.* 1991).

Zur Analyse der Funktion des *BnAAP6*-Promotors in der Pflanze wurde eine Fusion mit dem Reporter gen *GUS* hergestellt, das für eine bakterielle  $\beta$ -Glucuronidase kodiert. Dazu wurde der in pGEM-T Easy klonierte Promotor mit *EcoRI* wieder aus dem Vektor ausgeschnitten

und nach einer Auffüll-Reaktion über glatte Enden in den mit *Sma*I linearisierten binären Vektor pBI101.3 ligiert. Dieses Konstrukt (p6P-GUS-Km, Abb. 8.4, im Anhang) wurde zunächst in *E. coli* transformiert, um das Insert und die Insertionsrichtung durch Sequenzierung zu überprüfen. Mit einem Klon des gewünschten Konstruktes wurden anschließend Agrobakterien transformiert, die zur Pflanzentransformation dienen. Sowohl *B. napus* als auch *A. thaliana* wurden transformiert. Aus der Rapstransformation wurden keine transgenen Pflanzen erhalten. Transgene Arabidopsis-Pflanzen der T1-Generation wiesen bei Vorversuchen GUS-Aktivität in den Blattadern auf. Das pBI101.3-Plasmid trägt eine Kanamycin-Resistenz, die eine Selektion der Keimlinge auf Agar-Platten notwendig macht. Das aus der Transformation erhaltene Saatgut war mit einem extrem hartnäckigen Schimmelpilz kontaminiert, der sich auch durch Verschärfung der Bedingungen der Oberflächensterilisation bis hin zum Abtöten der Arabidopsis-Samen nicht entfernen ließ. Das gesamte erhaltene Samenmaterial und auch das aus einer zweiten Transformation wurde verbraucht, ohne das es gelang, pilzfreie Agarplatten zu erhalten.



**Abb. 3.10: Aktivität des *BnAAP6*-Promotors in transgenen Arabidopsis-Pflanzen.** Material von transgenen Pflanzen wurde 2 h mit GUS-Färbelösung in Gegenwart von 10 mM Ferro/Ferricyanid gefärbt und anschließend mit Ethanol gebleicht. a) und b) Source-Blatt (Details). c) Blüte und Schote. d) Vergrößerte Ansicht der Blüte aus c). Eine zweite Aufnahme der Narbe ist für bessere Tiefenschärfe eingefügt.

Um die Gefahr von Pilzkontaminationen zu verringern, wurde ein neues Konstrukt hergestellt, das eine Selektion mit dem Herbizid Glufosinat („BASTA“) ermöglicht. Dadurch konnten die Arabidopsis-Samen auf Erde statt auf Agarplatten ausgesät und selektioniert werden. Ein weiterer Vorteil ist, daß „BASTA“ eine deutlich stringenter Selektion ermöglicht als Kanamycin. Von Nachteil für die spätere GUS-Färbung des Pflanzenmaterials ist allerdings, daß die Anzucht auf Erde durch die geringere Luftfeuchtigkeit gegenüber geschlossenen Agarplatten zwar den Pilzbefall reduziert, bei den Pflanzen aber auch zu einer stärker ausgeprägten Cuticula führt, die die Infiltration mit Färbelösung erschwert. Zur Umklonierung wurde der *BnAAP6*-Promotor mitsamt dem *GUS*-Reportergen durch Restriktion mit *EcoRI* und *HindIII* aus p6P-GUS-Km ausgeschnitten. Der Vektor pCAMBIA3300, der die „BASTA“-Resistenzkassette trägt, wurde ebenfalls mit diesen zwei Enzymen linearisiert, wodurch zugleich der auf dem Plasmid enthaltene CaMV 35S-Promotor herausgeschnitten wurde. Durch Ligation der *BnAAP6*-Promotor-*GUS*-Kassette in pCAMBIA3300 wurde das Plasmid p6P-GUS-BASTA erhalten (Abb. 8.4, im Anhang), das für eine erneute Arabidopsis-Transformation verwendet wurde. Es wurden transgene Pflanzen der T2-Generation erhalten und für GUS-Färbungen verwendet. Im Zeitraum dieser Arbeit war es nicht mehr möglich, umfangreichere Versuche mit den Pflanzen der nächsten Generation (T3) durchzuführen.

Alle getesteten Promotor-GUS-Pflanzen wiesen eine starke Färbung der Blattadern von Source-Blättern auf. Diese Färbung erstreckte sich auf Blattadern aller Ordnungen mit Ausnahme der Mittelrippe und war bereits nach 2 Stunden deutlich sichtbar (Abb. 3.10a und b). Auch die Leitgefäße der Blütenkelchblätter zeigten GUS-Aktivität, nicht jedoch die Kronblätter (Abb. 3.10c und d). In manchen Pflanzen war außerdem eine leichte Färbung der Narbe (Abb. 3.10d) feststellbar. Die Schoten (Abb. 3.10c) und die Sproßachse nahe der Infloreszenz wiesen keine Färbung auf. Die Diffusion des Substrats X-Gluc war durch Zugabe von 10 mM Ferro/Ferricyanid zur Färbelösung minimiert.

### 3.6.2 Herstellung von BnAAP6-spezifischen polyklonalen Antikörpern

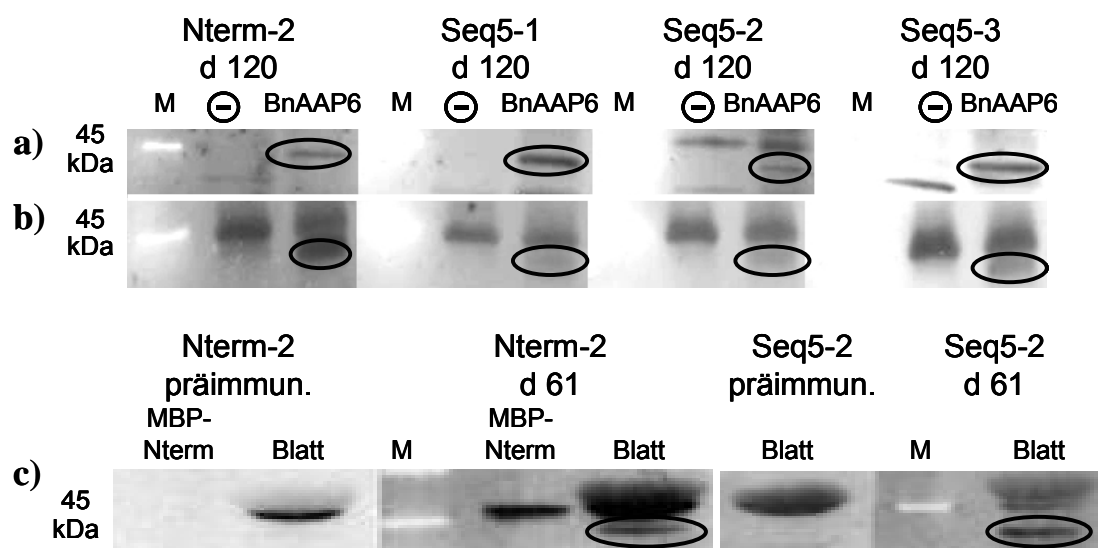
Um eine zellspezifische Immunolokalisation des nativen BnAAP6 Proteins zu ermöglichen wurden polyklonale Antikörper gegen zwei Peptidfragmente des Transporters hergestellt. Ausgewählt wurden dazu der N-Terminus (Nterm, Aminosäure 1-16) und eine Sequenz aus einer putativen intrazellulären Schleife (Seq5, Aminosäure 353-367) des Polypeptids. Beide wiesen in einer von der Fa. Pineda Antikörperservice, Berlin durchgeführten Epitopanalyse gute antigene Eigenschaften auf.

In einem ersten Ansatz zur Antikörperherstellung wurden die zwei synthetischen Oligonukleotide ANTI-1 und ANTI-2 (Tab. 2.1) miteinander hybridisiert. Das dabei gebildete doppelsträngige DNA-Fragment kodiert für das Nterm Epitop und wurde in den mit *HindIII* und *ScaI* linearisierten Vektor pMal-c2X ligiert. Dadurch entsteht eine C-terminale translationale Fusion des Nterm Polypeptids an das Trägerprotein MBP (Maltose Bindeprotein). Die Ligation im korrekten Leseraster wurde durch Sequenzierung mit dem vektorspezifischen Primer pMal-seqf überprüft und das gewünschte Konstrukt in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Dort wurde das MBP-Nterm Fusionsprotein überexprimiert und anschließend durch präparative SDS-PAGE aus den lysierten Bakterienzellen aufgereinigt. Mit je 300 µg Fusionsprotein wurden von der Fa. Pineda Antikörperservice drei Kaninchen immunisiert, von denen eins etwa einen Monat später starb. Die aus den übrigen beiden Kaninchen erhaltenen Antiseren erbrachten in Western Blot Experimenten aufgrund starker Kreuzreaktionen keine befriedigenden Ergebnisse und wurden nicht weiter verwendet. Das MBP-Nterm Fusionsprotein diente aber bei der weiteren Antikörperherstellung als Positivkontrolle in Western Blots.

In einem zweiten Ansatz wurden Antiseren gegen die synthetisch hergestellten Oligopeptide Nterm und Seq5 hergestellt, die chemisch an das Trägerprotein KLH (Keyhole Limpid Hemocyanine) gekoppelt waren. Durch die chemische Koppelung an das Trägerprotein können im Gegensatz zur gentechnischen Herstellung eines Fusionsproteins mehrere Epitope an jedes Trägermolekül gekoppelt werden. Die Peptidsynthese, chemische Koppelung an KLH und Immunisierung von je drei Kaninchen wurden wiederum von der Fa. Pineda Antikörperservice durchgeführt. Auch hier starb eines der drei mit Nterm-KLH immunisierten Tiere nach kurzer Zeit. Von den übrigen fünf Antiseren erwies sich Nterm-1 (aus Tier 1 der Nterm-KLH Immunisierung) als unbrauchbar, da eine sehr starke Kreuzreaktivität mit allen getesteten Blockmitteln auftrat. Die verbleibenden vier Antiseren Nterm-2, Seq5-1, Seq5-2 und Seq5-3 wurden in Western Blots auf ihre Spezifität getestet.

Als Positivkontrolle zur Erkennung des BnAAP6 Proteins dienten dabei sowohl die in Abschnitt 3.5 beschriebenen *BnAAP6*-exprimierenden *Xenopus* Oozyten als auch *BnAAP6*-exprimierende *E. coli* Rosetta-Zellen. Für die *E. coli*-Expression wurde das bereits für die Sequenzierung verwendete pET15b-BnAAP6 Konstrukt (3.4.2) verwendet. Die Proteinexpression erfolgte für 10 Tage bei 15 °C, da die Expression eukaryotischer Membranproteine in Bakterienzellen bei höheren Temperaturen oft das Wachstum der Bakterienkolonie verhindert. In Lysaten *BnAAP6*-exprimierender Bakterienzellen war in silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgelen keine Proteinbande nachweisbar, die in

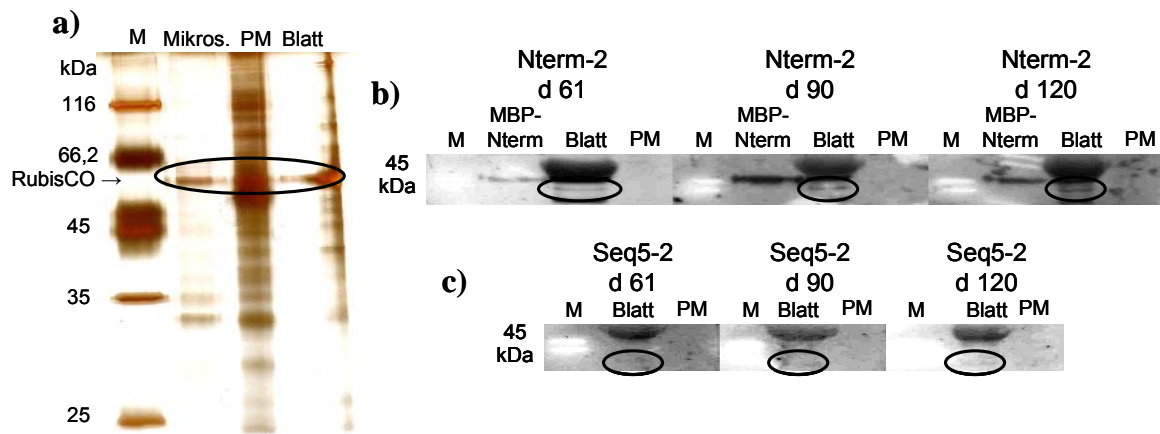
untransformierten Kontrollzellen fehlte. Dennoch zeigten alle vier Antiseren in Western Blots eine nur in den *BnAAP6*-exprimierenden Zellen auftretende Bande bei ca. 43 kDa (Abb. 3.11a). Das ist ca. 10 kDa kleiner als das vorausgesagte Molekulargewicht des BnAAP6-Proteins. Integrale Membranproteine laufen in SDS-Polyacrylamidgelen häufig schneller als globuläre Proteine mit dem gleichen Molekulargewicht (Sauer & Tanner 1984). Eine 43 kDa Bande wurde auch in *BnAAP6*-injizierten Oozyten, aber nicht in Wasser-injizierten Kontrolloozyten gefunden (Abb. 3.11b). Das Nterm-2 Antiserum erkannte außerdem das MBP-Nterm Fusionsprotein (Abb. 3.11c).



**Abb. 3.11: Test von polyklonalen Antikörpern gegen BnAAP6.** Western Blots mit a) *BnAAP6*-exprimierenden *E. coli* Rosetta-Zellen, b) *BnAAP6*-exprimierenden *Xenopus* Oozyten und c) Pflanzenproben. d: Tage seit Erstimmunisierung, M: Größenstandard, Minuszeichen: Negativkontrolle (untransformierte *E. coli* Zellen bzw. Wasser-injizierte Oozyten), BnAAP6: *BnAAP6*-exprimierende *E. coli* Zellen oder Oozyten, MBP-Nterm: MBP-Nterm Fusionsprotein als Positivkontrolle, Blatt: Blatt-Rohextrakt. Die 43 kDa-Bande von BnAAP6 ist eingekreist.

In Blatt-Rohextrakten detektierten sowohl gegen Nterm als auch gegen Seq5 gerichtete Antiseren ebenfalls ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 43 kDa, das von Präimmunseren der entsprechenden Tiere nicht erkannt wurde (Abb. 3.11c). Allerdings trat auch eine starke Kreuzreaktion mit einem etwa 52 kDa großen Protein auf, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um die große Untereinheit der RubisCO handelte. Für eine weitere Überprüfung der Antiseren wurden Plasmamembranfraktionen (PM) aus Rapsblättern angereichert.

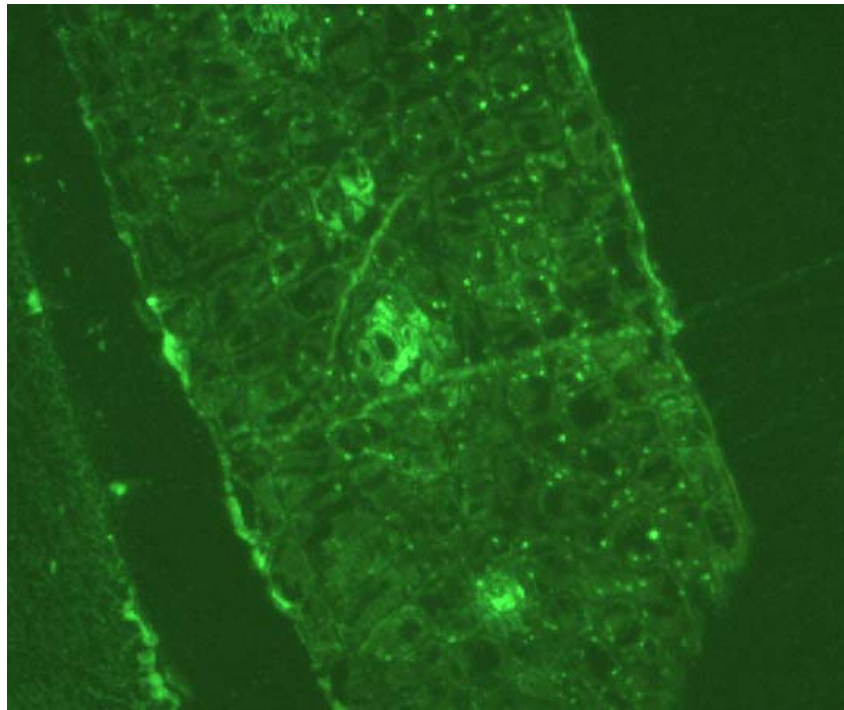




**Abb. 3.12: Test von polyklonalen Antikörpern gegen BnAAP6.** a) SDS-PAGE von angereicherten Plasmamembranen. b) und c) Western-Blots mit Pflanzenproben. M: Größenstandard, Mikros.: Mikrosomen (Gesamtmembran-Fraktion), PM: Plasmamembran-Fraktion, d: Tage seit Erstimmunisierung, MBP-Nterm: MBP-Nterm Fusionsprotein als Positivkontrolle, Blatt: Blatt-Rohextrakt. Im SDS-Gel ist die große Untereinheit von RubisCO eingekreist, in den Western Blots die 43 kDa-Bande von BnAAP6.

Eine hochangereicherte PM-Probe, bei der das Verhältnis der Vanadat-hemmbareren Plasmamembran-ATPase-Aktivität zur ungehemmten Gesamt-ATPase-Aktivität 1,0 betrug, wurde in Western Blots getestet. Keines der Antiseren detektierte das erwartete 43 kDa-Protein (Abb. 3.12b und c). Andererseits trat auch keinerlei Kreuzreaktion mit anderen Proteinen auf, insbesondere nicht mit RubisCO, die trotz des hohen Reinheitsgrades noch in der PM-Probe vorhanden war (Abb. 3.12a). Da die PM-Probe insgesamt nur noch einen sehr geringen Proteingehalt aufwies (ca. 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), wurde das BnAAP6-Protein bei der Aufreinigung wahrscheinlich weitgehend verloren. Auch in Gesamtmembran- (Mikrosomen-) Fraktionen war das gesuchte Protein nicht detektierbar.

Die Antiseren Nterm-2 und Seq5-2, die ein deutliches Signal mit *E. coli*- und Oozytenproben, aber nur geringe Kreuzreaktivität mit Blatt-Rohextrakten lieferten, wurden schließlich für einen Immunolokalisationsversuch ausgewählt. Dazu wurden 2  $\mu\text{m}$ -Semidünnschnitte von in Methacrylat eingebetteten jungen Rapsblättern (Lirajet, auf 4 mM Nitrat hydroponisch angezogen) hergestellt. Die Schnitte wurden über Nacht mit dem Primärantiserum inkubiert und gebundene Antikörper anschließend durch einen Fluoreszenzfarbstoff- (FITC-) gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Obwohl mit beiden Primärantiseren in manchen Schnitten eine leichte Fluoreszenz im Bereich der Leitbündel erkennbar war, war das Signal zu schwach, um es von der Autofluoreszenz der Xylemgefäße zu unterscheiden. Mit den in dieser Arbeit hergestellten polyklonalen Antikörpern war somit eine zellspezifische Immunolokalisation von BnAAP6 nicht möglich.



**Abb. 3.13: Semidünnschnitt eines Rapsblattes inkubiert mit anti-BnAAP6-Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper.** Querschnitt eines in Methacrylat eingebetteten jungen Rapsblattes (Lirajet). Die Pflanze wurde bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> hydroponisch angezogen. Der 2 µm-Semidünnschnitt wurde über Nacht mit Nterm-2 Antiserum vom 150. Tag nach der Erstimmunisierung und anschließend mehrere Stunden mit Ziege-anti-Kaninchen IgG-FITC-Konjugat inkubiert. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 450-490 nm.

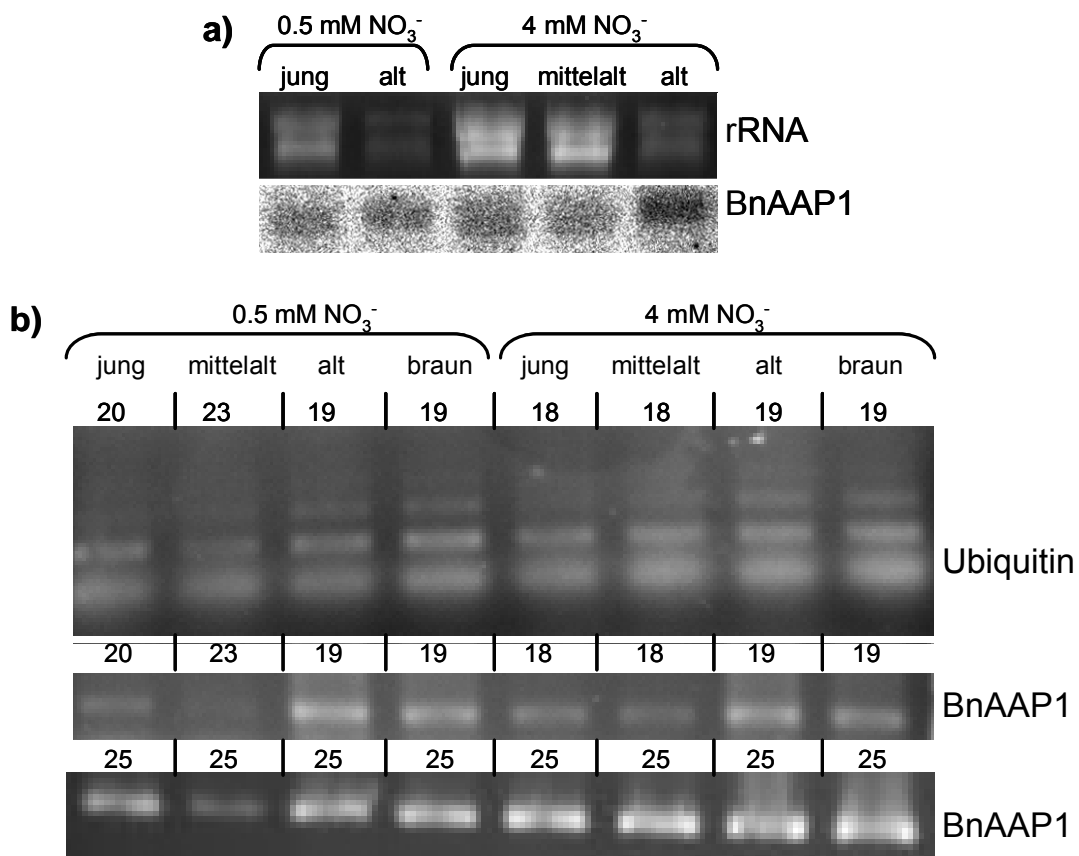
### 3.6.3 Expression von *BnAAP1* und *BnAAP6* in verschiedenen Blattaltersstufen

#### 3.6.3.1 *BnAAP1*

Die Veränderung der Expression von *BnAAP1* und *BnAAP6* wurde auf mRNA-Ebene durch Northern Blot-Analysen und RT-PCR untersucht. Dabei wurden folgende Blattaltersstufen von hydroponisch mit 0,5 mM oder 4 mM Nitrat in der Nährlösung angezogenen Rapspflanzen (Lirajet) unterschieden: Die als „jung“ bezeichneten Blätter waren maximal 2 cm lang und wuchsen an Seitenknospen der ca. 4-5 Wochen alten Pflanzen. „Mittelalte“ Blätter waren ca. 10-15 cm lang und äußerlich vollkommen gesund. „Alte Blätter“ waren bis zu 20 cm lang und wiesen erste Anzeichen von Ausbleichen und Welken auf. „Braune“ Blätter waren bereits deutlich gelb- bis braunefärbt, zeigten fortgeschrittenes Welken und z.T. eine beginnende Ablösung der Blattstielbasis vom Stengel.

Aufgrund des hohen Polysaccharidgehaltes von Rapsgewebe erwies es sich als schwierig, ausreichend große Mengen von Gesamt-RNA in einer Reinheit zu erhalten, die eine genaue Quantifizierung erlaubte. Häufig waren die zuvor anhand ihrer Absorption bei 260 nm und in

Testgelen quantifizierten und auf einheitliche RNA-Mengen eingestellten Proben anschließend dennoch deutlich unterschiedlich im RNA-Gehalt (Abb. 3.14a). Außerdem wurden selbst mit bis zu 20 µg RNA pro Geltasche stets nur sehr schwache Hybridisierungssignale erhalten. Daher wurden zur quantitativen Abschätzung der Transkriptmengen RT-PCR Experimente mit limitierender Zyklenzahl durchgeführt, bei denen die Produktmenge unterhalb des Sättigungsbereiches bleibt und der eingesetzten Matrizenmenge proportional ist. Um Unterschiede in der Qualität der cDNA-Matrizen auszugleichen wurden zunächst RT-PCRs mit Ubiquitin-spezifischen Primern (ubifor, ubirev, Tab. 2.1) durchgeführt. Die Anzahl der RT-PCR Zyklen für die Amplifikation von *BnAAP1* oder *BnAAP6* wurde dann für jede Probe anhand der Zyklenzahl gewählt, bei der zuerst Ubiquitin-spezifische Banden sichtbar waren.



**Abb. 3.14: Expression von *BnAAP1* in Abhängigkeit vom Blatalter und der N-Versorgung.** a) Northern Blot: Gelfoto der 28S rRNA und Hybridisierungsergebnis mit einer 0,5 kb *BnAAP1*-Sonde. Eingesetzt wurden 20 µg Gesamt-RNA je Geltasche. b) RT-PCR mit limitierender Zyklenzahl. Zahlen oberhalb der Gelbahnen geben die Anzahl der PCR-Zyklen an. Verwendet wurden die Primer ubifor und ubirev für die Detektion von Ubiquitin-mRNA sowie BA1f1 und BA1r1 für die *BnAAP1*-Detektion. Je 0,1 Vol. einer RT-Reaktion aus 3 µg Gesamt-RNA wurden eingesetzt. 0,5 mM und 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitratkonzentration der in hydroponischer Kultur verwendeten Nährlösung.

Abb. 3.14a zeigt einen typischen Northern Blot bei dem sich die eingesetzten RNA-Mengen im Nachhinein als unterschiedlich erwiesen. Interessanterweise nahm dabei bei beiden N-Stufen die Intensität des Hybridisierungssignals mit dem Blattalter trotz geringerer RNA-Mengen zu. Die Expression von *BnAAP1* ging also in alten Blättern nicht zurück, sondern stieg sogar eher an. Allerdings fehlten die älteste Altersstufe („braun“) sowie die mittelalten Blätter der 0,5 mM Nitrat-Pflanzen in diesem Experiment.

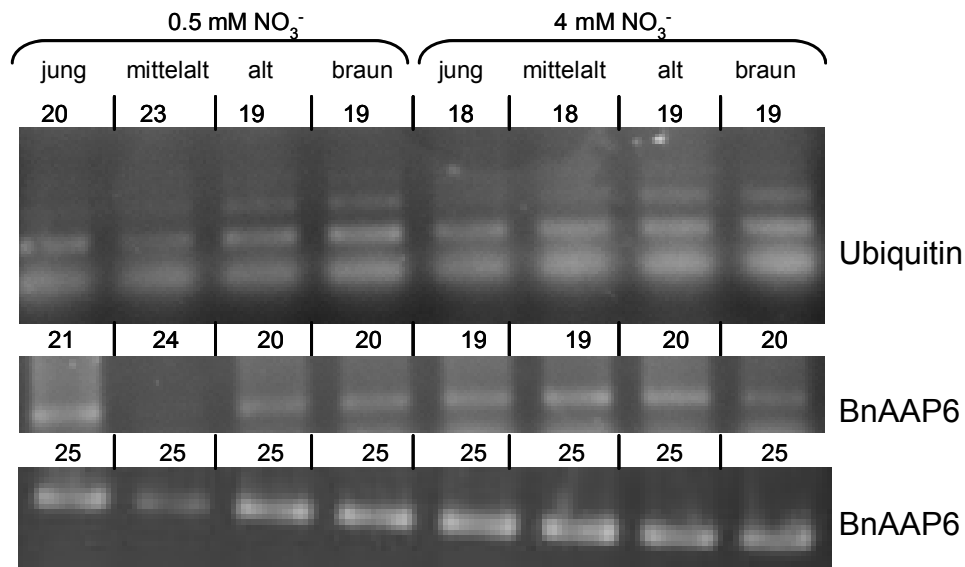
RT-PCR Experimente ergaben übereinstimmende Ergebnisse (Abb. 3.14b). Bei Zyklenzahlen, die in den beginnenden Sättigungsbereich kamen (25 Zyklen, unteres Gelfoto), war *BnAAP1*-mRNA in allen Blattaltern beider N-Stufen nachweisbar. Bei limitierenden Zyklenzahlen (18-23 Zyklen, mittleres Gelfoto) wiesen jeweils die Altersstufen „alt“ und „braun“ die stärksten Banden auf. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Proben bereits beim ersten deutlichen Sichtbarwerden von Ubiquitin-Banden (oberes Gelfoto) etwas unterschiedliche Produktmengen ergaben. Insbesondere waren bei der Probe aus mittelalten Blättern der 0,5 mM Nitrat-Pflanzen deutlich mehr PCR-Zyklen notwendig, um Ubiquitin-Banden zu erhalten. Die besonders schwache Amplifikation von *BnAAP1* in dieser Probe ist deshalb vermutlich auf die niedrige Qualität der cDNA-Matrize zurückzuführen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse aber, daß bis zu äußerlich deutlich seneszenten Blättern keine Abnahme der Menge an *BnAAP1*-mRNA mit dem Blattalter stattfand.

### 3.6.3.2 *BnAAP6*

Für *BnAAP6* wurden keine verwertbaren Northern Blot-Ergebnisse erhalten. Die Hybridisierungssignale waren so schwach, daß die mRNA nur in den Proben detektierbar war, die am meisten RNA enthielten. Aufgrund der Schwierigkeiten, die RNA genau zu quantifizieren und in allen Proben dieselbe Konzentration einzustellen, war ein Vergleich der Blattalter miteinander nicht möglich.

In RT-PCR Experimenten war auch die mRNA von *BnAAP6* in allen Blattalterstufen nachweisbar (25 Zyklen, Abb. 3.15, unteres Gelfoto). Wie für *BnAAP1* wurden signifikant schwächere Amplifikationsergebnisse mit der Probe aus mittelalten Blättern der 0,5 mM Nitrat-Pflanzen erhalten, wahrscheinlich aufgrund einer qualitativ schlechteren cDNA-Matrize. Die Amplifikation war insgesamt schwächer als bei *BnAAP1*, so daß alle Zyklenzahlen um eins erhöht werden mußten, um Banden zu erhalten. Bei limitierender Zyklenzahl (mittleres Gelfoto) war eine schwache Abnahme der Menge an *BnAAP6*-mRNA mit dem Blattalter feststellbar. Im Vergleich dazu zeigten bei den niedrigsten Zyklenzahlen, bei denen Ubiquitin-Banden sichtbar waren (oberes Gelfoto), gerade die ältesten Blattalter

beider N-Stufen jeweils die stärkste *BnAAP6*-Amplifikation. Die Ergebnisse zeigen somit, daß die Menge an *BnAAP6*-mRNA mit dem Blattalter leicht abnahm, aber selbst in äußerlich deutlich seneszenten Blättern war noch Transkript vorhanden.



**Abb. 3.15: Expression von *BnAAP6* in Abhängigkeit vom Blattalter und der N-Versorgung.** RT-PCR mit limitierender Zyklenzahl. Zahlen oberhalb der Gelbahnen geben die Anzahl der PCR-Zyklen an. Verwendet wurden die Primer ubifor und ubirev für die Detektion von Ubiquitin-mRNA sowie BA6f2 und BA6r2 für die *BnAAP6*-Detektion. Je 0,1 Vol. einer RT-Reaktion aus 3 µg Gesamt-RNA wurden eingesetzt. 0,5 mM und 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitratkonzentration der in hydroponischer Kultur verwendeten Nährlösung.

## 4. Diskussion

### 4.1 Variabilität der Stickstoffeffizienz bei Winterraps

Raps ist in Europa die wichtigste Öl-liefernde Kulturpflanze. Ihr Anbau bringt jedoch Probleme mit sich, da für die aus landwirtschaftlicher Sicht gewünschten Ertragsgrößen der Einsatz sehr hoher N-Düngergaben notwendig ist. Dies verursacht einerseits erhebliche Kosten, andererseits gelangen aus der schnell mineralisierenden Rapsstreu große Mengen anorganischen Stickstoffs ins Grundwasser (Dejoux *et al.* 1999, Sieling & Christen 1999, Trinsoutrot *et al.* 1999, 2000). Die Untersuchung der Stickstoffeffizienz bei Raps ist deshalb von zunehmender ökonomischer und ökologischer Bedeutung. Die vorliegende Arbeit war Teil eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes mit dem langfristigen Ziel, Ansätze für eine züchterische oder gentechnische Verbesserung der Stickstoff-Nutzungseffizienz zu finden.

Als Voraussetzung dafür, die N-Effizienz von Raps verbessern zu können, muß zunächst quantifiziert werden, inwieweit dieses komplexe Merkmal des pflanzlichen Stoffwechsels vom Genotyp der Pflanze bzw. von Umwelteinflüssen abhängt. Eine geeignete Methode dazu ist der Vergleich von Kultursorten bei unterschiedlicher Stickstoffversorgung. Für in Kanada angebauten Sommerraps wurden bereits entsprechende Versuche durchgeführt, die ein starke sortenabhängige (und damit eher genotypisch bestimmte) Variabilität der N-Effizienz aufzeigten (Grami & LaCroix 1977, Yau & Thurling 1987). Für den in Europa landwirtschaftlich bedeutenderen Winterraps lagen bis zu diesem DFG-Projekt keine ausführlichen Sortenvergleiche unter Freilandbedingungen vor. Er hat aufgrund der längeren Vegetationszeit, die eine Überwinterungsperiode einschließt, einen ganz anderen Entwicklungsablauf als Sommerraps. Barszcak *et al.* (1993), Gerath & Schweiger (1991) und Gerath & Balko (1995) verglichen verschiedene Winterraps-Sorten in Gefäßversuchen und fanden auch hier z.T. starke Unterschiede in der Reaktion des Samenertrags auf N-Mangel bzw. ein erhöhtes N-Angebot. In vorausgegangen Arbeiten im Rahmen dieses DFG-Projekts (Kessel 2000, Zhou 2000) wurden daher großangelegte Feldversuche mit zahlreichen Winterraps-Sorten an zwei Standorten und während drei Anbauperioden (1996/97-1998/99) durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war, daß auch Winterraps bezüglich der Stickstoffeffizienz eine große, sortenabhängige Variabilität aufweist. Um diese genotypische Variabilität genauer zu quantifizieren, wurden in den drei Folgejahren 1999/2000-2001/02 weitere Feldversuche durchgeführt, diesmal aber mit doppel-haploiden (DH-) Linien, die aus

einer einzigen Kreuzung (Apex x Mohican) hervorgegangen waren. DH-Linien werden hergestellt, indem man aus Mikrosporen (unreifen Pollenkörnern) in Gewebekultur haploide Embryos erzeugt und mit Colchizin behandelt. In der Pflanzenzüchtung sind DH-Linien von Bedeutung, weil bei ihnen eine Rückkreuzung nicht zu einer Aufspaltung von Merkmalen führt, so daß herausselektionierte Merkmalskombinationen problemlos weiter vermehrt werden können. In dem hier untersuchten Zusammenhang der Sortenvariabilität wurden DH-Linien eingesetzt, weil sie für jedes beliebige Allel homozygot sind. Eine Merkmalsaufspaltung zwischen DH-Linien mit einem gemeinsamen genetischen Ursprung, wäre deshalb nach der Mendelschen Genetik ein indirekter Beweis für genetische Ursachen von auftretenden Variationen z.B. in der N-Effizienz. Die in den Feldversuchen 1999-2002 getesteten DH-Linien wurden bezüglich ihres N-Metabolismus physiologisch (Metabolitkonzentrationen, Nitratreduktaseaktivität) und agronomisch (u.a. Samen-Proteingehalt, Samenertrag) untersucht. In dieser Arbeit wird ihre physiologische Charakterisierung dargestellt.

Tab. 4.1 faßt nochmals die bereits in Tab. 3.1 dargestellten Ergebnisse der Feldversuche zusammen und stellt sie den von Zhou (2000) mit 99 Winterraps-Sorten erhaltenen Daten gegenüber. Unter den getesteten Parametern finden sich kurzfristig variable Größen wie die Nitratreduktaseaktivität ebenso wie langfristig akkumulierte Werte wie der Samen-Proteingehalt. Trotz der nur halb so großen Anzahl von Linien und Standorten zeigten die DH-Linien in keiner der gemessenen Größen eine geringere Variabilität als die von Zhou 2000 untersuchten, nicht miteinander verwandten Sorten. Ein Teil der hohen Variabilität in beiden Versuchen ist wahrscheinlich auf von Jahr zu Jahr unterschiedliche klimatische Bedingungen zurückzuführen. Dennoch zeigt der Vergleich der DH-Linien mit den nicht miteinander verwandten Sorten deutlich die starke Beeinflussung der Stickstoffeffizienz durch den Genotyp und damit das bei Winterraps vorhandene züchterische Potential. Daß die Aufspaltung einer einzigen Kreuzung in jeweils homozygote Allelkombinationen eine so hohe Diversität hervorbringt, hängt sicherlich mit der Größe und dem hohen Redundanzgrad des Rapsgenoms zusammen. Diploide *Brassica* Spezies sind vermutlich durch eine Genom-Verdreifachung aus Arabidopsis-ähnlichen Vorfahren entstanden (Lagercrantz 1998, Lukens *et al.* 2003). Die amphidiploide Kreuzung von Gemüsekohl (*B. oleracea*) und Rübsen (*B. rapa*) zu Raps (*B. napus*) führte nochmals zu einer weiteren Verdoppelung des Genoms. Für diploide Kohlsorten konnte eine sehr rasche Anpassungsfähigkeit an klimatische Standortfaktoren beobachtet werden und dasselbe gilt auch für Raps (Wurr & Fellows 1998,

King *et al.* 1999). Die Variationsfähigkeit eines begrenzten Raps-Genpools bezüglich der N-Effizienz, die hier beobachtet wurde, bestätigt diese Anpassungsfähigkeit.

**Tab. 4.1: Gegenüberstellung der Daten aus Feldversuchen mit genetisch divergierenden Winterraps-Sorten und mit DH-Linien aus nur einer Kreuzung.** NRA: Nitratreduktase-Aktivität; Stabw: Standardabweichung; k.A.: keine Angabe.

		Zhou (2000): 99 Sorten, 2 Standorte 1996-1999		diese Arbeit: 45 DH-Linien + 2 Elternsorten, 1 Standort 1999-2002	
		Mittel ± Stabw.	Spanne	Mittel ± Stabw.	Spanne
Nitratgehalt im Blatt ( $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$ )	N <sub>0</sub>	0,6 ± 0,4	k.A.	0,1 ± 0,1	<0,1,-0,2
	N <sub>240</sub>	18,5 ± 17,3	k.A.	14,6 ± 3,8	8-19
NRA im Blatt ( $\text{nmol g}_{\text{FG}}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	N <sub>0</sub>	38,3 ± 8,0	23,9-62,2	25,7 ± 9,3	11-47
	N <sub>240</sub>	59,4 ± 15,7	39,1-85,8	60,6 ± 15,5	27-99
Aminosäuregehalt im Blatt ( $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$ )	N <sub>0</sub>	6,4 ± 0,4	5,1-9,6	9,9 ± 3,2	4,8-17,0
	N <sub>240</sub>	10,3 ± 3,0	9,9-17,2	16,4 ± 2,5	12-24
Proteingehalt im Samen (% <sub>OTG</sub> )	N <sub>0</sub>	18,1 ± 1,9	k.A.	14,8 ± 0,8	12,9-16,8
	N <sub>240</sub>	21,5 ± 1,2	k.A.	19,2 ± 0,9	17,8-21,3

Weiterhin konnte im Feldversuch erwartungsgemäß beobachtet werden, daß alle gemessenen Parameter des Stickstoff-Haushalts bei höherer N-Düngung anstiegen. Dabei nahm von N<sub>0</sub> zu N<sub>240</sub> die Variabilität zwischen den Sorten relativ zum Mittelwert in allen Parametern ab. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine weitgehende Stickstoffsättigung des Stoffwechsels zurückzuführen. Es ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den einzelnen N-Stoffwechsel-Kenngrößen feststellen. Zhou (2000) konnte solche Zusammenhänge im Feldversuch ebenfalls nicht nachweisen, fand aber wie hier eine tendenziell positive Korrelation zwischen Aminosäuregehalt im Blatt und Proteingehalt im Samen (Abb. 3.1).

Der einzige signifikante Zusammenhang ergab sich zwischen dem Samenproteingehalt bei N<sub>0</sub> und N<sub>240</sub>. Dieser Wert ist im Gegensatz zu den anderen eine kumulative Größe, die über die Vegetationsperiode langsam aufgebaut wird und kaum kurzzeitigen Fluktuationen unterliegt. Außerdem stellt die Proteineinlagerung in die Samen einen Endpunkt im Stickstoff-Metabolismus dar während die Nitrat- und Aminosäurepools im Blatt jeweils von verschiedenen konkurrierenden Prozessen (Aufnahme und Assimilation bzw. Synthese, Transport, Proteinbiosynthese und Proteinabbau) beeinflußt werden. Es ist deshalb nicht überraschend, daß sich nur für den Samen-Proteingehalt signifikante Zusammenhänge ergaben.

Die Einteilung der Rapsorten in die vier Kategorien ineffizient/nicht N-responsiv, effizient/nicht N-responsiv, ineffizient/N-responsiv und effizient/N-responsiv (Abb. 3.2) wurde auch von Kessel (2000) für den Samen-Proteingehalt der in den Anbaujahren 1996-



1999 getesteten Rapslinien durchgeführt. Alle Sorten fielen nur in die zwei Kategorien ineffizient/nicht N-responsiv und effizient/N-responsiv. Dies entspricht der in dieser Arbeit gefundenen positiven Korrelation von Samen-Protein bei  $N_0$  und bei  $N_{240}$ . Dagegen fanden Gerath & Balko (1995) drei Typen von Rapsorten: 1) Höchstertrag nur bei höchster Düngungsmenge, 2) Höchstertrag bei mittlerer Düngung, kein weiterer Anstieg bei höchster Düngungsmenge und 3) Höchstertrag bei mittlerer Düngung, Ertragsrückgang bei höchster Düngungsmenge. Allerdings muß beachtet werden, daß der Samen-Proteingehalt nicht dem Ertrag und auch nicht der N-Effizienz selbst entspricht. In verschiedenen Studien wurde gefunden, daß der N-Gehalt des Samens negativ mit dem C-Gehalt, der Samengröße und dem Samenertrag (in  $\text{kg ha}^{-1}$ ) zusammenhängt (McNeal *et al.* 1972, Clements 1973, Sattelmacher *et al.* 1994, Zhou 2000). Sorten mit hohem Samen-Proteingehalt könnten deshalb durchaus trotzdem in die Kategorie 3) nach Gerath & Balko (1995) fallen. Leider lagen Werte der AG Becker zum Samenertrag und der daraus resultierenden N-Effizienz (Gesamt-N-Gehalt der geernteten Samen geteilt durch die eingesetzte Stickstoffmenge) für die hier beschriebenen Feldversuche noch nicht vor. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Feldversuche, daß Winterraps eine hohe, genetisch bedingte Variabilität der N-Effizienz aufweist, die Möglichkeiten für züchterische und gentechnische Verbesserungen zuläßt.

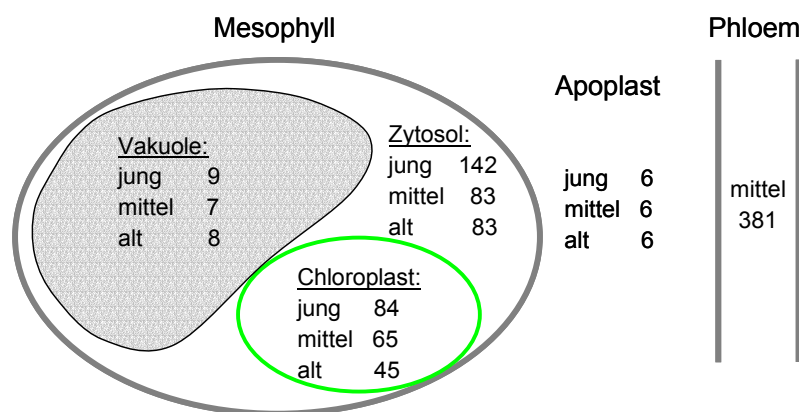
#### **4.2 Subzelluläre Konzentrationen und Phloembeladung von Aminosäuren in Raps**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Aminosäurekonzentrationen in subzellulären Kompartimenten bestimmt, die für die Phloembeladung von Bedeutung sind. Dazu wurden die Nichtwässrige Fraktionierung (Gerhardt & Heldt 1984) und die Apoplasten-Infiltrationstechnik (Lohaus *et al.* 2001) verwendet. Bei der Nichtwässrigen Fraktionierung wurden neben den Aminosäuren auch andere Metabolite bestimmt. Deren Verteilungsmuster stimmen gut mit der Literatur überein (Riens *et al.* 1991, Winter *et al.* 1993, 1994, Lohaus *et al.* 1995). So waren beispielsweise Malat und Nitrat vor allem in der Vakuole und Saccharose hauptsächlich im Zytosol verteilt. Die Übereinstimmung mit den von anderen Pflanzen bekannten Verhältnissen bestätigen die Zuverlässigkeit dieser Methode.

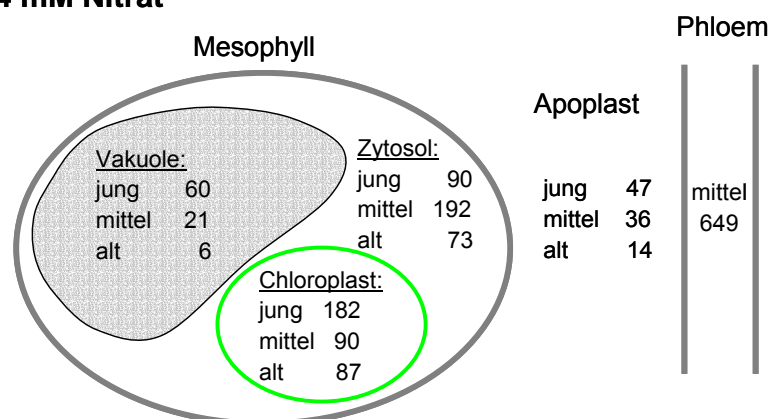
Die Aminosäurekonzentrationen in allen untersuchten Kompartimenten sind in Abb. 4.1 zusammengefaßt. Innerhalb der Mesophyllzellen waren die höchsten Konzentrationen im Zytosol und im Chloroplasten zu finden. Unter Berücksichtigung der z.T. sehr großen Standardabweichungen waren die Aminosäurekonzentrationen dieser zwei Kompartimente vergleichbar. Das für die Zuordnung der Metabolitenkonzentrationen in den nichtwässrigen Fraktionen verwendete Programm Bestfit (Riens *et al.* 1991) arbeitet numerisch in 1 %

Schritten. Das bedeutet, daß einem bestimmten Kompartiment nur 0 %, 1 %, 2 % usw. eines Metaboliten zugeordnet werden können. Die am Ende der Optimierung erhaltene Zuordnung weist dabei zwangsläufig eine gewisse Fehlerhaftigkeit auf, die in Prozentangaben gering ist. In den daraus errechneten Konzentrationswert geht aber das Volumen des Kompartiments mit ein. Die teilweise hohen Standardabweichungen für Zytosol ( $40 \mu\text{l g}_{\text{FG}}^{-1}$ ) und Chloroplast ( $70 \mu\text{l g}_{\text{FG}}^{-1}$ ) ergeben sich deshalb aus den im Vergleich zur Vakuole ( $600 \mu\text{l g}_{\text{FG}}^{-1}$ ) sehr kleinen Volumina dieser Kompartimente (Winter *et al.* 1993, 1994, Leidreiter *et al.* 1995). Ein Unterschied von 1 % in der Verteilung eines Metaboliten ergibt hier einen sehr hohen Unterschied in der daraus errechneten Konzentration. Insgesamt stimmt auch die Verteilung der Aminosäuren innerhalb der Zelle weitgehend mit bisherigen Untersuchungen überein (Riens *et al.* 1991, Lohaus *et al.* 1995).

### 0,5 mM Nitrat



### 4 mM Nitrat



**Abb. 4.1: Aminosäurekonzentrationen (mM) in subzellulären Kompartimenten des Rapsblattes.** Alle Daten für die Winterraps-Sorte Lirajet. Standardabweichungen wurden aus Platzgründen nicht mit eingezeichnet (siehe Ergebnisteil, Tab. 3.4 und 3.5). jung, mittel, alt: Blattaltersstufen. Phloemsaftdaten aus Zhou 2000 und Lohaus, unveröffentlicht (0,5 mM Nitrat:  $381 \pm 81$  mM; 4 mM Nitrat:  $649 \pm 146$  mM,  $n = 3-6$ ).

Die Mesophyllzellen bei 4 mM Nitrat angezogener Pflanzen zeigten im Vergleich mit bei 0,5 mM Nitrat angezogenen Pflanzen nur in den Vakuolen junger und mittelalter Blätter signifikant erhöhte Aminosäurekonzentrationen. Wenn sich das erhöhte N-Angebot im Aminosäurepool niederschlug, wurden diese Überschüsse demnach in der Vakuole gespeichert. Berücksichtigt man das wesentlich größere Volumen dieses Kompartiments, so enthielt die Vakuole in jungen Blättern der 4 mM Nitrat-Pflanzen ca. zweimal so viele Aminosäuren wie das Zytosol und die Chloroplasten zusammen. Von jungen zu alten Blättern hin nahm die Konzentration von Aminosäuren in allen Kompartimenten tendenziell ab (Abb. 3.3). Dies war am deutlichsten in der Vakuole der 4 mM Nitrat-Pflanzen feststellbar, bei denen die alten Blätter sich nicht mehr von denen der 0,5 mM Nitrat-Pflanzen unterschieden. Ein großer Teil des durch das hohe N-Angebot erzeugten Aminosäure-Überschusses war am Ende der Blattentwicklung also wieder verschwunden. Dennoch enthielten die Blätter noch ähnlich viele Aminosäuren wie die Source-Blätter anderer Kulturpflanzen (Riens *et al.* 1991, Lohaus *et al.* 1994, 1995, 1998).

Der Rückgang der Aminosäurekonzentrationen von den jungen zu den mittelalten Blättern ist wahrscheinlich hauptsächlich auf eine Volumenvergrößerung des Blattes im Verlauf des Blattwachstums zurückzuführen, die sich auf zellulärer Ebene vor allem in einer Vergrößerung der Vakuole niederschlägt (Buchanan *et al.* 2000). Von den mittelalten zu den alten Blättern spricht der Rückgang der Aminosäurekonzentrationen dagegen eher für einen Abtransport von organischem Stickstoff, da in seneszierenden Blättern die Proteolyse gegenüber der Proteinbiosynthese stark überwiegt (Buchanan-Wollaston 1997). Auch die Zunahme der relativen Anteile verschiedener seltenerer Aminosäuren (Arginin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, aber auch Valin) im Zytosol alter Blätter der 0,5 mM Nitrat-Pflanzen spricht für einen steigenden Anteil proteolytisch freigesetzter Aminosäuren am gesamten Pool. Dies wurde von Zhou (2000) auch für die Gesamt-Aminosäuren im Blatt festgestellt. Bei den 4 mM Nitrat-Pflanzen trat dieser Effekt nicht auf, wahrscheinlich war der Beitrag der Protein-Degradation zu dem durch den N-Überschuß sehr großen Aminosäurepool zu gering.

Die in Abb. 4.1 angegebenen Werte für die Konzentration von Aminosäuren im Phloemsaft von Raps (381 bzw. 649 mM) beruhen auf unveröffentlichten Untersuchungen an mittelalten Blättern der Winterraps-Sorte Lirajet von G. Lohaus. Für weitere Genotypen von *B. napus* (Sommerraps und Winterraps) und *B. carinata* (Senf) wurden von Lohaus & Möllers (2000) ebenfalls sehr hohe Aminosäurekonzentrationen bis zu 500 mM im Phloemsaft gefunden. Andere bisher mit der Aphidentechnik untersuchte Pflanzenarten hatten deutlich geringere

Phloemsaft-Konzentrationen (Mais: 40-150 mM, Lohaus *et al.* 1998; Spinat: 180 mM, Gerste: 200 mM, Lohaus *et al.* 1995). Dabei besteht eine positive Korrelation zwischen dem Aminosäuregehalt des Phloemsaftes und dem Proteingehalt im Samen (Lohaus & Möllers 2000). Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, daß Raps sehr effizient organischen Stickstoff aus den Source-Blättern verlagert. Um den Abtransport von Aminosäuren aus dem Blatt quantitativ abschätzen zu können, fehlen aber noch Daten zur Flußrate des Phloemstroms sowie vergleichende Analysen des Phloemsaftes auch bei jungen und alten Rapsblättern. Diese Untersuchungen werden dadurch erschwert, daß sich aus Raps mit der Laser-Aphiden-Technik schwieriger Phloemsaft gewinnen läßt als z.B. aus Mais.

Die Konzentration von Aminosäuren im Apoplasten stellt die tatsächliche Substratkonzentration für Aminosäuretransporter in der Plasmamembran der Phloem-Geleitzellen dar, die bei apoplastischen Beladern wahrscheinlich die Aufnahme von Aminosäuren ins Phloem katalysieren. Bei 0,5 mM Nitrat in der Nährlösung fanden sich 5-6 mM Aminosäuren im Apoplasten von Rapsblättern aller Altersstufen und bis zu 47 mM Aminosäuren bei 4 mM Nitrat in der Nährlösung (Tab. 3.6, Abb. 4.1). Diese Werte stimmen für die 0,5 mM Nitrat-Pflanzen gut mit Literaturangaben überein, sind aber für die 4 mM Nitrat-Pflanzen ungewöhnlich hoch. So wurden für *Vicia faba* apoplastische Aminosäurekonzentrationen von 1,5 mM (Asparagin) und 9 mM (Glutamin) gefunden (Delrot 1989), für Gerste und Spinat ca. 3 mM Gesamt-Aminosäuren (Lohaus *et al.* 1995) und für die Scrophulariaceen *Alonsoa meridionalis* und *Asarina barclaiana* 3,7 bzw. 11,8 mM Gesamt-Aminosäuren (Knop *et al.* 2001). Dies entsprach jeweils Konzentrationsgradienten zum Phloemsaft von 60fach (Lohaus *et al.* 1995) und 20-30fach (Knop 2001). Für Winterraps der Sorte Lirajet ergaben sich hier ein 64facher Gradient bei den 0,5 mM Nitrat-Pflanzen, und ein 18facher bei den 4 mM Nitrat-Pflanze. Die Beladung des Phloems erfolgt also auch für Aminosäuren gegen einen hohen Konzentrationsgradienten. In Hefezellen, die pflanzliche Aminosäuretransporter exprimierten, wurden bis zu 450fache Aminosäure-Anreicherungen gegenüber dem Medium beobachtet (Fischer *et al.* 1995, Frommer *et al.* 1995).

Die Aminosäurekonzentration im Apoplasten war in allen Blattaltern und N-Stufen deutlich geringer als im Zytosol der Mesophyllzellen. Dies würde einen passiven Ausstrom in den Zellwandraum erlauben, wie er für die apoplastische Phloembeladung teilweise angenommen wird (Laloi *et al.* 1993, Lalonde *et al.* 2003). Bei der Betrachtung der Aminosäure-Zusammensetzung in diesen beiden Kompartimenten ist auffällig, daß das Zytosol der Mesophyllzellen und der Apoplast z.T. deutlich voneinander abweichen. Beispielsweise ist bei den 4 mM Nitrat-Pflanzen im Zytosol stets Glutamat häufiger als Glutamin, während das

Verhältnis im Apoplasten umgekehrt ist. Apoplastische Flüssigkeit enthält häufig höhere Glutamin-Anteile als das Zytosol von Mesophyllzellen (Lohaus *et al.* 2001), wahrscheinlich durch eine Vermischung mit Xylemsaft, der ebenfalls hohe Anteile von Amidstickstoff aufweist (Lohaus, unveröffentlicht). Bei den 0,5 mM-Pflanzen nimmt der zytosolische Glutamin-Anteil mit dem Blattalter stark zu (Tab. 3.7). Es wurde verschiedentlich gezeigt, daß im Verlauf der Blattseneszenz Isoformen der Glutamin-Synthetase verstärkt exprimiert werden, die wahrscheinlich dazu dienen, beim Abbau stickstoffhaltiger Verbindungen freigesetztes  $\text{NH}_4^+$  durch Assimilation in phloemmobile Metaboliten zu überführen (Buchanan-Wollaston 1997 und Zitate darin, Gan & Amasino 1997). Der zytosolische Anstieg des Glutaminanteils spiegelt sich aber im Apoplasten nicht wieder. Bei den 4 mM Nitrat-Pflanzen war der Gesamt-Aminosäurepool wesentlich größer und wahrscheinlich deshalb der Beitrag der Glutamin-Synthetaseaktivität zur Aminosäure-Zusammensetzung in alten Blättern nicht so ausgeprägt. Da die Phloembeladung von Aminosäuren unspezifisch erfolgt (Riens *et al.* 1991, Winter *et al.* 1992) und die Aminosäure-Zusammensetzung im Zytosol der Mesophyllzellen und im Phloemsaft in einem engen Zusammenhang stehen, sollte man eigentlich annehmen, daß sich die starke Veränderung des Glutaminanteils auch im Apoplasten niederschlägt. Andererseits ist nicht anzunehmen, daß die Freisetzung von Aminosäuren in den Zellwandraum vollkommen passiv und unreguliert stattfindet, so daß ein entsprechender Anstieg der Glutaminkonzentration im Apoplasten möglicherweise erst mit einiger Verzögerung bemerkbar würde. Nach wie vor ist die Freisetzung der Metabolite in den Zellwandraum der am wenigsten untersuchte Teilprozeß der apoplastischen Phloembeladung. Eine eingehendere Untersuchung der Zusammenhänge zwischen zellulären, apoplastischen und Phloem-Konzentrationen von transportierten Metaboliten ist zum Verständnis unbedingt notwendig.

### **4.3 Charakterisierung von Aminosäuretransportern aus Raps**

Für die apoplastische Beladung des Phloems mit Saccharose konnte an verschiedenen Spezies durch Antisense-Repression bzw. Knockout-Mutanten von  $\text{H}^+$ -Saccharose-Symportern direkt bewiesen werden, daß diese Transporter für die Beladung notwendig sind (Riesmeier *et al.* 1994, Kühn *et al.* 1996, Lemoine *et al.* 1996, Bürkle *et al.* 1998, Gottwald *et al.* 2000). Ein entsprechender Beweis auch für Aminosäuretransporter steht bisher noch aus. Dennoch besteht auch für Aminosäuren, die im Phloemsaft keine so starke Anreicherung gegenüber dem Zytosol der Mesophyllzellen wie Saccharose erfahren (Lohaus *et al.* 1995) ein großer Konzentrationsgradient vom Apoplasten ins Phloem. Die genaue Charakterisierung von

Aminosäuretransportern v.a. hinsichtlich ihrer Substratspezifität und -affinität sowie ihrer Lokalisation auf zellulärer Ebene ist deshalb für das Verständnis des Stickstofftransports innerhalb der Pflanze unerlässlich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb Aminosäuretransporter aus Raps identifiziert und charakterisiert werden. Aufgrund ihrer breiten Substratspezifität sind die Transporter der AAP-Familie die wahrscheinlichsten Kandidaten für die unspezifische Beladung des Phloems mit Aminosäuren und wurden für diese Untersuchung ausgewählt. Es gelang, zwei vollständige *BnAAP*-cDNA-Sequenzen von zu erhalten, die eine hohe Homologie zu entsprechenden Genen in Arabidopsis aufweisen. Die Funktionalität beider, nach den homologen Arabidopsis-Proteinen als BnAAP1 und BnAAP6 bezeichneter Transporter konnte durch Expression in *Xenopus laevis* Oozyten nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Raps-AAPs eine sehr ähnliche Substratspezifität wie die verwandten Arabidopsis-Transporter. Wie alle bisher bekannten AAPs (Fischer *et al.* 2002) transportieren sie alle proteinogenen Aminosäuren (Abb. 3.8). Und wie bei AtAAP1 bzw. AtAAP6 weisen sie eine deutlich geringere Affinität zu basischen als zu neutralen und sauren Aminosäuren auf. BnAAP6 zeigt eine deutlich höhere Affinität zu Aspartat als BnAAP1. Unter den Arabidopsis-Transportern ist ebenfalls AtAAP6 derjenige mit der höchsten Affinität für diese Aminosäure (Fischer *et al.* 2002, Okumoto *et al.* 2002). Boorer & Fischer (1997) konnten zeigen, daß alle Aminosäuren mit Ausnahme von Arginin und Lysin als neutrale Zwitterionen zusammen mit einem Proton transportiert werden. Arginin und Lysin werden als einwertige Kationen ebenfalls zusammen mit einem Proton transportiert. Der Ladungsfluß über die Oozytenmembran bei der Aufnahme von Aminosäuren besteht deshalb aus einem H<sup>+</sup>-Einstrom und einem kompensatorischen Na<sup>+</sup>-Ausstrom (Towle *et al.* 1991) und ist der transportierten Aminosäuremenge bei der hier verwendeten Ein-Elektroden-Methode nicht direkt proportional (Abb. 3.7). Ein direkter Vergleich von BnAAP1 und BnAAP6, der zeigen könnte, ob auch BnAAP6 ein hochaffiner Transporter ist, war deshalb nicht möglich.

Ein Unterschied zeigte sich zwischen BnAAP1 und AtAAP1: Der Raps-Transporter zeigte bei Tryptophan-Konzentrationen von 0,1 mM, 0,5 mM und 5 mM eine ähnliche Affinität wie für Alanin, wogegen AtAAP1 diese Aminosäure nur äußerst ineffizient transportiert (Fischer *et al.* 2002). Allerdings wird in derselben Veröffentlichung für AtAAP1 der K<sub>0,5</sub>-Wert für Tryptophan mit 0,6 mM ebenso niedrig angegeben wie für Alanin. Die ansonsten weitgehende Übereinstimmung der Substratspezifitäten zwischen den Raps- und Arabidopsis-Transportern konnte trotz der nahen Verwandtschaft beider Arten nicht ohne weiteres erwartet werden. In Arabidopsis sind z.B. die Gene *AtAAP1* und *AtAAP8* durch Verdoppelung eines

Chromosomenabschnitts entstanden und weisen untereinander eine höhere Homologie auf als zu den anderen *AtAAP*-Genen (Okumoto *et al.* 2002). Dennoch transportiert AtAAP8 Aspartat mit hoher Affinität und AtAAP1 nicht.

BnAAP1 und BnAAP6 transportierten alle getesteten Aminosäuren auch bei 0,1 mM Substratkonzentration. Wie die Analyse des Apoplastensaftes gezeigt hat, befindet sich diese Konzentration in einem Bereich, der auch *in vivo* für die selteneren Aminosäuren anzunehmen ist. Aus den gemessenen Membranpotentialänderungen lassen sich keine Michaelis-Konstanten für die Transporter ableiten, dazu wäre eine 2-Elektroden „Voltage Clamp“-Messung, die durch konstant halten des Membranpotentials die Messung von Stromflüssen über die Oozytenmembran erlaubt (Miller & Zhou 2000), oder die Expression der Transporter in Hefe (Frommer & Ninnemann 1995) notwendig. Die in der Literatur angegebenen  $K_M$ - (bzw.  $K_{0,5}$ -) Werte von Aminosäurepermeasen aus Arabidopsis liegen zumeist in der Größenordnung von 0,5-1 mM. Einzelne Aminosäuren werden mit wesentlich geringerer Affinität transportiert, z.B. liegt der  $K_{0,5}$ -Wert von AtAAP1, 2, 4 und 6 für Arginin bei über 50 mM. Andererseits haben manche Transporter für einzelne Substrate auch deutlich höhere Affinitäten. Der  $K_{0,5}$  von AtAAP2 für Tryptophan liegt bei nur 60  $\mu$ M und der hochaffine Transporter AtAAP6 hat allgemein (mit Ausnahme der basischen Aminosäuren)  $K_{0,5}$ -Werte zwischen 40  $\mu$ M und 1,6 mM (Fischer *et al.* 2002).

Die Bestimmung der Substrataffinität in heterologen Expressionssystemen stellt aber wahrscheinlich eher eine Unterschätzung der tatsächlichen Affinität in der Pflanze dar. Bei elektrogeneren Transportern, die die Translokation ihres Substrats gegen einen Konzentrationsgradienten durch das Membranpotential energetisieren (das in diesem Fall durch einen Protonengradienten erzeugt wird), ist auch die Substrataffinität potentialabhängig (Boorer *et al.* 1996). Bei der Bestimmung des  $K_{0,5}$ -Wertes eines Transporters in einem „Voltage Clamp“ Experiment mit *Xenopus* Oozyten wird das Membranpotential der Zelle in der Regel bei -30 bis -40 mV festgehalten (Miller & Zhou 2000). In der Pflanze trifft der Transporter dagegen Potentiale von bis zu -200 mV an (Meharg & Blatt 1995), die in *Xenopus* Oozyten nicht eingestellt werden können, weil bei -150 mV ein endogener  $Cl^-$ -Kanal geöffnet wird, dessen Aktivität die Effekte heterolog exprimierter Transporter überdeckt (Parker & Miledi 1988, Kowdley *et al.* 1994, Miller & Zhou 2000). Bei kinetischen Experimenten mit transgenen Hefezellen, die einen fremden Transporter exprimieren, wird das Membranpotential normalerweise überhaupt nicht kontrolliert.

Insgesamt deuten die aus der Literatur bekannten  $K_M$ -Werte der AAP-Transporter, die im Apoplasten gemessenen Aminosäurekonzentrationen und die Aktivität von BnAAP1 und 6

bei 0,1 mM Substratkonzentration darauf hin, daß die AAPs sehr wohl in der Lage sind, auch die selteneren Aminosäuren *in vivo* zu transportieren. Dies widerspricht ursprünglichen Vermutungen, diese Proteine würden in der Pflanze nur als Transporter für häufige Aminosäuren wie Glutamat und Glutamin fungieren, so daß weitere spezifische Transporter für die seltenen Aminosäuren notwendig wären (Fischer *et al.* 1998). Um den Transport aller proteinogenen Aminosäuren abzudecken scheinen so zusätzlich nur Transporter für die basischen Aminosäuren notwendig zu sein, die in Form der „Cationic Amino Acid Transporters“ (CATs, Frommer *et al.* 1995) und „Lysine and Histidine Transporters“ (LHTs, Chen & Bush 1997) bereits identifiziert wurden. Welche Bedeutung die „Aromatic and Neutral Amino Acid Transporters“ (ANTs, Chen *et al.* 2001) für die Phloembeladung mit aromatischen Aminosäuren haben, ist noch unklar.

#### 4.4 Expression von *BnAAP1* und *BnAAP6* in der Pflanze

Für das Verständnis der Funktion von Aminosäuretransportern wie *BnAAP1* und *BnAAP6* ist die genaue Kenntnis ihrer Lokalisation in der Pflanze und deren zeitlicher Veränderung während des Entwicklungszyklus notwendig. Die Modellpflanze *Arabidopsis* ist in dieser Hinsicht bereits relativ gut untersucht. Da *Arabidopsis* und Raps zwar zur gleichen Familie gehören, sich aber physiologisch stark unterscheiden, wurde die organspezifische Expression von *BnAAP1* und *BnAAP6* in einer parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Diplomarbeit (Kassner 2003) anhand von Northern Blots und RT-PCR mit der von *AtAAP1* und *AtAAP6* verglichen. RT-PCRs mit nicht-limitierender Zyklenzahl zeigten, daß geringfügige Mengen von Transkripten beider Gene überall in der Pflanze vorhanden sind. Bei limitierender Zyklenzahl und in Northern Blots war aber nachweisbar, daß die Expression organspezifisch sehr unterschiedlich war. *BnAAP1* Transkripte traten v.a. in der Blüte auf, schwächere Hybridisierungssignale ergaben sich auch mit RNA aus dem Stengel. *BnAAP6* mRNA war vor allem in Wurzeln nachweisbar, sowie ebenfalls in der Blüte (Tab. 4.2).

Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit *Arabidopsis* überein (Expression von *AtAAP6* in Wurzeln), weisen aber auch Unterschiede auf. Die Detektion von beiden mRNAs im Northern Blot war äußerst schwierig aufgrund der wahrscheinlich sehr schwachen Expression der Transporter und dem hohen Polysaccharidgehalt des Rapsgewebes, der die Isolation sauberer RNA beeinträchtigt. Unter Berücksichtigung der basalen Transkription in allen Organen reflektieren die Hybridisierungssignale von *BnAAP1* im Stengel und von beiden Genen in der Blüte deshalb möglicherweise eher die Qualität der eingesetzten RNA als die Organspezifität der Expression. Unter diesem Gesichtspunkt muß auch beachtet werden, daß *BnAAP1* zuerst



aus RNA junger Blätter isoliert wurde, die im Northern Blot kein Hybridisierungssignal zeigten. *AtAAP1* ist in Arabidopsis-Schoten nur in den Samen zum Zeitpunkt des herzförmigen Embryostadiums in Northern Blots detektierbar (Hirner *et al.* 1998). Die Expression von *AtAAP6* im Blatt ist auf Sink-Blätter beschränkt und in reifen Blättern stark reduziert (Rentsch *et al.* 1996). Das Fehlen von Hybridisierungssignalen für *BnAAP1* in Schoten bzw. für *BnAAP6* in Blättern kann deshalb darauf zurückzuführen sein, daß die Proben für die RNA-Isolation nicht zum Zeitpunkt der stärksten Expression genommen wurden.

**Tab. 4.2: Organspezifische Expression von *BnAAP1* und *BnAAP6* im Vergleich mit homologen Genen aus Arabidopsis.** Nach Kassner 2003 (Raps) und Fischer *et al.* 1998 (Arabidopsis). ++: starke Expression, +: Expression, --: Expression im Northern Blot nicht nachweisbar. \*Die Expression von *AtAAP1* ist auf das Endosperm des Samens beschränkt. \*\**AtAAP6* wird nur in Sink-Blättern exprimiert.

	Wurzel	Stengel	Blatt	Blüte	Schote
<i>BnAAP1</i>	--	+	--	++	--
<i>AtAAP1</i>	--	--	--	--	++*
<i>BnAAP6</i>	+	--	--	++	--
<i>AtAAP6</i>	++	--	+**	--	--

Aufgrund ihrer engen Verwandtschaft sind einerseits Übereinstimmungen in der organspezifischen und entwicklungsabhängigen Expression von homologen Genen in Raps und Arabidopsis zu erwarten. So ist z.B. die Expression der seneszenzspezifischen Protease SAG12 zwischen beiden Spezies konserviert (Noh & Amasino 1999b). Andererseits weisen beide Pflanzen völlig verschiedene Wuchsformen und dementsprechend abweichende Sink-Source-Verhältnisse auf. Raps ist außerdem durch sein gegenüber Arabidopsis versechsfachtes Genom (Lagercrantz 1998, Lukens *et al.* 2003) ein genetisch wesentlich komplexerer Organismus. Die mit der Polyploidisierung verbundene Redundanz verringert den Selektionsdruck auf einzelne Allele (Paterson *et al.* 2001, Osborn *et al.* 2003) und es ist durchaus möglich, daß sich Subtypen der hier untersuchten Transporter mit unterschiedlichen Expressionsmustern herausgebildet haben, die mit den verwendeten Methoden nicht unterscheidbar sind.

Northern Blots und RT-PCR sind über ganze Organe integrierende Methoden, die keine Schlüsse auf die Gewebespezifität der Expression zulassen. Insbesondere bei potentiell Leitbündel-spezifisch exprimierten Genen kann die Intensität des Hybridisierungssignals eher die Dichte von Leitbündelsträngen im Organ reflektieren als das zelluläre Expressionsniveau.

Für eine genaue Funktionszuweisung ist bei wahrscheinlich an der Phloembeladung beteiligten Transportproteinen außerdem eine Unterscheidung zwischen Xylem- und Phloemexpression notwendig. Wünschenswert wäre eine zellspezifische Lokalisation, da z.B. für die Saccharosetransporter PmSUC2 und PmSUC3 aus *Plantago major* nachgewiesen wurde, daß SUC2 ausschließlich in den Geleitzellen und SUC3 ausschließlich in den Siebelementen vorkommt (Stadler *et al.* 1995, Barth *et al.* 2003). Bei Solanaceen sind dagegen alle bekannten Saccharosetransporter ausschließlich in den Siebröhren zu finden (Kühn *et al.* 1997, Barker *et al.* 2000, Weise *et al.* 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb begonnen, das Expressionsmuster von BnAAP6 durch eine Promotor-Reporterfusion und durch Immunolokalisation genauer zu charakterisieren.

Transgene Pflanzen, die das  $\beta$ -Glucuronidase-Reportergen unter der Kontrolle des *BnAAP6*-Promotors exprimierten, wurden nur aus der Transformation von *A. thaliana* und nicht von *B. napus* erhalten. GUS-Aktivität fand sich in den Leitbündeln von Source-Blättern und Kelchblättern der Blüte, aber nicht im Stengel oder den Schoten (Abb. 3.10). Teilweise wiesen Blüten auch an der Narbe eine Färbung auf, diese war aber nicht konsistent bei allen untersuchten Pflanzen vorhanden und ist wahrscheinlich auf in bestimmten Entwicklungsstadien vorhandene endogene GUS-Aktivität zurückzuführen (Hu *et al.* 1990). Da die Pflanzen in Erde angezogen wurden, war eine Färbung der Wurzeln nicht praktikabel. Genauere Färbungsexperimente mit vollständigen, auf Agarplatten und unter verschiedenen N-Versorgungsstufen gewachsenen Pflanzen der T3-Generation stehen noch aus. Die GUS-Färbung in den Kelchblättern bestätigt das Hybridisierungssignal mit Blüten-RNA in Northern Blots. Bei Arabidopsis ist die Expression von AAPs in den vegetativen Pflanzenteilen ebenfalls auf die Leitbündel beschränkt, allerdings fand sich z.B. *AtAAP2*-Expression im Phloem und *AtAAP6*-Expression im Xylem-Parenchym (Hirner *et al.* 1998, Okumoto *et al.* 2002). Es ist deshalb noch notwendig, die genaue Lokalisation der *BnAAP6*-Promotoraktivität durch mikroskopische Untersuchung GUS-gefärbter Pflanzen festzustellen. Die Promotoraktivität in Source-Blättern scheint sowohl dem Fehlen eines Hybridisierungssignals in Northern Blots zu widersprechen als auch einer Sink-Blatt spezifischen Expression, wie sie für *AtAAP6* gezeigt wurde (Rentsch *et al.* 1996). Andererseits ist aber die GUS-Färbung gerade wegen ihrer hohen Sensitivität nicht geeignet, anhand der Färbungsintensität zwischen Sink-Blatt- und Source-Blatt-spezifischer Expression zu unterscheiden. Eine basale Transkriptionsaktivität war überall in der Pflanze und auch in allen Blattaltersstufen (4.5.) vorhanden. Sofern diese Expression auf die Leitbündel beschränkt war, war sie dort wahrscheinlich deutlich höher als in Northern Blots erkennbar.

Auch bei relativ schwacher Promotoraktivität in Source-Blättern könnte die lokal stark begrenzte Akkumulation des farbigen Reaktionsprodukts deshalb zu einer intensiven Färbung der Leitbündel führen.

Die Immunolokalisation von BnAAP6 gelang mit den hergestellten Antiseren nicht, obwohl heterolog in *E. coli* bzw. *Xenopus* Oozyten exprimiertes BnAAP6-Protein detektierbar war, sowie in Blattextrakten ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 43 kDa, bei dem es sich wahrscheinlich um BnAAP6 handelte. Bisher ist für keinen pflanzlichen Aminosäuretransporter eine Immunolokalisation gelungen, möglicherweise aufgrund des niedrigen Expressionsniveaus oder ungünstiger Epitopeigenschaften der Proteine. Eine erfolgreiche Immunolokalisation wurde für den nah verwandten putativen Auxin-Transporter AUX1 durchgeführt (Swarup *et al.* 2001). In diesem Fall wurde nicht das AUX1 Protein direkt detektiert, sondern ein translational daran gekoppeltes Hämagglutinin-Epitop. Eine solche Vorgehensweise scheint auch für die AAPs erfolgversprechend, ist aber aufwendig, da die Translationsfusion unter Kontrolle des *BnAAP6*-Promotors in die Pflanze transformiert werden muß. Alternativ wäre eine Fluoreszenz-Lokalisation mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) unter Kontrolle des *BnAAP6*-Promotors denkbar. Die direkte Verwendung einer Promotor-GFP Fusion ist allerdings nicht möglich, da GFP zwischen Geleitzellen und Siebelementen transportiert wird und auch im Phloem mobil ist (Imlau *et al.* 1999). Stattdessen müßte entweder eine translationale *BnAAP6-GFP* Fusion hergestellt, oder ein durch ein Signalpeptid am Endoplasmatischen Reticulum verankertes GFP-Protein (Wright *et al.* 2003) verwendet werden.

#### **4.5 Expression von *BnAAP1* und *BnAAP6* während der Blattentwicklung**

Unter dem Gesichtspunkt der N-Effizienz von Raps war ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit die Remobilisation von Aminosäuren aus seneszierenden Blättern. Es sollte daher untersucht werden, ob sich die Expression der identifizierten Aminosäuretransporter im Verlauf der Blattentwicklung veränderte. Aufgrund der Probleme, in Northern Blot-Analysen deutliche und vergleichbare Signale zu erhalten und wegen der für diese Fragestellung zu großen Sensitivität der GUS-Färbungsmethode wurde eine Quantifizierung der Transkriptmengen durch Ubiquitin-standardisierte RT-PCR vorgenommen. Dabei zeigte sich eine leichte Abnahme der Menge an *BnAAP6*-mRNA mit dem Blattalter (Abb. 3.15). Dies könnte mit dem für *AtAAP6* gezeigten Expressionsrückgang beim Sink-Source-Übergang des Blattes übereinstimmen (Rentsch *et al.* 1996). Eine genauere Analyse der jungen Blätter bezüglich ihres N-Sink- oder N-Source-Status wäre aber für einen direkten Vergleich

notwendig. Zusätzlich könnte an Keimlingen der *BnAAP6*-Promotor-GUS-Pflanzen untersucht werden, ob die GUS-Färbung auch in Keimblättern auftritt (die immer als N-Source fungieren), bzw. ob sie während der Blattentwicklung zunächst nur in den Haupt-Blattadern auftritt, bevor die blinden Enden der kleinsten Phloemgefäße fertig entwickelt sind und ihre mit dem Übergang zum Source-Blatt verbundene Funktion in der Phloembelastung aufnehmen (Wright *et al.* 2003).

Die Menge an *BnAAP1*-mRNA nahm dagegen nicht mit dem Blattalter ab, sondern eher etwas zu (Abb. 3.14). In der Literatur findet sich bislang kein Nachweis einer verstärkten Expression von Aminosäuretransportern in seneszierenden Blättern. Sakr *et al.* (1993, 1997) stellten erhöhte Aufnahmeraten an Blattscheiben und Plasmamembran-Vesikeln aus seneszierenden Blättern von *Beta vulgaris* fest. Sie konnten aber mit einer heterologen *AtAAP1*-Sonde keine vermehrte Expression endogener Transporter detektieren. Die meisten Studien zu Membrantransport-Proteinen unterscheiden nur zwischen Sink- und Source-Blättern und auch in Transkriptom- und Proteom-Analysen seneszierender Blätter werden keine Aminosäuretransporter erwähnt (Buchanan-Wollaston 1997, Quirino *et al.* 1999, Yoshida *et al.* 2001, Bhalerao *et al.* 2003). Dagegen ist aus verschiedenen Untersuchungen bekannt, daß Glutamin-Synthetasen während der Blattseneszenz verstärkt exprimiert werden, wahrscheinlich um Ammonium, das beim Abbau biologischer Makromoleküle freigesetzt wird, für den Abtransport in organischer Form zu binden (Buchanan-Wollaston 1997 und Zitate darin, Gan & Amasino 1997). Insbesondere unter dem Gesichtspunkt, daß die Mehrzahl aller Gene während der Blattseneszenz herunterreguliert wird (Gan & Amasino 1997), ist das zumindest konstante Expressionsniveau von *BnAAP1* bedeutsam. Weitere Untersuchungen müssen dieses Ergebnis mit der Expression seneszenzspezifischer Markergene wie z.B. *BnSAG12* (Noh & Amasino 1999b) korrelieren. Obwohl möglicherweise nicht die im Blatt hauptsächlich exprimierten AAP-Gene identifiziert wurden, zeigen die Ergebnisse insgesamt, daß Raps auch in seneszierenden Blättern noch Aminosäuretransporter exprimiert.

#### **4.6 Möglichkeiten zur gentechnischen Verbesserung der Stickstoffeffizienz von Raps**

Der übergeordnete Gesichtspunkt, unter dem in dieser Arbeit der Abtransport von Aminostickstoff aus Rapsblättern untersucht wurde, war die Frage nach Möglichkeiten einer gentechnischen Verbesserung der Stickstoffeffizienz. Nach Duncan & Baligar (1990) wird die N-Effizienz einer Pflanze im wesentlichen von drei Faktoren beeinflusst: 1) Der Aktivität der Enzyme des primären Stickstoffmetabolismus, 2) der Mobilisation und Translokation stickstoffhaltiger Verbindungen und 3) der Speicherung N-haltiger Verbindungen. Diese drei

Aspekte lassen sich in etwa gleichsetzen mit 1) der Stickstoffassimilation, 2) dem Stickstofftransport und 3) der Sink-Stärke stickstoffspeichernder Organe. Entsprechend sind dies potentielle Ansatzpunkte für gentechnische Veränderungen, die im Folgenden diskutiert werden.

Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, daß bei Raps die Stickstoffassimilation nicht limitierend für die N-Effizienz ist: Raps nimmt Stickstoff effizienter auf als viele andere Kulturpflanzen (Lainé *et al.* 1993, Dejoux *et al.* 2000) und ist überdies in der Lage, die N-Aufnahmekapazität der Wurzeln schnell an einen erhöhten Stickstoff-Bedarf des Sposes anzupassen (Lainé *et al.* 1995). Durch seine Effizienz in der Stickstoffaufnahme eignet er sich sogar als „catch crop“, d.h. um mineralischen Stickstoff im Bodenprofil aufwärts zu transportieren. Im Rahmen dieses DFG-Projektes wurden transgene Rapspflanzen hergestellt, die die plastidäre oder zytosolische Glutaminsynthetase oder eine bakterielle Asparaginsynthetase überexprimierten, sowie Linien, in denen die plastidäre Glutaminsynthetase durch ein Antisense-Konstrukt ausgeschaltet war (Wallbraun 1997). Keine dieser Modifikationen führte zu signifikanten Veränderungen im Metabolitgehalt der Blätter, im Proteingehalt der Samen oder im N-Ernte-Index (Seiffert 2000, Zhou 2000). Dagegen berichteten Lam *et al.* (2003) von erhöhten Proteingehalten in Samen von Arabidopsis-Pflanzen, die konstitutiv die Asparaginsynthetase ASN1 überexprimierten. Bei Arabidopsis sind die Samen im Gegensatz zu Raps sehr proteinarm, so daß sich ein solcher Effekt zwangsläufig deutlicher ausprägt.

Winterraps unterscheidet sich von den meisten anderen Kulturpflanzen darin, daß die Pflanze ihre Blätter bereits während der Blüte nahezu vollständig abwirft. Reifende Samen erhalten einen großen Teil ihres Stickstoffs aus der Proteolyse und Aminosäure-Remobilisation seneszierender Blätter (Crawford *et al.* 1982, Thorne 1985, Feller & Keist 1986, Frommer *et al.* 1994b). Bei Raps gehen jedoch mit dem Blattabwurf große Mengen an N verloren, die als Vorernteverluste bezeichnet werden. Diese N-Verluste treten sogar bei extensiver Düngung auf (Lickfett *et al.* 1994). Sie können Größenordnungen von 16 kg N ha<sup>-1</sup> (Aniol 1994) bis 25 kg N ha<sup>-1</sup> (Schjoerring 1995) haben und 15 % des gesamten Stickstoffs in der Pflanze ausmachen (Rossato *et al.* 2001). Dies führte zu der Annahme, daß bei Raps der Abtransport von Aminosäuren aus seneszierenden Blättern limitierend für die Stickstoff-Remobilisation sein könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch seneszierende Rapsblätter noch Aminosäuretransporter mit breiter Substratspezifität besitzen und einen davon möglicherweise sogar verstärkt exprimieren. Die Analyse der Aminosäurekonzentrationen in

subzellulären Kompartimenten der Blätter ergab, daß Aminosäureüberschüsse in jungen Blättern stark gedüngter Pflanzen zunächst in der Vakuole gespeichert werden. Diese Aminosäuren werden zu einem großen Teil wieder mobilisiert, so daß sich die intrazellulären Aminosäurekonzentrationen alter Blätter von bei 0,5 mM und bei 4 mM Nitrat gewachsenen Pflanzen nicht wesentlich unterscheiden. Dennoch haben seneszierende Rapsblätter immer noch vergleichbare Aminosäuregehalte wie Source-Blätter anderer Nutzpflanzen. Zusammen mit den Daten von Lohaus & Möllers (2000) sowie Lohaus (unpubliziert) zum Aminosäuregehalt des Phloemsaftes zeigte sich, daß Raps Aminosäuren im Phloem stärker gegenüber dem Zytosol der Mesophyllzellen anreichert als andere Kulturpflanzen und insgesamt sehr viel Aminostickstoff transportiert. Der Aminosäuregehalt des Phloemsaftes korreliert positiv mit dem Proteingehalt der Samen (Lohaus & Möllers 2000). Alle diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, daß die ungenügende Remobilisation von Stickstoff aus den seneszierenden Blättern nicht auf einen ineffizienten Transport zurückzuführen ist.

Es stellt sich außerdem die Frage, inwieweit der Stickstofftransport direkt gentechnisch beeinflussbar ist. Angesichts der Vielzahl von Aminosäuretransportern in *Arabidopsis* ist durchaus denkbar, daß die Pflanze in der Lage ist, die Überexpression oder Ausschaltung einzelner Gene durch eine Gegenregulation von Transportern mit überlappender Substratspezifität auszugleichen. Dabei könnte z.B. die mögliche Funktion von Glutamat als pflanzliches Signalmolekül eine Rolle spielen (Lam *et al.* 1998, Kang & Turano 2003). Der polyploide Raps hat in dieser Hinsicht wahrscheinlich noch flexiblere Anpassungsmöglichkeiten als *Arabidopsis*. Hinzu kommt, daß gerade bei der Beladung des Samens teilweise signifikante Mengen organischen Stickstoffs auch in Form von kurzen Peptiden transportiert werden (Stacey *et al.* 2002, Miranda *et al.* 2003), so daß möglicherweise auch der Peptidtransport gentechnisch modifiziert werden müßte. Dennoch gibt es einige Ergebnisse die darauf hindeuten, daß der Stickstofftransport beeinflussbar ist. Die Antisense-Inhibierung von *StAAP1* in Kartoffeln führte zu einem verringerten Gehalt freier Aminosäuren in den Knollen, obwohl das Gen blattspezifisch exprimiert ist (Koch *et al.* 2003). *Arabidopsis AtAAP6*- und *AtANTI*-Knockout-Mutanten zeigten eine veränderte Zusammensetzung der Aminosäuren im Phloemsaft und im Fall von *AtAAP6* auch eine verringerte Konzentration (Hunt *et al.* 2003 und Hunt, mündliche Mitteilung). Diese Effekte könnten dadurch erklärbar sein, daß die große Anzahl von pflanzlichen Aminosäuretransportern kein Anzeichen von Redundanz ist, sondern jeder Transporter aufgrund seines zeitlich und räumlich genau regulierten Vorkommens spezifische Aufgaben in der Pflanze erfüllt (Fischer *et al.* 2002, Okumoto *et al.* 2002).

Um die Stickstoffeffizienz zu verbessern, wäre aber wahrscheinlich die Überexpression und nicht die Ausschaltung bestimmter Transporter erforderlich. Während man bei einer Antisense-Repression oder Knockout-Mutanten durch die globale Ausschaltung des Gens automatisch auch seine lokale Funktion unterbindet, ist für sinnvolle Überexpressions-Experimente zunächst eine genaue, am besten zelluläre Lokalisation der Genexpression notwendig. Solche Informationen sind aber selbst bei der Modellpflanze Arabidopsis bisher nur für wenige Transporter verfügbar. Als geeignetste Kandidaten erscheinen dabei Transporter, die an Transport-„Engpässen“ aktiv sind. Da die Gewebe des Embryos und der Mutterpflanze keine symplastische Verbindung haben, sind an der Samenbeladung beteiligte Transporter (Kwart *et al.* 1993, Hirner *et al.* 1998, Tegeder *et al.* 2000, Miranda *et al.* 2001, Okumoto *et al.* 2002) für gentechnische Veränderungen eventuell geeigneter als solche, die im Blatt exprimiert werden. Die Überexpression von VfAAP1 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors in *Vicia faba* führte allerdings nur zu geringen Effekten auf den Proteingehalt der Samen (Rolletschek *et al.* 2003 und H. Weber, mündliche Mitteilung).

Eine Erhöhung der Sink-Stärke für Stickstoff in der Pflanze wird ebenfalls als Ansatz zur Verbesserung der N-Remobilisation diskutiert. Potentiell beeinflussbar wäre sowohl die Expression transienter vegetativer Speicherproteine (Volenc *et al.* 1996) als auch die N-Akkumulation im Samen selber. Es hat sich allerdings herausgestellt, daß die Sinkstärke ein äußerst komplexes Phänomen ist, das sich den meisten Versuchen widersetzt, durch Veränderung der Expression einzelner „Schlüsselenzyme“ oder regulatorischer Gene generelle Veränderungen zu erreichen (Herbers & Sonnewald 1998). Der direkteste denkbare Weg wäre die samenspezifische Überexpression der Samen-Speicherproteine Napin und Cruciferin (Crouch & Sussex 1981). Es finden sich aber keine Publikationen über die Effekte solcher Experimente, vermutlich weil damit bisher keine Erfolge erzielt wurden. Dagegen berichteten Kohno-Murase *et al.* (1994), daß die Antisense-Inhibierung eines Napin-Gens nicht den Gesamtproteingehalt transgener Rapssamen beeinflusste.

Verschiedene Studien deuten darauf hin, daß Kohlenhydrate einen stärkeren Einfluß auf die Akkumulation von Speicherproteinen haben als stickstoffhaltige Verbindungen selber, wobei wahrscheinlich die regulatorische Wirkung von Zuckern (Wobus & Weber 1999, Coruzzi & Zhou 2001) eine große Rolle spielt. So wird z.B. der Patatin I-Promotor aus Kartoffelpflanzen von Zuckern induziert (Martin *et al.* 1997). Von Prolin abgesehen, das als Osmoregulator Stress signalisiert, wirkten dagegen Aminosäuren nur bei niedrigen Zuckerkonzentrationen induzierend (Hellman *et al.* 2000). Antisense-Repression der ADP-Glukose-Pyrophosphorylase in den Samen von *Vicia narbonensis* führte zu einer Erhöhung des

Protein- und Gesamtstickstoffgehaltes ohne daß der Kohlenstoffgehalt der Samen sich veränderte. Der Effekt war wahrscheinlich auf eine verzögerte Zelldifferenzierung und eine dadurch verlängerte Samen-Beladungsperiode zurückzuführen (Weber *et al.* 2000). In vielen Pflanzen sind Kohlenhydrat- und Proteingehalt der Samen negativ miteinander korreliert (Perez *et al.* 1993, Boutin *et al.* 1998, Lohaus & Möllers 2000). Dieser Zusammenhang ist auch aus der Rapszüchtung seit langem bekannt (Grami *et al.* 1977), wo ein Hauptziel der Züchtung darin liegt, sowohl den Öl- als auch den Proteingehalt der Samen zu maximieren. Letzten Endes ist durch eine Erhöhung des Speicherproteingehaltes von Rapssamen noch keine Verbesserung der N-Effizienz erreicht. Möglicherweise infolge des inversen Zusammenhangs zwischen Kohlenstoff- und Stickstoff-Akkumulation führt eine Erhöhung des Proteingehaltes der Samen meistens zu einer Verringerung der Samenmenge und damit des N-Ertrags (McNeal *et al.* 1972, Clements 1973, Sattelmacher *et al.* 1994, Kessel 2000). Möglicherweise ist eine Verzögerung der Blattseneszenz der am ehesten erfolgversprechende Weg für eine gentechnische Verbesserung der N-Effizienz. Sogenannte „stay green“ Mutanten werden für unterschiedliche Nutzpflanzen als eine Möglichkeit diskutiert, Erträge signifikant zu steigern (z.B. Cha *et al.* 2002, Murchie *et al.* 2002, Spano *et al.* 2003) und sind teilweise bereits bis zur Patentanmeldung gelangt (Dunwell 2000). Gerade bei Winterraps mit seinem sehr frühen Blattabwurf könnte eine Verzögerung der Blattseneszenz bis zum Einsetzen der Samenreifung sehr deutliche Effekte erzielen. Auch die Blattseneszenz ist ein komplexes Phänomen, das bisher erst in Ansätzen verstanden wird (Lim *et al.* 2003). Dennoch gibt es erste Ansätze, Seneszenz gezielt zu verzögern. Gan & Amasino (1995) nutzten beispielsweise die seneszenzverzögernde Wirkung von Cytokinin, indem sie in transgenen Tabakpflanzen ein Schlüsselenzym der Cytokinin-Biosynthese unter der Kontrolle des seneszenzspezifischen *SAG12*-Promotors exprimierten. Auch die Expression des Homeobox-Gens *knotted1* unter Kontrolle des *SAG12*-Promotors führt in Tabak zu einer Verzögerung der Blattseneszenz (Ori *et al.* 1999). Der Promotor des entsprechenden Gens ist auch aus Raps kloniert worden (Noh & Amasino 1999a) und stünde für entsprechende Experimente zur Verfügung.



## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Phloembeladung von Aminosäuren in Raps (*Brassica napus* L.) durchgeführt. Es sollte vor allem geklärt werden, ob der Phloemtransport für die Remobilisation von organischem Stickstoff aus seneszierenden Rapsblättern limitierend ist und eine Ursache für die schlechte Stickstoffeffizienz dieser Kulturpflanze darstellt. Dazu wurden zum einen die Aminosäurekonzentrationen in verschiedenen, an der Phloembeladung beteiligten subzellulären Kompartimenten des Blattes bestimmt. Zum anderen wurden möglicherweise an der Phloembeladung beteiligte Aminosäuretransporter identifiziert und mit molekularbiologischen Methoden charakterisiert. Beide Aspekte der Phloembeladung wurden besonders unter dem Gesichtspunkt möglicher Veränderungen im Verlauf der Blattentwicklung untersucht.

Daneben wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen (Prof. Becker) eine Reihe doppelt haploider Rapslinien (DH-Linien) aus einer Kreuzung Bristol x Mansholts in mehrjährigen Feldversuchen physiologisch charakterisiert, um die Variabilität der Stickstoffnutzung in Raps zu untersuchen.

### **Variabilität der Stickstoffnutzung von DH-Linien mit gemeinsamem genetischen Ursprung**

1. Die 45 untersuchten DH-Linien, die einen gemeinsamen genetischen Ursprung hatten, wiesen hinsichtlich ihrer Nitratreduktaseaktivität, ihres Aminosäuregehaltes in den Blättern sowie ihres Proteingehaltes im Samen eine große Variabilität auf. Die Variationsspanne war vergleichbar mit der, die in einem früheren Versuch mit nicht-verwandten, genetisch stärker divergierender Linien beobachtet wurde (Zhou 2000). Die meisten DH-Linien waren bezüglich der Stickstoffakkumulation im Samen entweder sowohl N-effizient als auch N-responsiv oder keines von beidem. Sie zeigten mit und ohne N-Düngung eine konsistente Stickstoffnutzung. Es scheint, daß die Stickstoffeffizienz bei Raps ein stark genetisch determiniertes Merkmal ist, dessen hohe Variabilität noch ein großes Potential für züchterische Verbesserung aufweist.

### **Aminosäurekonzentrationen in subzellulären Kompartimenten von Rapsblättern**

1. Aminosäuren können in Mesophyllzellen von Rapsblättern Konzentrationen bis zu 200 mM im Zytosol und in den Chloroplasten und bis zu 60 mM in der Vakuole erreichen. Überschüssige Aminosäuren bei hoher Stickstoff-Versorgung werden vor allem in der Vakuole gespeichert. In allen Kompartimenten und bei hoher und niedriger Stickstoff-Versorgung sinken die Konzentrationen mit dem Blattalter. Alte Blätter bei 4 mM und bei 0,5 mM Nitrat angezogener Pflanzen unterscheiden sich nicht mehr hinsichtlich ihres Aminosäuregehaltes. Im Vergleich mit anderen Nutzpflanzen erhalten sie aber noch signifikante Mengen von Amino-Stickstoff.
2. Die apoplastischen Aminosäurekonzentrationen sinken ebenfalls mit dem Blattalter und sind bei hoher Stickstoff-Versorgung erhöht. Die meisten Aminosäuren liegen in Konzentrationen zwischen <0,1 mM und 2 mM vor, einzelne erreichen bis über 10 mM. Aus bereits vorliegenden Daten zu den Konzentrationen im Phloemsaft ergibt sich, daß Aminosäuren bei der Phloembeladung in Raps etwa 1,5-2fach gegenüber dem Zytosol der Mesophyllzellen und etwa 20-60fach gegenüber dem Apoplasten angereichert werden.

### **Charakterisierung von Aminosäuretransportern**

1. Aus Winterraps der Sorte Lirajet konnten zwei Aminosäuretransporter, BnAAP1 und BnAAP6, isoliert werden. Sie weisen eine hohe Homologie zu Aminosäuretransportern mit breiter Substratspezifität aus Arabidopsis auf. Von einem dritten Transporter, BnAAP2, wurde nur eine unvollständige cDNA erhalten.
2. *BnAAP1* und *BnAAP6* wurden heterolog in *Xenopus*-Oozyten exprimiert und elektrophysiologisch hinsichtlich ihrer Substratspezifität charakterisiert. Ähnlich den verwandten Proteinen aus Arabidopsis transportieren sie alle 18 getesteten proteinogenen Aminosäuren, wobei die Affinität für basische Aminosäuren am geringsten war. BnAAP6 besitzt eine höhere Affinität für Aspartat als BnAAP1. Im Gegensatz zu AtAAP1 aus Arabidopsis transportiert BnAAP1 auch Tryptophan effizient.

3. Beide Transporter erzeugten auch bei 0,1 mM Substratkonzentrationen deutliche Depolarisationen der Oozyten-Membran. Dies entspricht apoplastischen Konzentrationen seltenerer Aminosäuren und läßt den Schluß zu, daß die Transporter der AAP-Familie alleine für die Phloembeladung aller Aminosäuren mit Ausnahme der basischen Spezies verantwortlich sein könnten.
4. Eine in Arabidopsis transformierte GUS-Reporterfusion des *BnAAP6*-Promotors zeigten, daß das Gen in den Blattadern von Source-Blättern exprimiert wird. Die GUS-Färbung trat sowohl in den blind endenden kleinsten Gefäßen auf als auch in den Hauptadern, nicht jedoch in der Mittelrippe.
5. Die mRNAs von *BnAAP1* und *BnAAP6* wurden auch noch in seneszierenden Blättern gefunden. Die homologen Arabidopsis-Proteine stellen in Blättern nicht die hauptsächlichen Aminosäuretransporter dar. Es ist deshalb anzunehmen, daß seneszierende Rapsblätter auch noch weitere Aminosäuretransporter besitzen.

Insgesamt weisen die biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen der Phloembeladung mit Aminosäuren in alten Rapsblättern darauf hin, daß nicht Transportvorgänge die Remobilisation von organischem Stickstoff aus den Blättern limitieren. Für eine gentechnische Verbesserung der Stickstoffeffizienz sollten deshalb andere Ansatzpunkte, wie z.B. eine Verzögerung der Blattseneszenz, gewählt werden.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAP	Aminosäuretransporter („Amino Acid Permease“)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BnAAP1	<i>Brassica napus</i> Aminosäuretransporter 1
BnAAP2	<i>Brassica napus</i> Aminosäuretransporter 2
BnAAP6	<i>Brassica napus</i> Aminosäuretransporter 3
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin, Kohlenstoff
cDNA	„copy-DNA“
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (counts per minute)
cRNA	„copy-RNA“
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat-Gemisch (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Dithiothreitol
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	„Expressed Sequence Tag“
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FG	Frischgewicht
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAP-DH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GOGAT	Glutamat-Synthase
GS	Glutamin-Synthetase

GUS	$\beta$ -Glucuronidase
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonat
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
I	Inosin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
$K_{0,5}$	Substratkonzentration bei halbmaximalem Strom (elektrophysiologisches Äquivalent zum $K_M$ -Wert)
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
Km	Kanamycin
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
MDH	Malat-Dehydrogenase
MES	Morpholino-Ethansulfonat
MOPS	Morpholino-Propansulfonat
mRNA	„messenger-RNA“
N	Stickstoff
NAD(P)	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(phosphat)
NiR	Nitritreduktase
NR	Nitratreduktase
NRA	Nitratreduktaseaktivität
OA	Oxalacetat
OD	Optische Dichte
OPA	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP <sub>CX</sub>	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PIPES	Piperazin-Diethansulfonat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
RACE	„Rapid Amplification of cDNA Ends“

---

Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transcriptase, Raumtemperatur
RubisCO	Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TG	Trockengewicht
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
U	Enzym-Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Glucuronat

## 7. Literaturverzeichnis

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990)** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- Andrews M (1986)** The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell Environ.* 9: 511-519
- Aniol H (1994)** Stickstoffverteilung in erntereifen Rapsbeständen. *Raps* 3: 144-146
- Arnon DI (1949)** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15
- Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM & Frommer WB (2000)** SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12: 1153-1164
- Barszczak Z, Barszczak T & Foy CD (1993)** Effect of moisture, nitrogen rates, and soil acidity on seed yield and chemical composition of winter oilseed rape cultivars. *J. Plant Nutr.* 16: 85-96
- Barth I, Meyer S & Sauer N (2003)** PmSUC3: characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*. *Plant Cell* 15: 1375-1385
- Becker TB, Foyer C & Caboche M (1992)** Light-regulated expression of nitrate-reductase and nitrite-reductase genes in tomato and in the phytochrome-deficient *aurea* mutant of tomato. *Planta* 188: 39-47
- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schultz B & Feldmann KA (1996)** *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948-950
- Bhalerao R, Keskitalo J, Sterky F, Erlandsson R, Björbacka H, Birve SJ, Karlsson J, Gardeström P, Gustafsson P, Lunderberg J & Jansson S (2003)** Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiol.* 131: 430-442
- Bick JA, Neelam A, Hall JL & Williams LE (1998)** Amino acid carriers of *Ricinus communis* expressed during seedling development: Molecular cloning and expression analysis of two putative amino acid transporters, RcAAP1 and RcAAP2. *Plant Mol. Biol.* 36: 377-385
- Birnboim HC & Doly J (1979)** A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1522
- Blum H, Beier H & Gross HJ (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99

- Boorer KJ & Fischer W-N (1997)** Specificity and stoichiometry of the *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/amino acid transporter AAP5. *J. Biol. Chem.* 272: 13040-13046
- Boorer KJ, Frommer WB, Bush DR, Kreman M, Loo DDF & Wright EM (1996)** Kinetics and specificity of a H<sup>+</sup>/amino acid transporter from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 271: 2213-2220
- Boutin JP, Colonna P, Duc G, Gueguen J, Moussy F, Rochat C, Roux Y & Wullemme S (1998)** Isolation and characterization of new wrinkled-seeded mutants of pea. In: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes, 1998, Valladolid, Spain. European Association for Grain Legume Research, Paris: 196-197
- Boyle MDP & Reis KJ (1987)** Bacterial Fc receptors. *Biotechnology* 5: 697-703
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (Hrsg.) (2000)** Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland
- Buchanan-Wollaston V (1997)** The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48: 181-199
- Bürkle L, Hibberd JM, Quick WPK, Kühn C, Hirner B & Frommer WB (1998)** The H<sup>+</sup>-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol.* 118: 59-68
- Büttner M & Sauer N (2000)** Monosaccharide transporters in plants: Structure, function and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 263-274
- Bullock WO, Fernandez JM & Short JM (1987)** XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA E. coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Bio Techniques* 5: 376-378
- Cha K-W, Lee Y-J, Koh H-J, Lee B-M, Nam Y-W & Paek N-C (2002)** Isolation, characterization, and mapping of the stay green mutant in rice. *Theor. Appl. Genet.* 104: 526-532
- Chaillou H, Morot-Gaudry FJ, Salsac L, Lesaint C & Jolivet E (1986)** Compared effects of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> on growth and metabolism of french bean. *Physiol. Vég.* 24: 679-687
- Champigny MH (1995)** Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. *Photosyn. Res.* 46: 117-127



- Chang H-C & Bush DR (1997)** Topology of NAT2, a prototypical example of a new family of amino acid transporters. *J. Biol. Chem.* 272: 30552-30557
- Chapin FS, Moilanen L & Kielland K (1993)** Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature* 361: 150–152
- Charest P, Iyer VN & Miki BL (1989)** Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strains with *Brassica napus* and *Brassica juncea*. *Plant Cell Reports* 8: 303-306
- Chen L & Bush DR (1997)** LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 115: 1127-1134
- Chen L, Ortiz-Lopez A, Jung A & Bush DR (2001)** *ANT1*, an aromatic and neutral amino acid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125: 1813-1820
- Clements RJ (1973)** Selection for crude protein content in *Phalaris tuberosa* L. *Aust. J. Agric. Res.* 24: 21-58
- Clough SJ & Bent AF (1998)** Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 75-743
- Cooper JDH, Ogden G, McIntosh J & Turnell DC (1984)** The stability of the *o*-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol derivatives of amino acids: An investigation using high-pressure liquid chromatography with a precolumn derivatization technique. *Anal. Biochem.* 142: 98-102
- Coruzzi GM & Zhou L (2001)** Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. *Curr. Op. Plant Biol.* 4: 247-253
- Crawford TW, Rending VV & Broadbent FE (1982)** Sources, fluxes and sinks of nitrogen during early reproductive growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.* 70: 1654-1660
- Crouch ML & Sussex IM (1981)** Development and storage protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos *in vivo* and *in vitro*. *Planta* 153: 64-74
- Dejoux J-F, Recous S & Meynard J-M (1999)** Decomposition of <sup>15</sup>N-labelled rapeseed leaves, frozen in winter: Evaluation of N mineralization and rape N-uptake in spring under field and laboratory conditions. Proceedings, 10<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Canberra. <http://www.regional.org.au/au/gcirc/2/469.htm>
- Dejoux JF, Recous S, Meynard JM, Trinsoutrot I & Leterme P (2000)** The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant Soil* 218: 257-272
- Delauney AJ & Verma DPS (1993)** Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4: 215-223

- Delrot S (1989)** Loading of photoassimilates. In: Baker DA & Milburn JA (Hrsg.) Transport of photoassimilates. Longman Scientific and Technical, Harlow: 167-205
- Delrot S, Atanassova R & Maurousset L (2000)** Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 281-306
- Desimone M, Catoni E, Ludewig U, Hilpert M, Schneider A, Kunze R, Tegeder M, Frommer WB & Schumacher K (2002)** A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 847-856
- Duncan RR & Baligar VC (1990)** Genetics, breeding and physiological mechanism of nutrient uptake and use efficiency: An overview. In: Baligar VC, Duncan RR (Hrsg.) Crops as enhancers of nutrient use. Academic Press, San Diego
- Dunwell JM (2000)** Transgenic approaches to crop improvement. *J. Exp. Bot.* 51: 487-496
- Durka W, Schulze E-D, Gebauer G & Voerkelius S (1994)** Effects of forest decline on uptake and leaching of deposited nitrate determined from  $^{15}\text{N}$  and  $^{18}\text{O}$  measurements. *Nature* 372: 765-767
- Ehlers K, Knoblauch M & van Bel AJE (2000)** Ultrastructural features of well-preserved and injured sieve elements: Minute clamps keep the phloem transport conduits free for mass flow. *Protoplasma* 214: 80-92
- Ellenberg H (1977)** Stickstoff als Standortfaktor, insbesondere für mitteleuropäische Pflanzengesellschaften. *Oecol. Plant.* 12: 1-22
- Ellenberg H (1986)** Veränderungen der Flora Mitteleuropas unter dem Einfluß von Düngung und Immissionen. *Schweiz. Z. Forstw.* 136: 19-36
- Ellison AM & Gotelli NJ (2002)** Nitrogen availability alters the expression of carnivory in the northern pitcher plant, *Sarracenia purpurea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 4409-4412
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S & von Heijne G (2000)** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300: 1005-1016
- Engels C & Marschner H (1993)** Influence of the form of nitrogen supply on root uptake and translocation of cations in the xylem exudate of maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 44: 1695-1701

- Feller U & Keist M (1986)** Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. In: Lambers H, Neeterson JJ & Stulen I (Hrsg.) Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht: 219-234
- Fernandez DE, Turner FR, Crouch M (1991)** *In situ* localization of storage protein mRNAs in developing meristems of *Brassica napus* embryos. *Development* 111: 299-313
- Finlayson AJ (1976)** The seed protein contents of some Cruciferae. In: Vaughn JG, McLeod AJ & Jones BMG (Hrsg.) The biology and chemistry of the Cruciferae. Academic Press, New York: 279-306
- Fischer W-N, Kwart M, Hummel S & Frommer WB (1995)** Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 270: 16315-16320
- Fischer W-N, André B, Rentsch D, Krolkiewicz S, Tegeder M, Breitzkreuz K & Frommer WB (1998)** Amino acid transport in plants. *Trends Plant Sci.* 3: 188-195
- Fischer W-N, Loo DDF, Koch W, Ludewig U, Boorer KJ, Tegeder M, Rentsch D, Wright EM & Frommer WB (2002)** Low and high affinity amino acid H<sup>+</sup>-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. *Plant J.* 29: 717-731
- Fisher DB (1990)** Measurement of phloem transport rates by an indicator-dilution technique. *Plant Physiol.* 94: 455-462
- Fisher DB & Frame JM (1984)** A guide to the use of the exuding-stylet technique in phloem physiology. *Planta* 161: 385-393
- Foyer CH & Ferrario S (1994)** Modulation of carbon and nitrogen metabolism in transgenic plants with a view to improved biomass production. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 22: 908-915
- Frohman MA, Dush MK & Martin GR (1988)** Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002
- Frommer WB & Ninnemann O (1995)** Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal and plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 419-444
- Frommer WB, Hummel S & Riesmeier JW (1993)** Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5944-5948

- Frommer WB, Hummel S & Rentsch D (1994a)** Cloning of an *Arabidopsis* histidine transporting protein related to nitrate and peptide transporters. FEBS Lett. 347: 185-189
- Frommer WB, Kwart M, Hirner B, Fischer WN, Hummel S & Ninnemann O (1994b)** Transporters for nitrogenous compounds in plants. Plant Mol. Biol. 26: 1651-1670
- Frommer WB, Hummel S, Unseld M & Ninnemann O (1995)** Seed and vascular expression of a high-affinity transporter for cationic amino acids in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 12036-12040
- Fulda M, Heinz E & Wolter FP (1997)** *Brassica napus* cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase. Plant Mol. Biol. 33: 911-922
- Gahrtz M, Stolz J & Sauer N (1994)** A phloem-specific sucrose-H<sup>+</sup> symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. Plant J. 6: 697-706
- Gan S & Amasino RM (1995)** Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. Science 270: 1986-1988
- Gan S & Amasino RM (1997)** Making sense of senescence. Plant Physiol. 113: 313-319
- Gao Z, Maurousset L, Lemoine R, Yoo S-D, van Nocker S & Loescher W (2003)** Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. Plant Physiol. 131: 1566-1575
- Gerath H & Balko C (1995)** The influence of genotype and donor plant on the nitrogen efficiency of DH-lines of winter rape. Proc. Internl. Rapeseed Congress 9: 813-815
- Gerath H & Schweiger W (1991)** Improvement of the use of nutrients in winter rape - a strategy of economically and ecologically responsible fertilizing. Proc. Internl. Rapeseed Congress 8: 1197-1201
- Gerhardt R & Heldt HW (1984)** Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media. Plant Physiol. 75: 542-547
- Gilstring CF & Ljungdahl PO (2000)** A method for determining the *in vivo* topology of yeast polytopic membrane proteins demonstrates that Gap1p fully integrates into the membrane independently of Shr3p. J. Biol. Chem. 275: 31488-31495
- Givan CV (1979)** Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. Phytochemistry 18: 375-382

- Glass AD, Britto DT, Kaiser BN, Kinghorn JR, Kronzucker HJ, Kumar A, Okamoto M, Rawat S, Siddiqi MY, Unkles SE & Vidmar JJ (2002)** The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 855-864
- Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF & Sussman MR (2000)** Genetic evidence for the in planta role of phloem specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13979-13984
- Grallath S, Weimar T, Meyer A & Rentsch D (2003)** Transporters for compatible solutes in plants. Abstract, Phloem 2003 - International Conference on Phloem Transport, Bayreuth
- Grami B & LaCroix LJ (1977)** Cultivar variation in total nitrogen uptake in rape. *Can. J. Plant Sci.* 57: 619-624
- Grami B, Baker RJ & Stefansson BR (1977)** Genetics of protein and oil content in summer rape: Heritability, number of effective factors, and correlations. *Can. J. Plant Sci.* 57: 937-943
- Granli T & Bøckman OC (1994)** Nitrous oxide from agriculture. *Norw. J. Agricul. Sci.* Supplement No. 12
- Gunning BES & Pate JS (1969)** "Transfer cells". Plant cells with wall ingrowths, specialized in relation to short distance transport of solutes – their occurrence, structure, and development. *Protoplasma* 68: 107-133
- Hanahan D (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580
- Haritatos E, Medville R & Turgeon R (2000)** Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 105-111
- Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL & Kolchanov NA (1998)** Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. *Nucl. Acids Res.* 26: 364-370
- Hellman H, Funck D, Rentsch D & Frommer WB (2000)** Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signalling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiol.* 123: 779-789
- Herbers K & Sonnewald U (1998)** Molecular determinants of sink strength. *Curr. Op. Plant Biol.* 1: 207-216

- Hirner B, Fischer WN, Rentsch D, Kwart M & Frommer WB (1998)** Developmental control of H<sup>+</sup>/amino acid permease gene expression during seed development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 14: 535-544
- Holthaus U & Schmitz K (1991)** Distribution and immunolocalization of stachyose synthase in *Cucumis melo* L. *Planta* 185: 479-486
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS & Hoekema A (1993)** New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2: 208-218
- Housley TL, Peterson DM & Schrader LE (1979)** Long distance translocation of sucrose, serine, leucine, lysine, and CO<sub>2</sub> assimilates. I. Soybean. *Plant Physiol.* 59: 217-220
- Hsu L-C, Chiou T-J, Chen L & Bush DR (1993)** Cloning a plant amino acid transporter by functional complementation of a yeast amino acid transport mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7441-7445
- Hu CY, Chee PP, Chesney RH, Zhou JH, Miller PD & O'Brien WT (1990)** Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Rep.* 9: 1-5
- Hunt E, Newbury HJ, Bale J, Barrett D, Zhu X & Pritchard J (2003)** Investigating plant-aphid interactions by manipulating aphid diet *in planta*. Abstract, Phloem 2003 - International Conference on Phloem Transport, Bayreuth
- Imlau A, Truernit E, Sauer N (1999)** Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplasmic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* 11: 309-322
- Inoue H, Nojima H & Okayama H (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28
- Jefferson RA, Kavanagh TA & Bevan MW (1987)** GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3908
- Jensen LS, Mueller T, Magid J & Nielsen NE (1997)** Temporal variation of C and N mineralization, microbial biomass and extractable organic pools in soil after oilseed rape straw incorporation in the field. *Soil Biol. Biochem.* 29: 1043-1055
- Kang J & Turano FJ (2003)** The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6872-6877
- Kassner N (2003)** Vergleich des Aminosäuretransportes und der Stickstoff-Effizienz bei *Arabidopsis* und Raps. Diplomarbeit, Universität Göttingen

- Kavi Kishor PB, Hong Z, Miao GH, Hu CA & Verma DPS (1995)** Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108: 1387-1394
- Kessel B (2000)** Genetische Variation und Vererbung der Stickstoff-Effizienz bei Winterraps (*Brassica napus* L.). Dissertation, Universität Göttingen
- King GJ, Bennett MJ, May S, McEwan G, Ryder CD, Sarjeant A, Smith LB & Teakle GR (1999)** Comparing genetic and physical organisation of gene families affecting plant development within *Brassica* and *Arabidopsis*. Proceedings, 10<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Canberra. <http://www.regional.org.au/au/gcirc/4/468.htm>
- Kleiner D (1981)** The transport of  $\text{NH}_3$  and  $\text{NH}_4^+$  across biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 639: 41-52
- Knop C (1998)** Untersuchungen zum Zucker- und Aminosäuretransport bei der symplastischen Phloembeladung. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- Knop C (2001)** Zur Bedeutung von Saccharose-Transportern in Pflanzen mit offener Phloemanatomie. Dissertation, Universität Göttingen
- Knop C, Voitsekhovskaja O & Lohaus G (2001)** Sucrose transporters in two members of the Scrophulariaceae with different types of transport sugar. *Planta* 213: 80-91
- Koch W, Kwart M, Laubner M, Heineke D, Stransky H, Frommer WB & Tegeder M (2003)** Reduced amino acid content in transgenic potato tubers due to antisense inhibition of the leaf  $\text{H}^+$ /amino acid symporter StAAP1. *Plant J.* 33: 211-220
- Kohno-Murase J, Murase M, Ichikawa H & Imamura J (1994)** Effects of an antisense napin gene on seed storage compounds in transgenic *Brassica napus* seeds. *Plant Mol. Biol.* 26: 1115-1124
- Kowdley GC, Ackerman SJ, John E, Jones LR & Moorman JR (1994)** Hyperpolarization-activated chloride currents in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 103: 217-230
- Kühn C, Quick WP, Schulz A, Riesmeier JW, Sonnewald U & Frommer WB (1996)** Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter *SUT1*. *Plant Cell Env.* 19: 1115-1123
- Kühn C, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R & Frommer WB (1997)** Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* 275: 1298-1300
- Kullmann A (1987)** Quantitative Untersuchungen zur Stickstofftranslokation in vegetativen und generativen Teilen der Rapspflanze (*Brassica napus*) als Grundlage der Ertragsbildung. Dissertation, Universität Kiel

- Kwart M, Hirner B, Hummel S & Frommer WB (1993)** Differential expression of two related amino acid transporters with differing substrate specificity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 4: 993-1002
- Kyte J & Doolittle RF (1982)** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-142
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lagercrantz U (1998)** Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. *Genetics* 150: 1217-1228
- Lainé P, Ourry A, Macduff JH, Boucaud J & Salette J (1993)** Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: Effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiol. Plant.* 88: 85-92
- Lainé P, Ourry A & Boucaud J (1995)** Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: Effects of localized nitrate supply. *Planta* 196: 77-83
- Lalanne E, Mathieu C, Roche O, Vedel F & De Pape R (1997)** Structure and specific expression of a *Nicotiana sylvestris* putative amino-acid transporter gene in mature and *in vitro* germinating pollen. *Plant Mol. Biol.* 35: 85-864
- Laloi M, Delrot S & M'Batchi B (1993)** Characterization of sugar efflux from sugar beet leaf plasma membrane vesicles. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 731-741
- Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB & Patrick JW (2003)** Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell Env.* 26: 37-56
- Lam H-M, Coschigano K, Schultz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, Oliveira I, Ngai N, Hsieh MH & Coruzzi GM (1995)** Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* 7: 887-898
- Lam H-M, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R & Coruzzi GM (1996)** The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569-593
- Lam H-M, Chiu J, Hsieh M-H, Meisel L, Oliveira IC, Shin M, Coruzzi GM (1998)** Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 396: 125-126
- Lam H-M, Wong P, Chan H-K, Yam K-M, Chen L, Chow C-M & Coruzzi GM (2003)** Overexpression of the *ASN1* gene enhances nitrogen status in seeds of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132: 926-935



- Lawton MA, Dean SM, Dron M, Kooter JM, Kragh KM, Harrison MJ, Yu L, Tanguay L, Dixon RA & Lamb CJ (1991)** Silencer region of a chalcone synthase promoter contains multiple binding sites for a factor, SBF-1, closely related to GT-1. *Plant Mol. Biol.* 16: 235-249
- Lee JA & Steward GR (1978)** Ecological aspects of nitrogen assimilation. *Adv. Bot. Res.* 6: 2-43
- Lee Y-H & Tegeder M (2003)** AtLHT2, a high affinity transporter for neutral and acidic amino acid transfer in anthers of *Arabidopsis*. Abstract, Phloem 2003 - International Conference on Phloem Transport, Bayreuth
- Leegood RC, Lea PJ, Adcock MD & Häusler RE (1995)** The regulation and control of photorespiration. *J. Exp. Bot.* 46: 1397-1414
- Le Guill C, Parent JL, Rola-Pleszczynski M & Stankova J (1994)** Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal. Biochem.* 219: 164
- Leidreiter K, Kruse A, Heineke D, Robinson DG & Heldt HW (1995)** Subcellular volumes and metabolite concentrations in potato (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) leaves. *Bot. Acta* 108: 439-444
- Lemoine RK, Kühn C, Thiele N, Delrot S & Frommer WB (1996)** Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: Effects on amount and activity. *Plant Cell Env.* 19: 1124-1131
- Li Z-C & Bush DR (1990)**  $\Delta$ pH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves. *Plant Physiol.* 94: 268-277
- Li Z-C & Bush DR (1991)**  $\Delta$ pH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiol.* 96: 1338-1344
- Li Z-C & Bush DR (1992)** Structural determinants in substrate recognition by proton-amino acid symports in plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 294: 519-526
- Lickfett T, Wildenhayn M & Przemek E (1994)** Zu viel Nitrat nach Raps - was tun? DLG-Mitteilungen 8: 32-33
- Lillo C (1994)** Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant.* 90: 616-620
- Lim PO, Woo HR & Nam GN (2003)** Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 8: 272-278

- Liu L-H, Ludewig U, Frommer WB & von Wiren N (2003)** AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H<sup>+</sup> symporter in Arabidopsis. *Plant Cell* 15: 790-800
- Lohaus G & Möllers C (2000)** Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* 211: 833-840
- Lohaus G, Burba M & Heldt HW (1994)** Comparison of the contents of sucrose and amino acids in the leaves, phloem sap and taproots of high and low sugar-producing hybrids of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Exp. Bot.* 45: 1097-1101
- Lohaus G, Winter H, Riens B & Heldt HW (1995)** Further studies of the phloem loading process in leaves of barley and spinach. The comparison of metabolite concentrations in the apoplastic compartment with those in the cytosolic compartment and in the sieve tubes. *Bot. Acta* 108: 270-275
- Lohaus G, Büker M, Hussmann M, Soave C & Heldt HW (1998)** Transport of amino acids with special emphasis on the synthesis and transport of asparagine in the Illinois Low Protein and Illinois High Protein strains in maize. *Planta* 205: 181-188
- Lohaus G, Pennewiss K, Sattelmacher B, Hussmann M, Hermann Muehling K (2001)** Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiol. Plant.* 111: 457-465
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951)** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Lukens L, Zou F, Lydiate D, Parkin I & Osborn T (2003)** Comparison of a *Brassica oleracea* genetic map with the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 164: 359-372
- Marschner H (1995)** Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press, London
- Martin T, Hellman H, Schmidt R, Willmitzer & Frommer WB (1997)** Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *Plant J.* 11: 53-62
- McNeal FH, Berg MA, McGuire CF, Steward VR & Balcridge DE (1972)** Grain and plant nitrogen relationships in eight spring wheat crosses, *Triticum aestivum* L. *Crop. Sci.* 12: 599-602
- Meharg AA & Blatt MR (1995)** NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: Kinetic control by pH and membrane voltage. *J. Membr. Biol.* 145: 49-66
- Mehrer I & Mohr H (1989)** Ammonium toxicity: Description of the syndrome in *Sinapis alba* and the search for its causation. *Physiol. Plant.* 77: 545-554

- Miller AJ & Smith SJ (1992)** The mechanism of nitrate transport across the tonoplast of barley root cells. *Planta* 187: 554-557
- Miller AJ & Zhou JJ (2000)** *Xenopus* oocytes as an expression system for plant transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 343-358
- Miranda M, Borisjuk L, Tewes A, Heim U, Sauer N, Wobus U & Weber H (2001)** Amino acid permeases in developing seeds of *Vicia faba* L.: Expression precedes storage protein synthesis and is regulated by amino acid supply. *Plant J.* 28: 61-71
- Miranda M, Borisjuk L, Tewes A, Dietrich D, Rentsch D, Weber H & Wobus U (2003)** Peptide and amino acid transporters are differentially regulated during seed development and germination in faba bean. *Plant Physiol.* 132: 1950-1960
- Montamat F, Maurousset L, Tegeder M, Frommer WB & Delrot S (1999)** Cloning and expression of amino acid transporters from broad bean. *Plant Mol. Biol.* 41: 259-268
- Münch E (1930)** Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Gustav Fischer, Jena
- Mullis KB & Faloona FA (1987)** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- Murchie EH, Yang J, Hubbart S, Horton P & Peng S (2002)** Are there associations between grain-filling rate and photosynthesis in the flag leaves of field-grown rice? *J. Exp. Bot.* 53: 2217-2224
- Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T (1995)** Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7: 869-886
- Näsholm T, Ekblad A, Nordin A, Giesler R, Högberg M & Högberg P (1998)** Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* 392: 914-916
- Nelson RS & van Bel AJE (1998)** The mystery of virus trafficking into, through and out of the vascular bundles. *Progr. Bot.* 59: 476-533
- Noh Y-S & Amasino RM (1999a)** Identification of a promoter region responsible for senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Mol. Biol.* 41: 181-194
- Noh Y-S & Amasino RM (1999b)** Regulation of developmental senescence is conserved between *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 41: 195-206
- Noiraud N, Maurousset L & Lemoine R (2001)** Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *Plant Cell* 13: 695-705
- Okumoto S, Schmidt R, Tegeder M, Fischer WN, Rentsch D, Frommer WB & Koch W (2002)** High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seed of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277: 45338-45346

- Oparka KJ & Santa Cruz S (2000)** The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 323-347
- Oparka KJ & Turgeon R (1999)** Sieve elements and companion cells – traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* 11: 739-750
- Ori N, Juarez NT, Jackson D, Yamaguchi J, Banowitz GM & Hake S (1999)** Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell* 11: 1073-1080
- Ortiz-Lopez A, Chang H-C & Bush DR (2000)** Amino acid transporters in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 275-280
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee H-S, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V & Martienssen RA (2003)** Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.* 19: 141-147
- Parker I & Miledi R (1988)** A calcium-independent chloride current activated by hyperpolarization in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 233: 191-199
- Pate JS (1980)** Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 313-340
- Pate JS, Sharkey PJ & Atkins CA (1977)** Nutrition of a developing legume fruit. *Plant Physiol.* 59: 506-510
- Paterson AH, Lan T-H, Amasino R, Osborn TC & Quiros C (2001)** *Brassica* genomics: a complement to, and early beneficiary of, the *Arabidopsis* sequence. *Genome Biol.* 2: reviews1011.1-1011.4
- Peoples MB & Gifford RM (1990)** Long distance transport of nitrogen and carbon from sources to sinks in higher plants. In: Dennis DT & Turpin DH (Hrsg.) *Plant Physiology, biochemistry, molecular biology.* Longmann, Essex: 442-455
- Perez MD, Chambers SJ, Bacon JR, Lambert N, Hedley CL & Wang TL (1993)** Seed protein content and composition of near-isogenic and induced mutant pea lines. *Seed Sci. Res.* 3: 187-194
- Pfanz H & Dietz KJ (1987)** A fluorescence method for the determination of the apoplastic proton concentration in intact leaf tissues. *J. Plant Physiol.* 129: 41-48
- Prussak CE, Almazan MT & Tseng BY (1989)** Peptide production from proteins separated by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178: 233-238

- Quirino BF, Normanly J & Amasino RM (1999)** Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol. Biol.* 40: 267-278
- Randall PJ & Bouma D (1973)** Zinc deficiency, carbonic anhydrase, and photosynthesis in leaves of spinach. *Plant Physiol.* 52: 229-232
- Reese MG (2001)** Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput. Chem.* 26: 51-56
- Reinhold L & Kaplan A (1984)** Membrane transport of sugars and amino acids. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 45-83
- Rentsch D, Laloi M, Rouhara I, Schmelzer E, Delrot S & Frommer WB (1995)** NRT1 encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 370: 264-268
- Rentsch D, Hirner B, Schmelzer E & Frommer WB (1996)** Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell* 8: 1437-1446
- Rentsch D, Boorer KJ & Frommer WB (1998)** Structure and function of plasma membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. *J. Membrane Biol.* 162: 177-190
- Rhodes J, Thain JF & Wildon DC (1996)** The pathway for systemic electrical signal transduction in the wounded tomato plant. *Planta* 200: 50-57
- Riens B, Lohaus, G, Heineke D & Heldt HW (1991)** Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiol.* 97: 227-233
- Riesmeier JW, Willmitzer L & Frommer WB (1992)** Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* 11 : 4705-4713
- Riesmeier JW, Willmitzer L & Frommer WB (1994)** Evidence for the essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J.* 13 : 1-7
- Roberts JKM & Pang MKL (1992)** Estimation of ammonium ion distribution between cytoplasm and vacuole using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol.* 100 : 1571-1574
- Robinson DG & Hinz G (2001)** Organelle isolation. In: Satiat-Jeunemaitre B & Hawes C (Hrsg.) *Plant cell biology: A practical approach*, 2nd ed. IRL Press, Oxford: 295-324

- Rogers MS & Bendich AJ (1988)** Extraction of DNA from plant tissues. Plant Mol. Biol. Manual A6: 1-10
- Roitsch T, Ehneß R, Goetz M, Hause B, Hofmann M & Sinha AK (2000)** Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signalling. Austr. J. Plant Physiol. 27: 815-825
- Rolletscheck H, Borisjuk L, Miranda M, Radchuk R, Golombek S, Wobus U & Weber H (2003)** Functional characterization of nitrogen transport and protein accumulation in crop seeds. Abstract, Phloem 2003 - International Conference on Phloem Transport, Bayreuth
- Rossato L, Lainé P & Ourry A (2001)** Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. J. Exp. Bot. 52: 1655-1663
- Rost B (1996)** PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. Methods Enzymol. 266: 525-539
- Roychoudhury R, Jay E, Wu R (1976)** Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal desoxynucleotidyl transferase. Nucl. Acids Res. 3: 863-877
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B & Lucas WJ (2001)** The phloem as a conduit for inter-organ communication. Curr. Op. Plant Biol. 4: 202-209
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner H-Y & Hunt MD (1996)** Systemic acquired resistance. Plant Cell 8: 1809-1819
- Sakr S, Lemoine R, Gaillard C & Delrot S (1993)** Effect of cutting on solute uptake by plasma membrane vesicles from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Plant Physiol. 103: 49-58
- Sakr S, Noubahni M, Bourbouloux A, Riesmeier J, Frommer WB, Sauer N & Delrot S (1997)** Cutting, ageing and expression of plant membrane transporters. Biochim. Biophys. Acta 1330: 207-216
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989)** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger F, Nickler S & Coulson AR (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467
- Sattelmacher B, Horst WJ & Becker HC (1994)** Factors that contribute to genetic variation for nutrient efficiency of crop plants. Z. Pflanzenernähr. Bodenk. 157: 215-224

- Sauer N & Stolz J (1994)** SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J.* 6: 67-77
- Sauer N & Stolz J (2000)** Expression of foreign transport proteins in yeast. In: Baldwin SA (Hrsg.) *Membrane Transport*. Oxford University Press, Oxford: 79-105
- Sauer N & Tanner W (1984)** Partial purification and characterization of inducible proteins in *Chlorella*. *Z. Pflanzenphysiol.* 114: 367-375
- Schjoerring JK (1995)** Dynamics of nitrogen utilisation in *Brassica napus*. Workshop on *Brassica napus* L-4. Eucarpia, Helsingør
- Schulze E-D (1989)** Air pollution and forest decline in a spruce (*Picea abies*) forest. *Science* 244: 776-783
- Schulze E-D & Gebauer G (1997)** Nitrate nutrition of central European forest trees. In: Rennenberg H, Eschrich W & Ziegler H (Hrsg.) *Trees - contributions to modern tree physiology*. SPB Academic Publishing, Amsterdam: 273-291
- Schulze W, Frommer WB & Ward JM (1999)** Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes*. *Plant J.* 17: 637-646
- Seiffert B (2000)** Molekularbiologische Untersuchungen zur Stickstoffeffizienz bei *Brassica napus* L. Dissertation, Universität Göttingen
- Siegel LM & Wilkerson JQ (1989)** Structure and function of spinach ferredoxin-nitrite reductase. In: Wray JL & Kinghorn JR (Hrsg.) *Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation*. Oxford Science Publications, Oxford: 263-283
- Sieling K & Christen O (1999)** Yield, N uptake and N-use efficiency of and N leaching after oilseed rape grown in different crop management systems in northern Germany. Proceedings, 10th International Rapeseed Congress, Canberra. <http://www.regional.org.au/au/gcirc/2/95.htm>
- Sjödahl S, Gustavsson H, Rödin J, Lenman M, Höglund A & Rask L (1993)** Cruciferin gene families are expressed coordinately but with tissue-specific differences during *Brassica napus* seed development. *Plant Mol. Biol.* 23: 1165-1176
- Sjölund RD (1997)** The phloem sieve element: a river runs through it. *Plant Cell* 9: 1137-1146
- Solomonson LP & Barber MJ (1990)** Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 225-253

- Spano G, Di Fonzo N, Perrotta C, Platani C, Ronga G, Lawlor DW, Napier JA & Shewry PR (2003)** Physiological characterization of 'stay green' mutants in durum wheat. *J. Exp. Bot.* 54: 1415-1420
- Stacey G, Koh S, Granger C & Becker JM (2002)** Peptide transport in plants. *Trends Plant Sci.* 7: 257-263
- Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrtz M & Sauer N (1995)** Phloem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Plantago major* occurs into companion cells. *Plant Cell* 7: 1545-1554
- Studier FW & Moffat BA (1986)** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of clones genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130
- Sturm A & Tang GQ (1999)** The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* 4: 401-407
- Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K & Bennett M (2001)** Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev.* 15: 2648-2653
- Taylor DL & Bruns TD (1997)** Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4510-4515
- Tegeder M, Offler CE, Frommer WB & Patrick JW (2000)** Amino acid transporters are localized to transfer cells of developing pea seeds. *Plant Physiol.* 122: 319-325
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000)** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Theodoulou FL (2000)** Plant ABC transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 79-103
- Thorne JH (1985)** Phloem unloading of C and N assimilates in developing seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 317-343
- Towle DW, Baksinski A, Richard NE & Kordyleski M (1991)** Characterization of an endogenous Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Exp. Biol.* 159: 359-369
- Trinsoutrot I, Recous S, Mary B, Justes E & Nicolardot B (1999)** C and N mineralisation of oilseed rape crop residues in soil. Proceedings, 10th International Rapeseed Congress, Canberra. <http://www.regional.org.au/au/gcirc/2/344.htm>
- Trinsoutrot I, Nicolardot B, Justes E & Recous S (2000)** Decomposition in the field of residues of oilseed rape grown at two levels of nitrogen fertilisation. Effects of the dynamics of soil mineral nitrogen between successive crops. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 56: 125-137

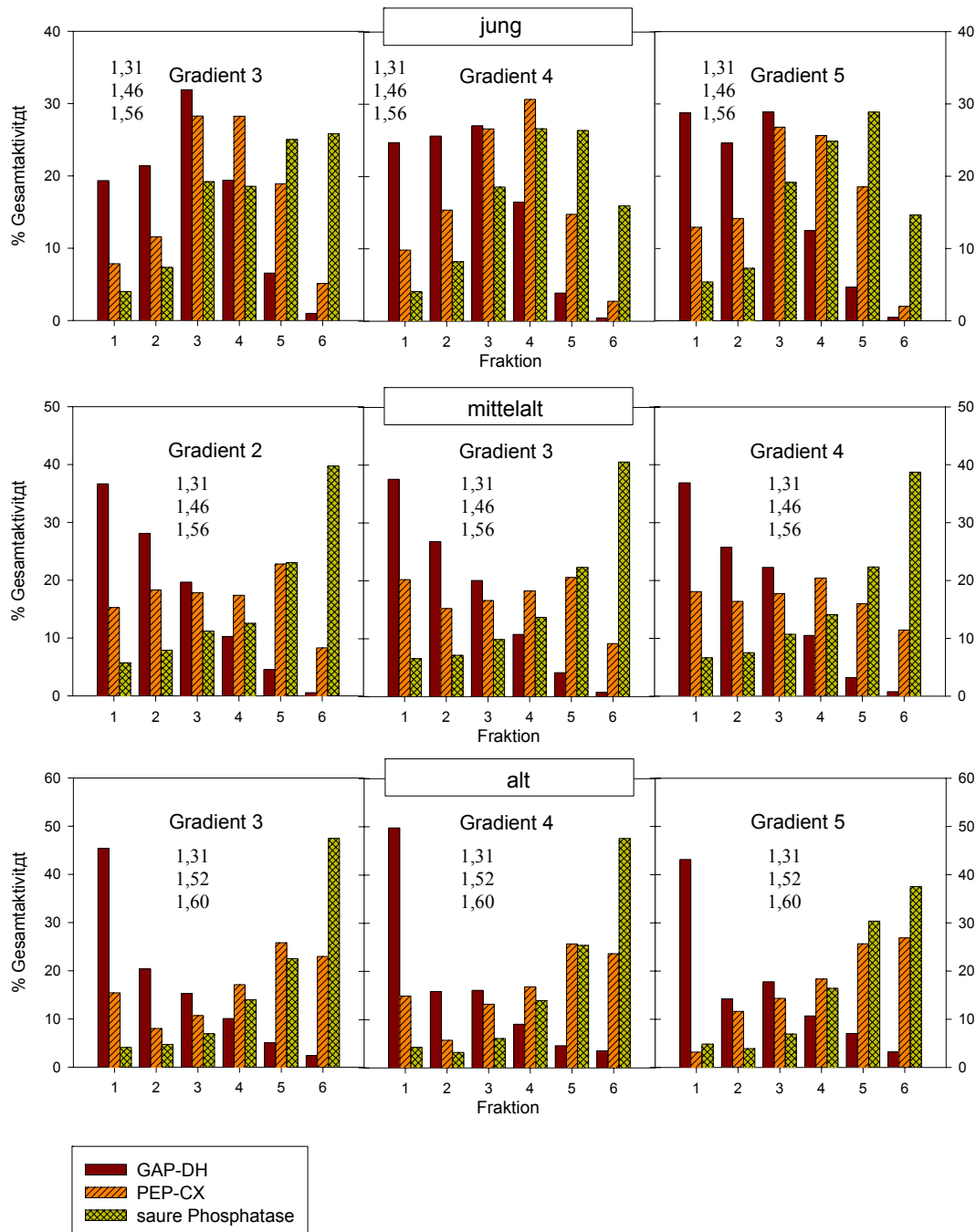


- Triplett EW, Barnett NM & Blevins DG (1980)** Organic acids and ionic balance in xylem exudate of wheat during nitrate or sulfate absorption. *Plant Physiol.* 65: 610-613
- Turgeon R (1991)** Symplastic phloem loading and the sink-source transition in leaves: A model. In: Bonnemain JL, Delrot S, Lucas WJ & Dainty J (Hrsg.) *Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation*. Quest Editions, Nantes
- Turgeon R (1996)** Phloem loading and plasmodesmata. *Trends Plant Sci.* 1: 418-423
- Upström B (1995)** Seed chemistry. In: Kimber D & McGregor DI (Hrsg.) *Brassica oilseeds, production and utilization*. CAB International, Wallingford: 217-242
- van Bel AJE (2003)** The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell Envir.* 26: 125-149
- van Beusichem ML, Kirkby EA & Baas R (1988)** Influence of nitrate and ammonium nutrition on the uptake, assimilation and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* 86: 914-921
- Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmioli N, Machray GC & Oparka KJ (2001)** Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* 13: 385-398
- Voegelé RT, Struck C, Hahn M & Mendgen K (2001)** The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8133-8138
- Volenec JJ, Ourry A & Joern BC (1996)** A role for nitrogen reserves in forage regrowth and stress tolerance. *Physiol. Plant.* 97: 185-193
- Wallbraun M (1997)** Genetische Modifizierung der Glutamin-Synthetase-Aktivität in *Brassica napus* L. Dissertation, Universität Göttingen
- Weber H, Rolletschek H, Heim U, Golombek S, Gubatz S & Wobus U (2000)** Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing seeds of *Vicia narbonensis* moderately decreases starch but increases protein content and affects seed maturation. *Plant J.* 24: 33-43
- Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB & Ward JM (2000)** A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* 12: 1345-1355
- Williams L & Miller A (2001)** Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 659-688
- Winter H, Lohaus G & Heldt HW (1992)** Phloem transport of amino acids and sucrose in correlation to the corresponding metabolite levels in barley leaves. *Plant Physiol.* 99: 996-1004

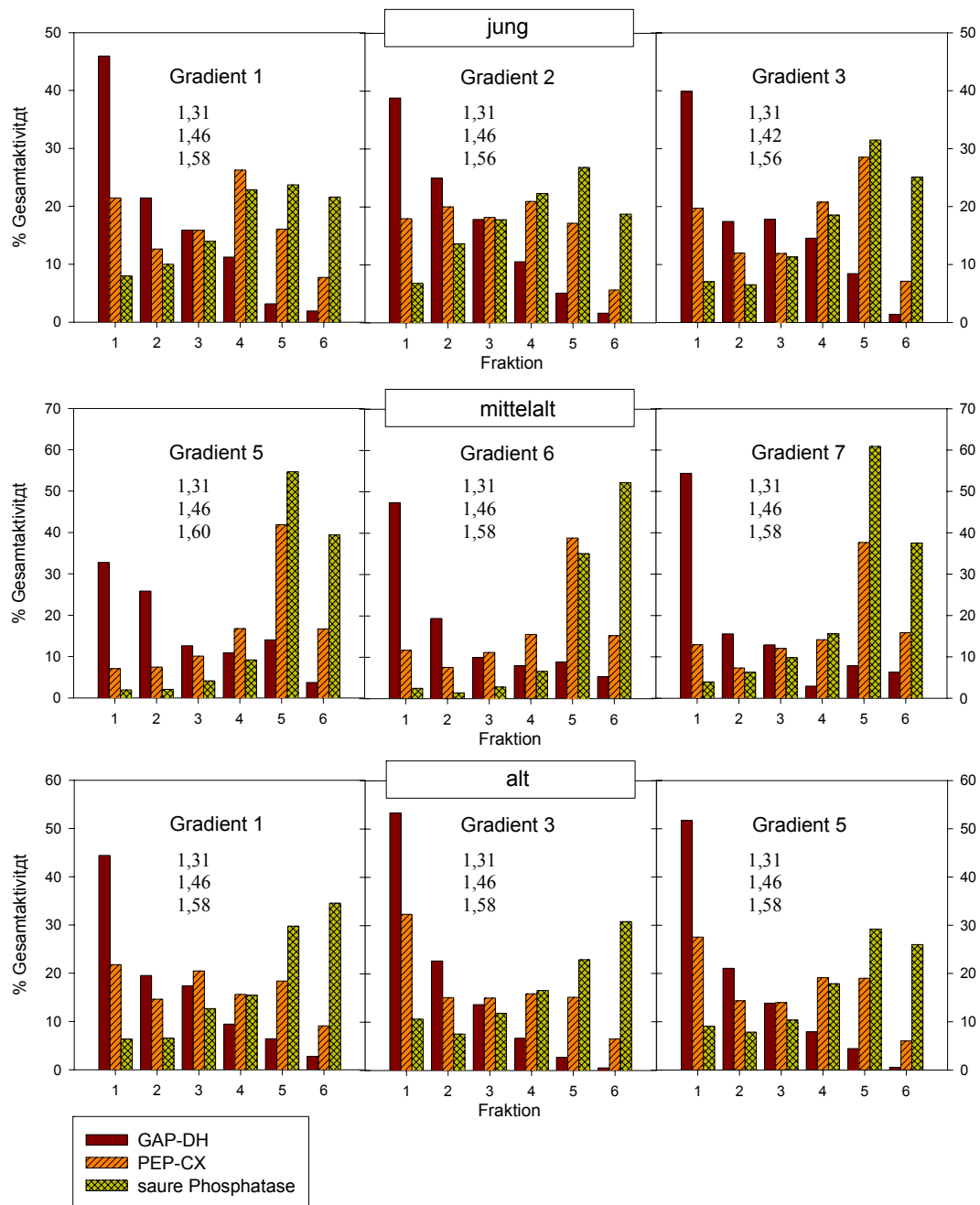
- Winter H, Robinson DG & Heldt HW (1993)** Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves. *Planta* 191: 180-190
- Winter H, Robinson DG & Heldt HW (1994)** Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta* 193: 530-535
- Wipf D, Ludewig U, Tegeder M, Rentsch D, Koch W & Frommer WB (2002)** Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem. Sci.* 27: 139-147
- Wobus U & Weber H (1999)** Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem.* 380: 937-944
- Wright KM, Roberts AG, Martens HJ, Sauer N & Oparka KJ (2003)** Structural and functional vein maturation in developing tobacco leaves in relation to AtSUC2 promoter activity. *Plant Physiol.* 131: 1555-1565
- Wurr DCE & Fellows JR (1998)** Leaf production and curd initiation of winter cauliflower in response to temperature. *J. Horticult. Sci. Biotechn.* 73: 691-697
- Yau SK & Thurling N (1987)** Variation in nitrogen response among spring rape (*Brassica napus*) cultivars and its relationship to nitrogen uptake and utilization. *Field Crops Res.* 16: 139-155
- Yoshida S, Ito M, Nishida I & Watanabe A (2001)** Isolation and RNA gel blot analysis of genes that could serve as potential molecular markers for leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 42: 170-178
- Zhou J-J, Theodoulou, Muldin I, Ingemarsson B & Miller AJ (1998)** Cloning and functional characterization of a *Brassica napus* transporter that is able to transport nitrate and histidine. *J. Biol. Chem.* 273: 12017-12023
- Zhou Z (2000)** Untersuchungen zum Blatt- und Wurzelmetabolismus sowie zum Phloem- und Xylemtransport in Zusammenhang mit der Stickstoff-Effizienz bei Raps (*Brassica napus* L.). Dissertation, Universität Göttingen
- Ziegler H (1975)** Nature of transported substances. In: Zimmermann MH & Milburn JA (Hrsg.) *Encyclopedia of plant physiology. New series, vol. 1. Transport in plants I. Phloem transport.* Springer Verlag, Berlin: 59-100
- Zimmermann MH & Ziegler H (1975)** List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: Zimmermann MH & Milburn JA (Hrsg.) *Encyclopedia of plant physiology. New series, vol. 1. Transport in plants I. Phloem transport.* Springer Verlag, Berlin: 479-503

## 8. Anhang

## 8.1 Verteilung der Markerenzyme bei der nichtwässrigen Fraktionierung



**Abb. 8.1:** Nichtwässrige Fraktionierung von Blättern bei 0,5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> hydroponisch angezogener Rapspflanzen: Verteilungen der Markerenzyme in den verwendeten Gradienten. Enzymaktivitäten sind in % der Gesamtkativität des betreffenden Enzyms in allen Fraktionen angegeben. Anstelle der sauren Phosphatase wurde z.T. α-Mannosidase als vakuoläres Markerenzym gemessen. 1 = oberste (leichteste), 6 = unterste (dichteste) Gradientenfraktion. Die Zahlenwerte bezeichnen die Dichten der drei zur Herstellung des Gradienten verwendeten Lösungen (s. 2.3.2) in g cm<sup>-3</sup>.



**Abb. 8.2: Nichtwässrige Fraktionierung von Blättern bei 4 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> hydroponisch angezogener Rapspflanzen: Verteilungen der Markerenzyme in den verwendeten Gradienten.** Enzymaktivitäten sind in % der Gesamttivität des betreffenden Enzyms in allen Fraktionen angegeben. Anstelle der sauren Phosphatase wurde z.T.  $\alpha$ -Mannosidase als vakuoläres Markerenzym gemessen. 1 = oberste (leichteste), 6 = unterste (dichteste) Gradientenfraktion. Die Zahlenwerte bezeichnen die Dichten der drei zur Herstellung des Gradienten verwendeten Lösungen (s. 2.3.2) in g cm<sup>-3</sup>.

## 8.2 cDNA- und Aminosäuresequenz von *BnAAP1* (GenBank Acc. No. AJ565847)

Start- und Stopcodon der Translation sind durch Fettdruck hervorgehoben. Putative Transmembranhelices sind grau hinterlegt.

```

1 CTTCTTCGTTTACTCTCTCTCTCTCTCTCTGACTTACACATTTACTTTATCTTCTTCTCTC 60
61 TGTCAACCTCCTTTGCTCTCTTCTCTCACTATGAAAGAGTTTCAACACCGATCAACACGGT 120
1 M K S F N T D Q H G 10
121 CACTCCGCGGCGGAATCCGGCGACGTCTACGCCATGTCCGATCCAACAAAGAACGTTGAT 180
11 H S A A E S G D V Y A M S D P T K N V D 30
181 GACGATGGCCGAGAGAAGAGGACGGGGACGTGGCTTACGGCGAGTGCGCATATTATCACG 240
31 D D G R E K R T G T W L T A S A H I I T 50
241 GCGGTAATAGGCTCAGGAGTGTGTCGTTGGCATGGGCCATAGCTCAGCTTGGTTGGATA 300
51 A V I G S G V L S L A W A I A Q L G W I 70
301 GCAGGGACTTTGATTCTGATCATTTTCTCGTTTATCACGTACTTCACTTCTACGATGCTC 360
71 A G T L I L I I F S F I T Y F T S T M L 90
361 GCTGATTGCTACCGTGCGCCGGATCCCCTCACCGGAAAACGAAACTACACTTACATGGAC 420
91 A D C Y R A P D P L T G K R N Y T Y M D 110
421 GTTGTTCGATCTTACCTCGGTGGTAGGAAAGTGCAGCTTTGTGGAGTGGCACAGTATGGG 480
101 V V R S Y L G G R K V Q L C G V A Q Y G 130
481 AATCTGATAGGAATCACTGTTGGGTACACCATCACTGCTTCTATTAGTTTGGTAGCGATC 540
131 N L I G I T V G Y T I T A S I S L V A I 150
541 GGGAAAGCGAACTGTTACCACAATAAAGGGCACCATGCAGATTGTACAATATCAAACTAT 600
151 G K A N C Y H N K G H H A D C T I S N Y 170
601 CCATATATGGCGGCCTTCGGGATCATTCAAATCCTTCTTAGCCAGATCCCCAACTTTCAC 660
171 P Y M A A F G I I Q I L L S Q I P N F H 190
661 AAGCTCTCTTTTCTCTCCCTTATGGCTGCGGTTATGTCTTTTCGCTTACGCAAGTATTGGG 720
191 K L S F L S L M A A V M S F A Y A S I G 210
721 ATTGGCCTAGCCATCGCGACGGTTCGAGGTGGGAAAGTGGGTAAGACGAATATGACGGGA 780
211 I G L A I A T V A G G K V G K T N M T G 230
781 ACGGTGGTAGGAGTTGATGTAACTGCGGCTCAGAAGATATGGAGATCGTTTCAAGCGGTT 840
231 T V V G V D V T A A Q K I W R S F Q A V 250

```

841 GGAGACATAGCGTTTGCATATGCTTACGCCACGGTTCTCATTGAGATTCAGGACACATTG 900  
251 G D I A F A Y A Y A T V L I E I Q D T L 270

901 AGATCTAGCCCAGCAGAGAACAAGCTATGAAAAGAGCAAGTTTTGTGGGAGTATCAACC 960  
271 R S S P A E N K A M K R A S F V G V S T 290

961 ACCACTTTCTTCTACATCTTATGTGGTTGTCTTGGATATGCTGCATTTGGAAACAAAGCC 1020  
291 T T F F Y I L C G C L G Y A A F G N K A 310

1021 CCTGGAGATTTCTCACCAATTTTCGGATTCTACGAGCCATTTTGGCTCATTGACTTTGCA 1080  
311 P G D F L T N F G F Y E P F W L I D F A 330

1081 AACGCTTGCATTGCTTTCCATCTCATTGGTGCCTATCAGGTGTTTCGCGCAGCCCATATTC 1140  
331 N A C I A F H L I G A Y Q V F A Q P I F 350

1141 CAGTTTGTGAGAAGAAATGCAATAGAACTGGCCTGACAACAAGTTCATCACATCTGAA 1200  
351 Q F V E K K C N R N W P D N K F I T S E 370

1201 TATTCAGTAAACATACCATTCTTGGAAAATTTAGCATCAACCTCTTCAGACTAGTGTGG 1260  
371 Y S V N I P F L G K F S I N L F R L V W 390

1261 AGGACAGCTTATGTGGTTATAACAACCTTTGGTAGCTATGATATTCCCTTTCTTCAACGCC 1320  
391 R T A Y V V I T T L V A M I F P F F N A 410

1321 ATCTTGGGTCTTATCGGAGCAGCTTCCTTCTGGCCTTTAACGGTTTATTTCCTCGTGGAG 1380  
411 I L G L I G A A S F W P L T V Y F P V E 430

1381 ATGCACATAGCACAACTAAGGTTAAGAAATACTCTTCTAGATGGATTGGGCTGAAAATG 1440  
431 M H I A Q T K V K K Y S S R W I G L K M 450

1441 TTGTGCTGGGTTTGTCTTGATCGTCTCCCTGTTAGCCGCTGCTGGATCCATCGCTGGACTG 1500  
451 L C W V C L I V S L L A A A G S I A G L 470

1501 ATAAGTAGTGTCAAGACATAACAAGCCCTTCCGGACTATCCATGAGTGAAGTTTGAGATCCA 1560  
471 I S S V K T Y K P F R T I H E \* 485

1561 TGCATGAGAGTGAAAAAATGTAACAGTTTGGTATTTTCTTTGTAAGTGGTGGTGTCTAA 1620

1621 AATCCAAATGAAAATATTGTATTGCTTAAAAAGCTACATGAATGTCTATGTATCATCCAC 1680

1681 AACTTTCAGTGTAATACATATGACCCAATAATAGCTTTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1739

### 8.3 cDNA- und Aminosäuresequenz von *BnAAP6* (GenBank Acc. No. AJ565848)

Start- und Stopcodon der Translation sind durch Fettdruck hervorgehoben. Putative Transmembranhelices sind grau hinterlegt. Die für die Antikörperherstellung verwendeten Peptide Nterm und Seq5 sind unterstrichen.

```

1 ATATAAAAACTACCTTTGCCTCTTCTTCCTATTTCAACATAATAGCAGAAAGGCAATCT 60

61 ATCTATGGAGAAAAAGAGCATGTTTCATTGAACAAAGCTTCACCGATCACAAAGAGTGGCGA 120
  1 MEKKSMFIEQSFTDHKSGD 19

121 TATGAACAAAACTTTGACGATGATGGACCCAGAAAAGAACAGGGACTTGGATGACGGG 180
  20 M N K N F D D D G R Q K R T G T W M T G 39

181 GAGCGCCCATATAATAACAGCGGTGATAGGATCAGGAGTGTGTCACTGGCGTGGGCAAT 240
  40 S A H I I T A V I G S G V L S L A W A I 59

241 TGCACAGCTCGGATGGGTGGCAGGACCCCGCTACTTATGGCTTTTTCCTTCATAACATA 300
  60 A Q L G W V A G P A V L M A F S F I T Y 79

301 CTTTACATCAACCATGCTTGCCGACTGTTATCGTTCCCCGGATCCTGTCACTGGAAAACG 360
  80 F T S T M L A D C Y R S P D P V T G K R 99

361 AAACATACCTACATGGAAGTTGTCCGCTCTTACTTAGGAGGAAGAAAAGTGATGTTATG 420
  100 N Y T Y M E V V R S Y L G G R K V M L C 119

421 TGGATTGGCTCAATACGGGAATCTGATTGGAATAACAATCGGCTACACAATCACAGCGTC 480
  120 G L A Q Y G N L I G I T I G Y T I T A S 139

481 GATTAGCATGGTGGCAGTGAAGAGGTGCAATTGTTTCCACAAGAATGGACATAATGTGAA 540
  140 I S M V A V K R S N C F H K N G H N V K 159

541 ATGTTCCACTTCAAACACTCCCTTCATGATCATATTCGCATGCATCCAAATGTACTTAG 600
  160 C S T S N T P F M I I F A C I Q I V L S 179

601 CCAAATCCCAAATTTCCACAATCTCTCTTGGCTCTCCATTCTAGCGGCCGTAATGTCCTT 660
  180 Q I P N F H N L S W L S I L A A V M S F 199

661 TTCTTACGCCTCCATTGGTATCGGTCTCTCCATCGCCAAAGTGGCCGGTGGCGGTGTGCA 720
  200 S Y A S I G I G L S I A K V A G G G V H 219

721 CGCAAGGACGGCCCTGACAGGAGTTACGGTCCGAGTTGATGTTACTGGTTCTGAGAAAAGT 780
  220 A R T A L T G V T V G V D V T G S E K V 239

781 ATGGAGAACATTCCAAGCGGTTGGAGATATCGCATTTGCTTATGCCTACTCAACCGTACT 840
  240 W R T F Q A V G D I A F A Y A Y S T V L 259

```

841 TATTGAGATACAGGACACCTTAAAAGCAAGTCCACCATCAGAAAACAAAGCCATGAAAAG 900  
 260 I E I Q D T L K A S P P S E N K A M K R 279

901 AGCAAGCCTTGTGGGTGTATCCACAACGACCTTCTTTTACATGTTATGCGGGTGTGTGGG 960  
 280 A S L V G V S T T T F F Y M L C G C V G 299

961 TTATGCTGCCTTTGGCAATAATGCGCCTGGAAATTTCTTAACCGGTTTTGGTTTTTATGA 1020  
 300 Y A A F G N N A P G N F L T G F G F Y E 319

1021 GCCCTTCTGGCTAATCGACTTTGCCAATGTCTGCATCGCTGTGCATCTTGTGGGGCCTA 1080  
 320 P F W L I D F A N V C I A V H L V G A Y 339

1081 TCAGGTCTTTTGCCAGCCAATCTTCCAATTTGTAGAGAGCCAGAGTGCAAAACGTTGGCC 1140  
 340 Q V F C Q P I F Q F V E S Q S A K R W P 359

1141 AGATAACAAGTTTATTACAGGAGAGTACAAAATGAACGTCCCTTGCGGTGGTGATTTTGG 1200  
 360 D N K F I T G E Y K M N V P C G G D F G 379

1201 TATCAGCTTGTTTAGATTGGTTTGGAGGACTTCATATGTTGTAGTTACGGCTGTTGTAGC 1260  
 380 I S L F R L V W R T S Y V V V T A V V A 399

1261 AATGATCTTCCCTTTCTTCAACGATTTCTTGGGTCTTATTGGAGCAGCTTCCCTTTGGCC 1320  
 400 M I F P F F N D F L G L I G A A S F W P 419

1321 TTTGACTGTTTACTTTCCCATTTGAGATGCATATTGCTCAGAAAAATATGAAGAAATTTTC 1380  
 420 L T V Y F P I E M H I A Q K N M K K F S 439

1381 TTTCACTTGGACATGGCTGAAAATCTTGAGCTGGGCTTGTTCCTCGTCTCCCTCGTTGC 1440  
 440 F T W T W L K I L S W A C F L V S L V A 459

1441 TGCTGCTGGATCTGTGCAAGGACTCATACAAAGTCTTAAGGATTTCAAGCCTTTCCAGGC 1500  
 460 A A G S V Q G L I Q S L K D F K P F Q A 479

1501 TCCCGAGTAGAACTGTGTTTTGTCTAATTTCTTCAAGAACACAACCTCCCTTGCACTCTCT 1560  
 480 P E \* 481

1561 TTTCTCCAATAATAGTGTATGTTTCGTTTGTAAATATATTTGTGTTCTTGTCCATTACGAA 1620

1621 ATGTTGAACCTATATTTGCTTGTCTGAAACAAATCTATCATCAATAAGTCCCTCTTTCTT 1680

1681 TTCAAAAAAAAAAAAAA 1697



#### 8.4 Nukleotidsequenz des *BnAAP6*-Promotors (GenBank Acc. No. AJ580452)

Der Transkriptionsstartpunkt ist durch Fettdruck hervorgehoben. Die putative Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor SBF-1 (Lawton *et al.* 1991) ist unterstrichen.

```

1  CTGTTGTTTAAACGTTTATGAGAGAAAATCCTCATAAAAAATAGTATATAATGCTGAGATG 60
61  AGGTGAGGATGTGGTGGCACGTGGTGAAGAAGAAGATAAGACGGTTGGAGGAGGTTAGGA 120
121 AACGACGAGTGGCGACAGTAGTGGAGGAGAATATGGTGACTATGATGAACAACCGGTAGC 180
181 GATAATGGTGATGAAGTTATGGGTAGAAGTGATTGATGTGGATCATAAGATCCACACTAG 240
241 AAATTTGGTAGTGATTATTTTGTAAAATATCAGGGAATAAATAACGTGAAAAATGATATT 300
301 TTTAGAACACAACGATACAATCAAATTCCAGCTGATAAAAAATAGACTTTTATTAACGAA 360
361 CGTATATTAAATACAGTGAGCAAATAGATCGGGTTAAAAGAACTAAAAATTAAGGGCTAAG 420
421 TATTGAGAATCAGAGAACGAAAGGTCGAGGTCGAAGTCGTGTGTAGTGTGTACTCACTCT 480
481 AGGATTCGAAATGTCCTCATCTCCCCTCTCCCTCTTTCCCTTTATGGCCTATTTCCCGCCG 540
541 GCGAGATCGTCTCAACCTCCTCCGTCAATCTCGGCTTCATTCTCTATAACTTGCGGGAA 600
601 GTCGTTCCCTCCACTAATGTGGTCGGCCTGTTGGGATTTTCCACATATCGTGTTATTGGAT 660
661 CAAACAATTGAGGCGAAAAGGAGGAGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 720
721 GTAGAATAACAACAAAATTAATACATAAAAGGAGGAGGAGGTGTTACAAATAGGATAAGA 780
781 GGAGAGAATGTTGTTGTTTCAGCAGCAGAGGAGGAGAGGGAGGAGAAGATGAGGAGGAGGT 840
841 TTTAACATTCTATAATATCATCATATGGAATAGTATACTATAGTGTGTGCAAGAATTGGC 900
901 ACCAAAATGTTTATCTATTTTTTACCGGAAATGTATTATTTTTAACGAATAAAAAAGTCT 960
961 CAAATTAGATGAAAAAGAATAAAGGAAGGAGAAGAAGAAAAAGTAACACATATCGTATTA 1020
1021 GTGTGAAATCATATATTTTATTCTATGTTTTTCGTAATAAAAAATAGAATAACATATAACAATA 1080

```

1081 CTACATAACTCATATTTATTTACTGTGAAAAAAAAAATTGTATTCTATTTTTCATGATAA 1140

1141 AGTAGAATAATTCACCAAATGGCAATTGTTTATCATCGTTTCTATTTTTTCTGACACCAA 1200

1201 CGATCAAATTTCTCAGTCCCTCAGAAAGCCATTGTAACCTTACCAAGATCACACAAACTC 1260

1261 AAGCTACTAAAAAAAAATTATAAGCCATTTCCCTTGAACCCATCAATTTTTTTTTTGTFFF 1320

1321 AAATCTTGTGCCTCTTCTTTATGTCTCTGCTTTATTTTTTCATTCTGTTTGATAATTGTAT 1380

1381 CAGATGAAAGTAGACAAGCGTTTATAAAAAGGGTATTTTCGTGCACCCAATCAATAATAT 1440

1441 GTATTATATCATAGTCATCAGTTTGCTATGGTTACTCTGTGAATTATAATTTTTTTATGG 1500

1501 TCATAGCATCAAATTTCCCTATGCGTAATGTAATGGAAAGAAAAAACTAGCAGACTTTT 1560

1561 GGAAAAGTCAACTATCATCAGATTGGTTGAAAAGGAATATACAAAGGAAACCCGTGATTG 1620

1621 GTTCCAAGTTTCGTTGAAAAATCAAAAGCAAAATTCTATGAACGATATTGATTTTGCCCA 1680

1681 CTAAAGTCCCTTTTGTAAATTGGCACACTCTCTTGTGTTGTATAAACAAAGTTTTCCTTA 1740

1741 TTCAAAAGATCCTAAAAGTTGGACCAATTGCGAATAGATTTCATAAGACACTAATGTTATT 1800

1801 GGTACTGAGAGAGGATTAAGTAATTGTGAAAATTTGAATGGATTCTTAAGGAAAATACA 1860

1861 TCATTATTATCAAATGAATGCTTGAAGAAAATGTGGAAGTGGTGGACCTTGAAACCAAAG 1920

1921 ATGCATGAACTACATAGGAGAGCCACCGATAGTGTGTCAATAATTATTCTCCACCCAG 1980

1981 CACACAGAAAATGATAATTTAATTTGTGATTTCGGTAAATTATAATCAACACAAACCCCTA 2040

2041 CAGTAACCATTGTTAAATTAACGATTGAGTCAAACAGACTAAGCATATCTCATTGTGTTA 2100

2101 ACAAAGAAAAAATCGATTCCAAGCAATCCATTCTACATTAATGGATCTCATGGAATCGT 2160

2161 TGCACAGAATAAAATATATATCAACTACAGATAAAGACAATAAAAGAAAAGTAAAAGAAAAG 2220

2221 AGGAATTTCTATATACATGAAACGGAAAGTGATTAGGCGTGAAATGTGCTTTGTCTATTT 2280

2281 AAGTGGGAAGAGTAGAGTCCTTCACACTTCAT 2312

### 8.5 Partielle cDNA- und Aminosäuresequenz von *BnAAP2*

```

1 GGGGTGCTGAGGTTGGCGTGGGCTATTGCTCAGCTTGGATGGATCGCTGGACCTGCGGTG 60
1 G V L R L A W A I A Q L G W I A G P A V 20

61 ATGCTATTGTTCTCTTTTGTACTCTATACTCCTCAACACTTCTCAGTGACTGCTACAGA 120
21 M L L F S F V T L Y S S T L L S D C Y R 40

121 ACCGGAGACGCGGTCTCCGGCAAGAGAAACTACACTTACATGGACGCAGTTCGGTCCATT 180
41 T G D A V S G K R N Y T Y M D A V R S I 60

181 CTCGGTGGGTTCAAGTTCAAGATATGTGGGCTGATTCAATACTTGAATCTCTTTGGTATC 240
61 L G G F K F K I C G L I Q Y L N L F G I 80

241 GCGGTTGGTTACACAATAGCAGCATCTATAAGCATGATGGCGATCAAGAGATCGCACTGT 300
81 A V G Y T I A A S I S M M A I K R S H C 100

301 TTCCACAAGAGCGGAGGAAAGGACCCATGTCACATGTCAGCACCTTACATGATATATTGT 360
101 F H K S G G K D P C H M S A P Y M I Y C 120

361 GTGACAGAGATCTGTCTCTCCAGGTCCCTGATTTGACCAGATTGTGATCTCAATGGTA 420
121 V T E I C L S Q V P D F D Q I V I S M V 140

421 GCAGCTGTCATGTCTGTCACTTATTCAGCCATTTGTCTAGCTCTAGGGATCGTTCAAGTT 480
141 A A V M S V T Y S A I C L A L G I V Q V 160

481 GCTGCAAATGGAGTGTTCAAAGGAAGTCTCACGGGCATAAGCATTGGGACAGTGACTCAA 540
161 A A N G V F K G S L T G I S I G T V T Q 180

541 ACACAGAAGATATGGAGAACCTTTCAAGCACTTGGAGATATTGCGTTTGCTTATTCATAC 600
181 T Q K I W R T F Q A L G D I A F A Y S Y 200

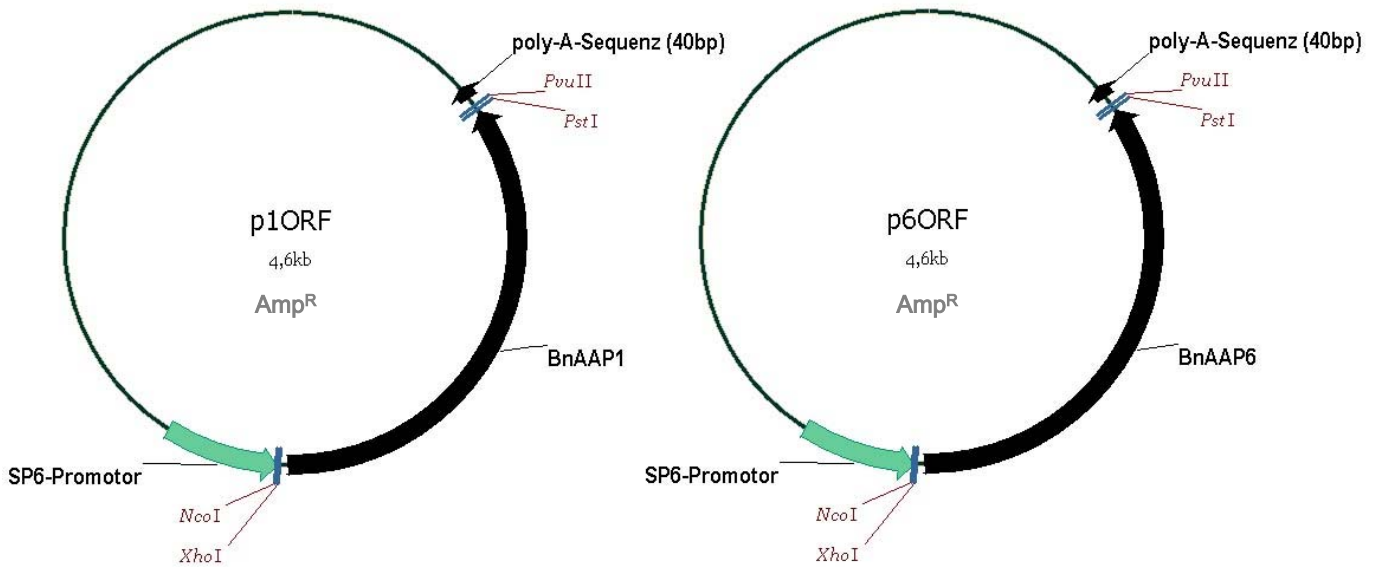
601 TCTGTTGTCCTAATAGAGATTCAGGATACTGTTAGATCCCCACCGTCAGAATCAACAACG 660
201 S V V L I E I Q D T V R S P P S E S T T 220

661 ATGAAGAAAGCTACAAAGATCAGCATTGCAGTCACCACTATCTTCTACATGCTATGTGGC 720
221 M K K A T K I S I A V T T I F Y M L C G 240

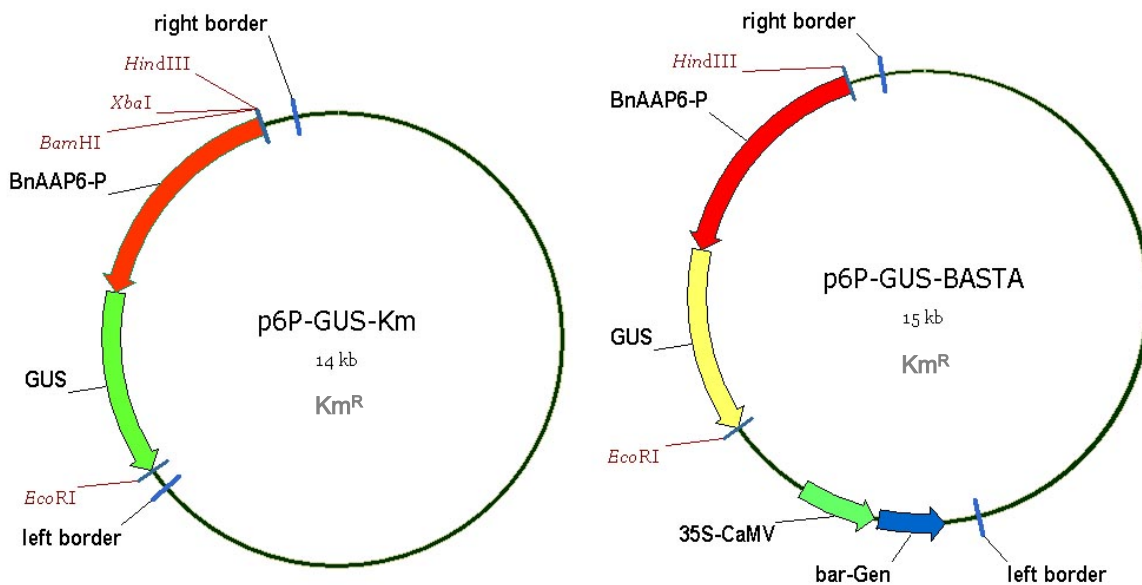
721 TCAATGGGCTGCGCCGCT 739
241 S M G C A A 246

```

## 8.6 Vektorkarten



**Abb. 8.3** Expressionsvektoren für die *in vitro*-Transkription von cRNA zur Injektion in *Xenopus* Oozyten. Siehe Abschnitt 3.5. Die Plasmide basieren auf pBF1 (W. Frommer, Tübingen)



**Abb. 8.4** Binäre Shuttle-Vektoren für die Transformation von Pflanzen mit einem *BnAAP6*-Promotor-*GUS* Reportergenkonstrukt. Siehe Abschnitt 3.6.1. p6P-GUS-Km basiert auf pBI101.3 (Jefferson *et al.* 1987) und p6P-GUS-BASTA auf pCAMBIA3300 (CAMBIA, Canberra, Australien). Das *bar*-Gen kodiert für die Resistenz gegen Glufosinat („BASTA“).



## **Den folgenden Personen möchte ich ganz herzlich danken...**

Frau PD Dr. Gertrud Lohaus für die Ermöglichung dieser Arbeit und die unerschöpfliche Fähigkeit, einem Doktoranden immer wieder Ruhe und Zuversicht einzuflößen und ihn das Projekt in einem sinnvollen Licht sehen zu lassen.

Prof. Dr. Hans-Walter Heldt für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen, die freundliche Übernahme des Korreferats und dafür daß er sich die für einen Abteilungsleiter ungewöhnliche Mühe gemacht hat, meine Anfrage nach möglichen Doktorandenstellen auführlich zu beantworten.

Prof. Dr. Ivo Feußner für das problemlose Weiterarbeiten, daß er allen „alten“ Abteilungsmitgliedern ermöglicht hat und die Wiedereinführung des gewissen „Seminardrucks“, sowie für das Korrekturlesen der Diskussion.

Frau PD Dr. Katharina Pawlowski für die freiwillige Übernahme der zweiten 100 % der Betreuung und dafür, daß auch nachts immer noch jemand da ist. Ich werde Dir weiterhin alle Daumen für noch kommende Bewerbungen gedrückt halten!

Frau PD Dr. Christine Struck für die Einarbeitung in die Oozyten-Elektrophysiologie, die hervorragende Vorbereitung der Experimente und die Möglichkeit, die Messungen in ihrem Labor in Konstanz durchführen zu können.

Frau Prof. Dr. Christiane Gatz und ihrer Arbeitsgruppe für das freundliche zur Verfügung Stellen von unentbehrlichen Geräten, Chemikalien und Know How in der guten alten Karspülen-Zeit.

Melanie Klenke und Marion Taube für die Einarbeitung am Anfang und all die Gradienten. Und das Rapsmörsern.

Herrn PD Dr. Christian Möllers, Alexandra Hüsken und Bettina Ritgen aus der Pflanzenzüchtung für die Hilfe bei der Rapstransformation und die Anzucht der Pflanzen.

Prof. Dr. Ernst Heinz (Hamburg), Dr. Günther Ochs (Mainz) und Prof. Dr. Dieter Strack (Halle) für die Überlassung von Raps cDNA-Banken.

Gerd Mader für's Unentbehrlichsein!

Herrn Wedemeyer und Frau Mester für die ausgezeichnete Betreuung der Pflanzen (und Blattläuse).

Anne Brandeck, Dein ansteckendes Lachen wird mir aus der Promotionszeit am meisten fehlen.

Dr. Olga Voitsekhovskaja für die schöne gemeinsame Zeit und die geteilte Phloembegeisterung. Ich freue mich auf kommende deutsch-russische Zusammenarbeiten!

Dr. Christian Knop für den Ruhepol im Labor, degenerierte Primer und den inversen Touch-down und Gespräche von Mann zu Mann...

Michaela Strauß für das Korrekturlesen und Pferdegeschichten :)

Carolin Farke, Nina Kassner, Nikola Mesecke und Eric Schröter dafür, daß das letzte Laborjahr noch besonders nett wurde, Nina für die geteilten Northern-Leiden und nicht zu vergessen Caro und Yvonne Rathmann für's Rapsmörsern.

Wulf Winkel Müller für die wichtige Nicht-Wissenschaft im Labor und außerhalb, verschiedene Sorten intensiver Abende, aber auch dafür, daß NRA-Messungen Spaß machen können. Und für's Rapsmörsern.

Allen Kollegen in der Abteilung für Biochemie der Pflanze, Ehemaligen, „alten Karspülern“ und „neuen Gaterslebenern“, für die wirklich angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und zu viele große und kleine Hilfen bei eigentlich allem, was man in einem Institut so tun kann, um sie hier aufzulisten. Knox und Thilo außerdem für die Sache mit dem Karate...

Meiner Mutter für die Unterstützung auf allen Ebenen und dafür, wie tapfer sie sich damit abfindet, daß meine Besuche in Hamburg meist nur noch dem Kampfsport dienen und ich oft nur für eine Fütterung und kostenlose Übernachtung aufkreuze.

Kathrin für all das Neue in meinem Leben und zerkratzte rote Schuhe. Wir müssen das mal warm machen...

## Lebenslauf

- 17.07.1972 geboren in Hamburg, Staatsangehörigkeit deutsch
- 1979-1983 Grundschule Hohnerkamp, Hamburg
- 1983-1992 Walddörfer-Gymnasium, Hamburg
- Juni 1992 Abitur
- 1992-1993 Zivildienst im Mobilen Sozialen Hilfsdienst der Dietrich Bonnhöfer-Kirche, Hamburg
- Oktober 1993 Beginn des Studiums der Biologie (Diplom) an der Universität Bayreuth
- Oktober 1995 Diplomvorprüfung in den Fächern Botanik, Organische Chemie und Physik
- Dezember 1999 Mündliche Diplomhauptprüfung in den Fächern Botanik, Biochemie und Genetik
- Januar-Oktober 1999 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema "Laborversuche und Freilandmessungen zur Bestimmung der natürlichen Isotopenhäufigkeit von  $N_2O$  und der Emission von  $N_2O$  und  $NO_x$  aus einem extensiv bewirtschafteten Grünlandökosystem" am Lehrstuhl für Pflanzenökologie der Universität Bayreuth, unter der Anleitung von PD Dr. G. Gebauer
- Mai 2000 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation