

**ZUR BEDEUTUNG VON SACCHAROSE-TRANSPORTERN
IN PFLANZEN MIT OFFENER PHLOEMANATOMIE**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Christian Knop

aus Hildesheim

Göttingen 2001

D 7

Referentin: PD Dr. Gertrud Lohaus

Korreferent: Prof. Dr. Hans-Walter Heldt

Tag der mündlichen Prüfung: 01.11.2001

In zweifelhaften Fällen entscheide man sich für das Richtige.

Karl Kraus

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stofftransport durch das Phloem	1
1.2	Phloembeladung	2
1.2.1	Apoplastische Phloembeladung	3
1.2.1.1	Der Apoplast	4
1.2.1.2	Transporter bei der apoplastischen Phloembeladung	5
1.2.2	Symplastische Phloembeladung	7
1.2.3	Metabolit-Konzentrationen in den beteiligten Kompartimenten	9
1.2.4	Einteilung in apoplastische oder symplastische Phloembelader	10
1.2.5	Phloemanatomie von <i>Alonsoa meridionalis</i> und <i>Asarina barclaiana</i>	10
1.3	Ferntransport und Phloementladung	12
1.4	Phloemtransport von Proteinen und Nukleinsäuren	13
1.5	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Pflanzenmaterial und Anzucht	15
2.1.2	Bakterien- und Hefestämme	16
2.1.3	Plasmide	16
2.1.4	Oligonukleotide (Primer)	17
2.2	Extraktion von Pflanzengeweben	18
2.2.1	Chloroform-Methanol-Extraktion von Blattgeweben	18
2.3	Untersuchungen des Apoplasten	18
2.3.1	Extraktion von Apoplastensaft	18
2.4	Gewinnung von Phloemsaft	19
2.4.1	Aphidentechnik	19
2.5	Metabolit-Messungen	20
2.5.1	Chromatographische Bestimmung von Zuckern	20
2.5.2	Chromatographische Bestimmung von Aminosäuren	21
2.6	Methoden zur Isolierung von Proteinen	23
2.6.1	Isolierung von Gesamt-Protein aus Pflanzen	23
2.6.2	Isolierung von Membranproteinen aus Pflanzen	24

2.6.3	Isolierung von Membranproteinen aus Hefe	25
2.7	Quantitative Proteinbestimmung	27
2.7.1	Proteinbestimmung nach Bradford	27
2.7.2	Proteinbestimmung nach Peterson	27
2.8	Methoden zur Präparation von Nukleinsäuren	28
2.8.1	RNA-Isolierung	28
2.8.1.1	GHC-Methode	28
2.8.1.2	„PEQLAB“-Methode	29
2.8.1.3	RNA-Isolierung mit verschiedenen kommerziellen Kits	30
2.8.1.4	mRNA-Isolierung	30
2.8.2	Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen	31
2.8.2.1	Isolierung großer DNA-Mengen	31
2.8.2.2	Isolierung von DNA zum Pflanzen-Screening	32
2.8.3	Isolierung von Plasmid-DNA	33
2.8.3.1	Mini-Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	33
2.8.3.2	Midi-Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	34
2.8.3.3	Maxi-Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	34
2.8.3.4	Mini-Plasmid-Präparation aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
2.8.4	Ethanol-fällung von DNA	36
2.8.5	Phenol-Chloroform-fällung von DNA	36
2.8.6	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	37
2.9	cDNA-Synthese	37
2.10	DNA-Amplifikation	37
2.10.1	Ableitung von synthetischen Oligonukleotiden (Primern)	37
2.10.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.10.3	Amplifikation eines Promotors aus genomischer DNA durch den „Universal Genome Walker Kit“	39
2.10.3.1	Konstruktion von „Genome Walker Libraries“	40
2.10.3.2	Genome Walker DNA „Walking“	42
2.10.4	Amplifikation von cDNA-Enden (RACE)	44
2.10.4.1	3'-RACE	44
2.10.4.1.1	cDNA-Synthese	44
2.10.4.1.2	3'-RACE-PCR	45
2.10.4.2	5'-RACE	47
2.10.4.2.1	cDNA-Synthese	47
2.10.4.2.2	Isolierung der cDNA	47
2.10.4.2.3	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase-Reaktion	48

2.10.4.2.4	5'-RACE-PCR	48
2.10.5	Kolonie-PCR	50
2.10.6	DNA-Sequenzierung	51
2.11	Klonierungsmethoden	52
2.11.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	52
2.11.2	Phosphatase-Behandlung	52
2.11.3	Ligation	53
2.11.4	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	53
2.11.5	Herstellung kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen	54
2.11.6	Transformationsmethoden	55
2.11.6.1	Transformation von <i>E. coli</i>	55
2.11.6.2	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
2.11.6.3	Hefe-Transformation	56
2.11.6.4	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
2.11.7	Restriktionsanalyse	58
2.11.8	Bakteriendauerkultur	59
2.12	Gelelektrophoretische Trennmethoden	59
2.12.1	TEA-Agarose-Gelelektrophorese	59
2.12.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	60
2.12.2.1	Zusammensetzung der Gele und Elektrophorese	60
2.12.2.2	Coomassie-Färbung	62
2.12.2.3	Silverstain-Färbung	62
2.13	Hybridisierungsmethoden	63
2.13.1	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten („Random Priming“)	63
2.13.2	Kolonie-Screening	64
2.13.3	Hybridisierung	65
2.14	Semi-Quantitative RT-PCR	66
2.14.1	Herstellung interner RNA-Standards	66
2.14.2	<i>in vitro</i> -Transkription	67
2.14.3	RT-PCR	68
2.14.4	Semi-Quantitative RT-PCR von Phloemsaft	68
2.15	Immunologische Untersuchungen	69
2.15.1	Herstellung eines Antikörpers	69
2.15.2	Western-Blot	70
2.15.2.1	Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen	70
2.15.2.2	Färbung des Blots	70
2.15.2.3	Antikörperreaktion	71

2.15.2.4	Peroxidase-Nachweis über „Enhanced Chemiluminescence“	71
2.15.3	Immunohistochemischer Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten	72
2.15.3.1	Einbettung von Pflanzengewebe in Methacrylat	72
2.15.3.2	Herstellung von Dünnschnitten	73
2.15.3.3	Behandlung der Schnitte mit Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen	73
2.16	Histochemischer GUS-Test	74
2.17	Nachweis von GFP-Fluoreszenz	75
2.18	Messung von <i>in vivo</i> -Transportaktivitäten	76
2.18.1	Vorbereitung der Hefekulturen	76
2.18.2	¹⁴ C-Saccharose-Aufnahmetest	76
2.19	Computergestützte Analyseverfahren	77
2.19.1	Sequenzanalyse von DNA und Proteinen	77
2.19.2	Untersuchungen zur Proteinstruktur	77
2.20	Statistische Auswertung der Experimente	78
3	Ergebnisse	79
3.1	Metabolitgehalte in den untersuchten Scrophulariaceen	79
3.1.1	Metabolitgehalte in <i>Alonsoa meridionalis</i>	79
3.1.1.1	Zucker	79
3.1.1.2	Aminosäuren	81
3.1.2	Metabolitgehalte in <i>Asarina barclaiana</i>	82
3.1.2.1	Zucker	83
3.1.2.2	Aminosäuren	84
3.2	Isolierung und Charakterisierung von Saccharose-Transportern	85
3.2.1	<i>AmsUTI</i>	86
3.2.1.1	Isolierung	86
3.2.1.2	Heterologe Expression in Hefe	88
3.2.2	<i>AbSUTI</i>	92
3.2.2.1	Isolierung	92
3.2.2.2	Heterologe Expression in Hefe	93
3.2.3	<i>AbSUT2</i>	95
3.2.3.1	Isolierung	95
3.2.3.2	Heterologe Expression in Hefe	97
3.3	Untersuchungen zur Expression von <i>AbSUTI</i> und <i>AmsUTI</i>	99
3.3.1	Herstellung der internen Standards <i>AbIS</i> und <i>AmIS</i>	99

3.3.2	Organ-spezifische Expression von <i>AbSUT1</i> und <i>AmSUT1</i>	101
3.3.3	Isolierung der Mesophyll-spezifischen Markergene <i>AbLhca1*1</i> und <i>AmLhca1*3</i>	102
3.3.4	Nachweis von <i>SUT</i> -mRNA im Phloemsaft	103
3.4	Charakterisierung des <i>AmSUT1</i> -Promotors	104
3.4.1	Isolierung des <i>AmSUT1</i> -Promotors	105
3.4.2	Konstruktion von <i>AmSUT1</i> -Promotor-Reportergen-Fusionen zur Lokalisierung der Promotoraktivität	106
3.4.3	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit <i>AmSUT1</i> -Promotor-Reportergen-Fusionen	110
3.5	Immunochemische Untersuchungen von AmSUT1	111
3.5.1	Herstellung eines Antikörpers gegen AmSUT1	111
3.5.2	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AmSUT1	112
3.5.3	Immunohistochemische Lokalisation von AmSUT1 in Gewebeschnitten	114
4	Diskussion	119
4.1	<i>Alonsoa meridionalis</i> transportiert im Phloem vor allem Raffinose und Stachyose, während <i>Asarina barclaiana</i> Saccharose transportiert	119
4.2	Es gibt keine spezielle Transportform für Amino-Stickstoff in <i>Alonsoa</i> und <i>Asarina</i>	121
4.3	Pflanzen mit offener Phloemanatomie besitzen Saccharose-Transporter	123
4.3.1	Die Saccharose-Transporter <i>AmSUT1</i> , <i>AbSUT1</i> und <i>AbSUT2</i> sind den Saccharose-Transportern aus apoplastischen Phloembeladern sehr ähnlich	124
4.3.2	AmSUT1, AbSUT1 und AbSUT2 unterscheiden sich gegenüber den bisher bekannten Saccharose-Transportern stark in der PCMBs-Sensitivität	125
4.4	Der <i>AmSUT1</i> -Promotor ist in <i>Arabidopsis thaliana</i> nicht aktiv	127
4.5	<i>AmSUT1</i> - und <i>AbSUT1</i> -mRNA sind in verschiedenen Pflanzenteilen, einschließlich des Phloems, nachweisbar	128
4.6	Das AmSUT1-Protein ist im Phloem von <i>Alonsoa meridionalis</i> lokalisiert	129
4.6.1	AmSUT1 ist für die Phloembeladung von Saccharose verantwortlich	130
4.6.2	Die Wiederaufnahme von Saccharose in das Phloem während des Ferntransports wird ebenfalls durch AmSUT1 bewirkt	131
4.7	Gibt es eine symplastische Phloembeladung?	132
5	Zusammenfassung	135

6	Abkürzungsverzeichnis	138
----------	------------------------------	------------

7	Literaturverzeichnis	140
----------	-----------------------------	------------

1. Einleitung

Pflanzen sind durch die Photosynthese in der Lage, aus Kohlendioxid organische Materie zu synthetisieren. Dies geschieht in den grünen Teilen der Pflanze, hauptsächlich in den Blättern. Dort ist dieser Stoffwechselweg in den Chloroplasten der Mesophyllzellen lokalisiert. Der anorganische Kohlenstoff in Form von CO_2 wird durch das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) fixiert, wobei als erstes stabiles Produkt 3-Phosphoglycerat gebildet wird. Dieses wird zu Triosephosphaten reduziert und im weiteren Verlauf das Substrat für die RubisCO, Ribulose-1,5-bisphosphat, regeneriert. Dieser Prozess wird nach einem seiner Entdecker Calvin-Zyklus genannt.

Die Triosephosphate stehen entweder im Chloroplasten zur Stärke-, Aminosäure- oder Fettsäuresynthese zur Verfügung oder werden aus dem Chloroplasten in das Cytosol transportiert (FLÜGGE und HELDT 1991), wo sie für die Synthese von Saccharose verwendet werden können. Dieses Endprodukt der Photosynthese kann nun dazu genutzt werden, um heterotrophe Teile der Pflanze, wie Wurzeln, Knollen, Sproßachsen, Blüten oder Samen zu versorgen. Organe, die Netto-Importeure von Kohlenstoffverbindungen sind, werden als Sink-Organen bezeichnet; Organe, die mehr Assimilate abgeben als aufnehmen, nennt man Source-Organen. Der Transport der verschiedenen Assimilationsprodukte (vorwiegend Saccharose und Aminosäuren) von Source- zu Sink-Organen erfolgt in einem speziellen Gewebe, dem Phloem.

1.1 Stofftransport durch das Phloem

Das Phloem besteht aus mindestens drei Zelltypen: Siebelementen, Geleitzellen und Phloemparenchymzellen. Die Siebelemente bilden die eigentlichen Transportbahnen, während die Geleitzellen auf die Phloembeladung spezialisiert sind. Die genaue Funktion der Phloemparenchymzellen ist bisher noch nicht bekannt. Durch das Phloem werden hauptsächlich Zucker und Aminosäuren transportiert (OHSHIMA et al. 1990, RIENS et al. 1991, WINTER et al. 1992, LOHAUS et al. 1994, 1998, LOHAUS und MOELLERS 2000). Daneben findet auch ein Transport von anorganischen Ionen, v.a. Kalium, statt. In den letzten Jahren zeigte sich, daß im Phloem auch verschiedene Makromoleküle, wie Proteine oder Nukleinsäuren, über lange Strecken transportiert werden können (GOLECKI et al. 1998, 1999, JORGENSEN et al. 1998, IMLAU et al. 1999, RUIZ-MEDRANO et al. 1999, THOMPSON und SCHULZ 1999, XOCONOSTLE-CÁZARES et al. 1999, HAYASHI et al. 2000, OPARKA und SANTA CRUZ 2000). Es wird vermutet, daß auf diesem Weg unterschiedliche entwicklungspezifische oder regulatorische Signale von einem Teil der Pflanze zu einem anderen weitergegeben werden.

Die Transportgeschwindigkeit in den Siebelementen des Phloems kann bis zu 40-100 cm * h⁻¹ betragen (CANNY 1975, FISHER 1990). Diese äußerst spezialisierten Zellen besitzen keinen Zellkern, Golgi-Apparat oder Vakuole und vermutlich auch keine Ribosomen (SJÖLUND 1997, KNOBLAUCH und VAN BEL 1998). Dennoch werden sie zu den lebenden Zellen gezählt. Geleitzellen haben dagegen ein dichtes Cytoplasma, sehr viele Mitochondrien, einen Zellkern und meist auch eine kleine Vakuole. Die Siebelemente bilden zusammen mit den Geleitzellen, mit denen sie über zahlreiche Plasmodesmata verbunden sind, den Siebelement-Geleitzellen-Komplex (SE-CC-Komplex). Die treibende Kraft für den Transport von Assimilaten im Phloem ist deren höhere Konzentration im Source-Gewebe im Vergleich mit den Sink-Geweben. Dadurch entsteht eine osmotische Potentialdifferenz, welche einen sog. "Druckstrom" zur Folge hat, der durch die Entnahme der Metabolite am Ort ihres Verbrauchs verstärkt wird (MÜNCH 1930).

Im Gegensatz zum Phloemtransport, der in Abhängigkeit von Source und Sink prinzipiell in jede Richtung stattfinden kann, findet der Transport im zweiten Leitgewebe der Pflanzen, dem Xylem, nur von der Wurzel zu den Blättern und anderen Sproßorganen statt. In diesem durch die Transpiration verursachten Strom werden neben Wasser hauptsächlich anorganische Ionen transportiert. Xylem und Phloem bilden zusammen die Leitbündel, von denen man die größeren auch makroskopisch als Blattadern erkennen kann.

1.2 Phloembeladung

Damit die Nettoprodukte der Photosynthese, Zucker und Aminosäuren, durch das Phloem transportiert werden können, müssen sie zunächst vom Ort ihrer Synthese, den Mesophyllzellen, zum SE-CC-Komplex gelangen. Dies geschieht auf symplastischem Weg, d.h. durch die zwischen Mesophyllzellen und Bündelscheidenzellen reichlich vorhandenen Plasmodesmata (VAN BEL 1993).

Um einen effektiven Transport zu gewährleisten, muß nach der Münch'schen Druckstrom-Theorie (MÜNCH 1930) die Stoffkonzentration im Phloem viel größer sein als im umgebenden Gewebe. Diese Erhöhung der Konzentration setzt eine Art aktiven Beladungsmechanismus voraus. Hierfür gibt es nach dem heutigen Stand der Forschung zwei verschiedene Möglichkeiten, die auf Unterschieden in der Anatomie des Phloems beruhen.

In grundlegenden Untersuchungen an mehreren hundert Pflanzenarten zeigten GAMALEI (1989, 1991) und einige andere Arbeitsgruppen (PATE und GUNNING 1969, TURGEON et al. 1975, 1993, FISHER 1986, SCHMITZ et al. 1987, VAN BEL und GAMALEI 1992, VAN BEL et al. 1992, KEMPERS et al. 1998, HARITATOS et al. 2000b, GOGGIN et al. 2001), daß es morphologisch gesehen zwei Typen von Phloem gibt: Den offenen und den geschlossenen Typ. Beim offenen Typ existieren zahlreiche Plasmodesmata zwischen den Mesophyll- bzw. Bündelscheidenzellen und den Geleitzellen, während beim geschlossenen Typ der SE-CC-Komplex von den Mesophyll- und

Bündelscheidenzellen symplastisch isoliert ist, d.h. es bestehen keine plasmodesmatischen Verbindungen. Der offene Phloemtyp soll mit der symplastischen Phloembeladung korrelieren und der geschlossene Typ mit der apoplastischen Phloembeladung (VAN BEL 1993, STITT 1996, TURGEON 1996, SAUER 1997, OPARKA und TURGEON 1999).

Die Einteilung in symplastische und apoplastische Phloembelader aufgrund der Häufigkeit von Plasmodesmata zwischen dem SE-CC-Komplex und den umgebenden Zellen ist stark schematisiert. Es gibt zahlreiche Zwischenstufen; zudem können innerhalb einer Pflanzenart mehrere Typen von SE-CC-Komplexen existieren (VAN BEL et al. 1988). Über die Funktion und Regulation dieser Plasmodesmata ist wenig bekannt.

Nach VAN BEL (1993) findet die Beladung des Phloems in den Blattadern 4.-7. Ordnung statt. Diese auch als "minor veins" bezeichneten Blattadern sind sehr klein und enden direkt im Mesophyll, so daß ein direkter Kontakt zwischen Geleitzellen und Mesophyllzellen herrscht. Die Blattadern 1.-3. Ordnung ("major veins", Mittelrippe und davon abzweigende Blattadern) dienen nicht mehr der Beladung des Phloems, sondern nur noch dem Transport zur Sproßachse.

1.2.1 Apoplastische Phloembeladung

Bei der apoplastischen Phloembeladung handelt es sich um einen Energie verbrauchenden aktiven Transportprozeß, der in der Mitte der siebziger Jahre des 20. Jahrhunderts von verschiedenen Arbeitsgruppen postuliert wurde (SOVONICK et al. 1974, GIAQUINTA 1976, 1977, FONDY und GEIGER 1977, KOMOR et al. 1977).

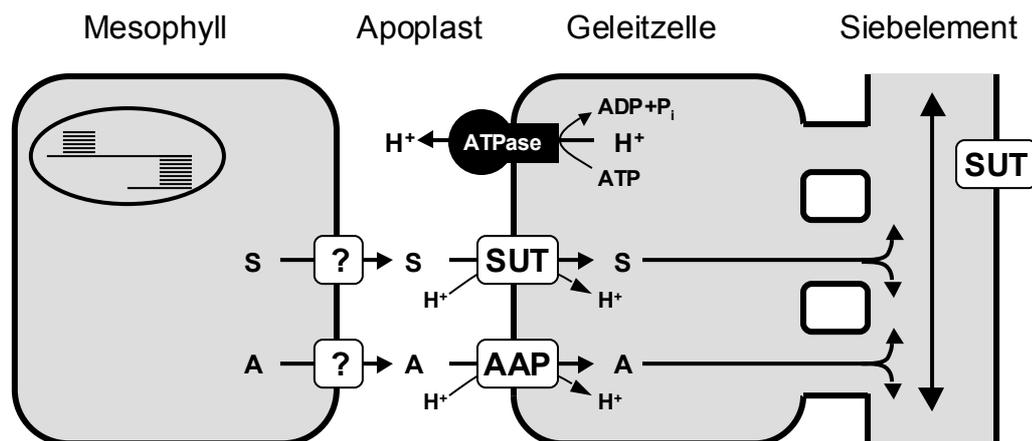


Abb. 1: Schema der apoplastischen Phloembeladung. Die im Mesophyll synthetisierten Metabolite Saccharose (S) und Aminosäuren (A) gelangen auf noch ungeklärte Weise in den Apoplasten. Dort werden sie von Saccharose-Transportern (SUT) und Aminosäure-Transportern (AAP) im Symport mit Protonen in die Geleitzellen aufgenommen und im Phloem abtransportiert. SUTs wurden sowohl in den Geleitzellen als auch direkt in den Siebelementen lokalisiert. Der Protonengradient wird durch H^+ -ATPasen aufgebaut, die sich in der Plasmamembran der Geleitzellen befinden.

Bei diesem Phloembeladungstyp werden Saccharose und Aminosäuren zunächst aus den Mesophyllzellen in den Apoplast transportiert. Wie der Export aus den Mesophyllzellen geschieht, ist bisher noch nicht genau charakterisiert. Es ist nicht klar, ob der Transport durch einfache oder erleichterte Diffusion oder einen spezifischen Transportmechanismus erfolgt. Im Apoplast diffundieren die Metabolite zum SE-CC-Komplex, wo sie schließlich über einen sekundär aktiven Transportprozeß durch Saccharose-H⁺-Symporter bzw. Aminosäure-H⁺-Symporter in die Geleitzellen oder Siebelemente aufgenommen werden (Abb. 1, SAUER 1997, FISCHER et al. 1998, LALONDE et al. 1999, LEMOINE 2000, WILLIAMS et al. 2000).

1.2.1.1 Der Apoplast

Der Apoplast stellt bei apoplastischen Phloembeladern ein wichtiges Kompartiment dar, da es die Schnittstelle zwischen dem Metabolitaustransport aus den Source-Zellen und dem Eintransport ins Phloem ist. Der Anteil des Apoplasten am Frischgewicht beträgt z.B. bei Spinat und Gerste 5-7% (WINTER et al. 1993, 1994). Obwohl bis heute verschiedene Methoden zur Bestimmung apoplastischer Konzentrationen (BLATT 1985, MARIENFELD und STELZER 1993, MÜHLING et al. 1995) sowie verschiedene Methoden zur Gewinnung apoplastischer Flüssigkeiten, u.a. die Infiltrations-Zentrifugationsmethode (KLEMENT 1965, SPEER und KAISER 1991, LOHAUS et al. 2001), verwendet wurden, ist die genaue Konzentrationsbestimmung schwierig geblieben, da über die Kompartimentierung des Apoplasten wenig bekannt ist.

Die Metabolit-Konzentrationen im Apoplasten sind sehr niedrig. So beträgt die Saccharose-Konzentration in einer Vielzahl von untersuchten Pflanzenarten nur 0.1-5 mM (FONDY und GEIGER 1977, HEYSER et al. 1978, MADORE und WEBB 1981, DELROT et al. 1983, LOHAUS et al. 1995, KNOP 1998). Die Konzentration von Aminosäuren liegt ebenfalls im unteren millimolaren Bereich (LOHAUS et al. 1995, KNOP 1998). Pflanzenarten mit apoplastischer Phloembeladung unterscheiden sich hinsichtlich der Metabolit-Konzentrationen im Apoplasten nicht von Arten mit vermutlich symplastischer Phloembeladung (KNOP 1998). Die Analyse apoplastischer Waschflüssigkeiten gibt die durchschnittliche Konzentration im Apoplast an. Inwieweit der Apoplast kompartimentiert ist und darin Konzentrationsgradienten vorhanden sind (CANNY 1987), ist derzeit noch nicht endgültig geklärt (LOHAUS et al. 2001).

Der pH-Wert des Apoplasten liegt im Bereich von 5-6 (GRIGNON und SENTENAC 1991, TETLOW und FARRAR 1993, MÜHLING et al. 1995, SAVCHENKO et al. 2000) und ist damit niedriger als im Phloem und im Cytosol der Source-Zellen. Eine Ursache hierfür sind H⁺-ATPasen, die in der Plasmamembran der Geleitzellen lokalisiert sind und unter ATP-Verbrauch Protonen in den Apoplasten pumpen (DeWITT et al. 1991, BOUCHÉ-PILLON et al. 1994, DeWITT und SUSSMAN

1995, ZHAO et al. 2000). Dieser Protonengradient wird von Saccharose- bzw. Aminosäure-Transportern in der Plasmamembran des SE-CC-Komplexes ausgenutzt, um im Symport mit Protonen die entsprechenden Metabolite ins Phloem zu transportieren.

1.2.1.2 Transporter bei der apoplastischen Phloembeladung

In der Plasmamembran lokalisierte Transportproteine sind essentiell für die Phloembeladung aus dem Apoplast. Bis Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts waren diese Proteine lediglich biochemisch charakterisiert (SOVONICK et al. 1974, GIAQUINTA 1976, 1977, FONDY und GEIGER 1977, KOMOR et al. 1977, BUSH 1990, 1993). Erst durch die Komplementation von Hefe-Mutanten mit cDNA-Expressionsbibliotheken gelang es, viele Gene für Metabolit-Transporter zu entdecken. Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Transporter zeigen einen typischen Aufbau aus die Plasmamembran durchspannenden α -Helices und gehören der sog. "major facilitator superfamily" (MFS) an (SAIER 2000).

RIESMEIER et al. (1992) konnten erstmals die cDNA eines Saccharose-Transporters aus Spinat (*SoSUT*, *Spinacia oleracea* sucrose transporter) isolieren. Mittlerweile ist eine große Anzahl an Saccharose-Transportern aus den unterschiedlichsten Pflanzenarten bekannt. Allein in *Arabidopsis* besteht diese Genfamilie aus mindestens acht Mitgliedern (LALONDE et al. 1999, LEMOINE 2000, WILLIAMS et al. 2000). Sie werden entweder als SUT (sucrose transporter) oder SUC (sucrose carrier) bezeichnet.

Saccharose-Transporter besitzen eine durchschnittliche Größe von ca. 510 Aminosäuren und bestehen vermutlich aus zwei Sets von jeweils sechs membranspannenden Domänen, die durch einen zentralen cytoplasmatischen Loop verbunden sind (RENTSCH et al. 1998). Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur, z.B. durch Röntgenstrukturanalyse, ist bisher nicht gelungen. Neuerdings wurden auch Saccharose-Transporter beschrieben, bei denen dieser zentrale Loop sehr stark verlängert ist, so daß die Gesamtgröße auf ca. 590 Aminosäuren ansteigt (DAVIES et al. 1999, BARKER et al. 2000, MEYER et al. 2000, SCHULZE et al. 2000). Für den Loop wurde eine Funktion als Teil einer Signaltransduktionskaskade im Rahmen des sog. "sugar sensing" postuliert (BARKER et al. 2000, SCHULZE et al. 2000), die jedoch bisher nicht bestätigt werden konnte (MEYER et al. 2000).

Viele der Transporter sind funktionell durch Expression in Hefe oder *Xenopus*-Oozyten charakterisiert. Ihr K_m -Wert liegt bei ca. 1 mM, sie werden durch Protonophore wie CCCP und Sulfhydrylgruppenblocker wie PCMBs gehemmt und zeigen neben der Affinität für Saccharose lediglich noch eine gewisse Affinität gegenüber dem Disaccharid Maltose (RIESMEIER et al. 1992, 1993, GAHRTZ et al. 1994, SAUER und STOLZ 1994, LUDWIG et al. 2000, NOIRAUD et al. 2000, LEMOINE 2000, SCHULZE et al. 2000). LUDWIG et al. (2000) konnten kürzlich zeigen, daß Saccharose-Transporter auch die Aufnahme des strukturell nicht verwandten Vitamin H (Biotin)

katalysieren. Welche physiologische Signifikanz dieser Befund hat, ist jedoch noch unklar. Der Transport von Saccharose und Protonen verläuft im Symport mit einer Stöchiometrie von 1:1 (BUSH 1990, ZHOU et al. 1997, ZHOU und MILLER 2000).

Saccharose-Transporter unterliegen einem hohen Turnover und werden teilweise in diurnalem Rhythmus exprimiert (KÜHN et al. 1997, DELROT et al. 2000). Zudem werden sie möglicherweise durch ihr Substrat Saccharose (CHIOU und BUSH 1998) und Phosphorylierung (ROBLIN et al. 1998) in ihrer Aktivität reguliert.

Die an der Phloembeladung beteiligten Saccharose-Transporter sind entweder in den Geleitzellen (STADLER et al. 1995, STADLER und SAUER 1996) oder Siebelementen des SE-CC-Komplexes (KÜHN et al. 1997, BARKER et al. 2000, WEISE et al. 2000) lokalisiert. Daneben spielen Saccharose-Transporter bei vielen weiteren physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle: Sie sind z.B. im Speicherparenchym von Karottenwurzeln vorhanden (SHAKYA und STURM 1998) und werden bei der Samenentwicklung (WEBER et al. 1997, TEGEDER et al. 1999, WESCHKE et al. 2000) bzw. bei der Pollenentwicklung und dem Pollenwachstum (LEMOINE et al. 1999, STADLER et al. 1999) exprimiert.

Die essentielle Bedeutung der Saccharose-Transporter für die apoplastische Phloembeladung und damit das Pflanzenwachstum wurde durch antisense-Repression (RIESMEIER et al. 1994, KÜHN et al. 1996, LEMOINE et al. 1996, BÜRKLE et al. 1998) oder "knockout"-Mutanten (GOTTWALD et al. 2000) der entsprechenden Gene nachgewiesen. Diese Veränderungen resultierten in geringerer Größe der Pflanzen, verlangsamtem Wachstum, geringerem Knollenertrag, bis hin zu Zwergwuchs und Sterilität.

Obwohl Saccharose-Transporter inzwischen aus zwölf Pflanzenfamilien bekannt sind, wurden sie bisher nicht in Pflanzen mit vermutlich symplastischer Phloembeladung nachgewiesen.

Kürzlich gelang es, einen Transporter für einen im Phloem transportierten Zuckeralkohol, Mannitol, in Sellerie (*Apium graveolens*) zu identifizieren (*AgMaT1*, NOIRAUD et al. 2001). Es konnte durch Northern Blot-Analyse gezeigt werden, daß dieser Transporter verstärkt im Phloem exprimiert ist. Transporter für andere phloemmobile Zucker wie Sorbitol oder Raffinose-Oligosaccharide wurden bisher nicht isoliert.

Im Phloensaft werden neben Zuckern auch größere Mengen an Aminosäuren transportiert (OHSHIMA et al. 1990, RIENS et al. 1991, LOHAUS et al. 1995, LOHAUS und MOELLERS 2000). Diese werden vermutlich ebenfalls mittels eines Protonen-Symport-Mechanismus ins Phloem transportiert. Allerdings wurden Aminosäure-Transporter bisher nicht auf zellulärer Ebene durch Immunolokalisation nachgewiesen, sondern ihre Expressionsmuster wurden meist durch Promotor-GUS-Fusionen untersucht (FISCHER et al. 1998).

Im Jahr 1993 wurde erstmals ein Aminosäure-Transporter mittels Hefe-Komplementation gleichzeitig von FROMMER et al. und HSU et al. isoliert und charakterisiert. Dieser wurde *AtAAP1* (*Arabidopsis*

thaliana amino acid permease 1) benannt und transportiert ein weites Spektrum an Aminosäuren. In *Arabidopsis* wurden bisher sieben solcher Transporter gefunden, die zu einer Genfamilie gerechnet werden (FISCHER et al. 1998, DELROT et al. 2000). Sie haben eine Größe von ca. 480 Aminosäuren und sollen, je nach verwendetem Computerprogramm zur Strukturvorhersage, 9-12 membranspannende Domänen besitzen (RENTSCH und FROMMER 1996). Experimentelle Ergebnisse von CHANG und BUSH (1997) ergaben, daß AtAAP1 elf membranspannende Regionen besitzt, wobei der N-Terminus im Cytoplasma und der C-Terminus im Extrazellulärraum liegt.

Neben den relativ unspezifischen AAPs gibt es noch einige andere Aminosäure-Transporter, die eine Spezifität für einzelne Aminosäuren besitzen (FISCHER et al. 1998, YOUNG et al. 1999): Die ProTs (proline transporters, RENTSCH et al. 1996, SCHWACKE et al. 1999), die LHTs (lysine histidine transporters, CHEN und BUSH 1997), die CATs (cationic amino acid transporters, früher AATs), die ANTs (aromatic and neutral amino acid transporters, CHEN et al. 2001), die GABA-Transporter (BREITKREUTZ et al. 1999) und die Auxin-Transporter (BENNETT et al. 1996). Die Untersuchung von Aminosäure-Transportern konzentriert sich bisher im wesentlichen auf *Arabidopsis*.

1.2.2 Symplastische Phloembeladung

Der Mechanismus der symplastischen Phloembeladung ist, obwohl er bei ca. 1/3 aller Pflanzenfamilien vorkommen soll (GAMALEI 1989), weit weniger erforscht und verstanden als die apoplastische Phloembeladung.

Pflanzen mit vermutlich symplastischer Phloembeladung besitzen eine offene Phloemanatomie, d.h. der SE-CC-Komplex ist über viele Plasmodesmata mit den umgebenden Bündelscheiden- und Mesophyllzellen verbunden (GAMALEI 1989, TURGEON et al. 1993). Der dort auftretende Geleitzellentyp mit zahlreichen Plasmodesmata wird als Intermediärzelle bezeichnet (TURGEON et al. 1975, FISHER 1986, SCHMITZ et al. 1987, VAN BEL 1993, FLORA und MADORE 1996). Neben diesen sind oftmals auch normale Geleitzellen in den Blattadern vorhanden (TURGEON et al. 1993). Die zu transportierenden Zucker können durch die Intermediärzellen theoretisch direkt vom Ort ihrer Synthese in das Phloem gelangen, ohne dort aktiv aufgenommen zu werden. Dies steht allerdings im Widerspruch zur Münch'schen Druckstrom-Theorie, da die Metabolit-Konzentrationen im Phloem nicht höher als im umgebenden Gewebe sein könnten und damit kein Massenfluß zustande käme. Ein Konzentrationsgradient wurde jedoch zumindest in *Cucumis melo* nachgewiesen (HARITATOS et al. 1996).

Eine offene Phloemanatomie korreliert sehr oft mit dem Auftreten von zusätzlichen Zuckern, die neben Saccharose im Phloem transportiert werden (TURGEON 1996). Dies sind meist Raffinose-Oligosaccharide oder Polyole wie Mannitol und Sorbitol (ZIMMERMANN und ZIEGLER 1975). Für Pflanzen, die neben Saccharose auch Raffinose und Stachyose transportieren, entwickelte TURGEON

(1991, 1996) das "polymer trap" Modell (Abb. 2). Nach dieser Hypothese sollen die Intermediärzellen als "Molekül-Fallen" dienen, indem Saccharose aus dem Mesophyll durch die Plasmodesmata in die Intermediärzellen gelangt, wo dieses Disaccharid mit dem dort synthetisierten Galactinol zu Raffinose und anschließend zu Stachyose reagiert. Raffinose und Stachyose sollen zu groß sein, um durch die Plasmodesmata zurückdiffundieren zu können. Dies würde bedeuten, daß die Ausschlußgröße dieser Plasmodesmata zwischen 342 Dalton (Saccharose) und 504 Dalton (Raffinose) liegen muß. Bisher wurde davon ausgegangen, daß Plasmodesmata zwischen Mesophyll und SE-CC-Komplex eine Ausschlußgröße von ca. 1 kDa und innerhalb des SE-CC-Komplexes von ca. 3 kDa haben (ROBARDS und LUCAS 1990), so daß eine Selektion im Bereich von 0.5 kDa unwahrscheinlich erscheint. Außerdem sind die *in vivo*-Ausschlußgrößen von Plasmodesmata durch Untersuchungen zum Proteintransport durch diese Zellverbindungen generell in Frage gestellt (BALACHANDRAN et al. 1997, CRAWFORD und ZAMBRYSKI 1999, 2001, OPARKA et al. 1999, PICKARD und BEACHY 1999, CITOVSKY und ZAMBRYSKI 2000, JACKSON 2000).

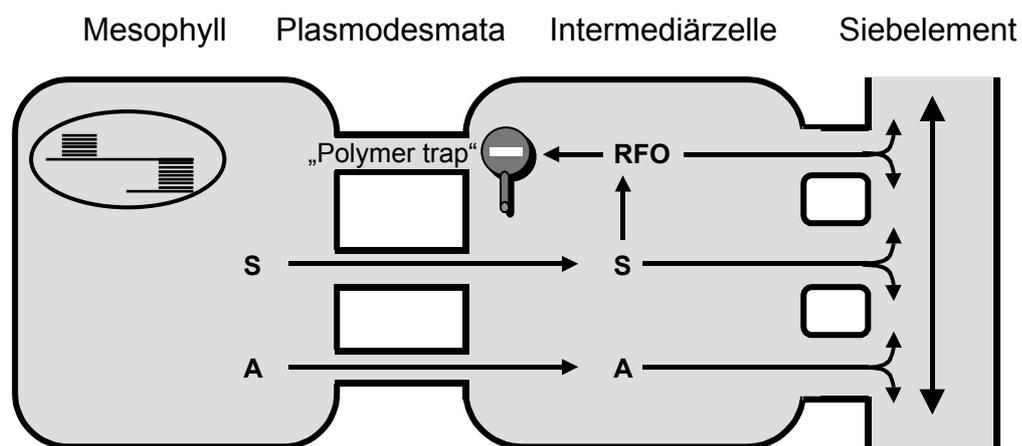


Abb. 2: Schema der symplastischen Phloembeladung. Die im Mesophyll synthetisierten Metabolite Saccharose (S) und Aminosäuren (A) gelangen durch die zahlreich vorhandenen Plasmodesmata auf symplastischem Weg in die Intermediärzellen, wo die Saccharose mit Galactinol zu Raffinose-Oligosacchariden (RFO) reagiert. Diese Tri- (Raffinose) und Tetrasaccharide (Stachyose) sollen nach dem „polymer trap“ Modell (TURGEON 1991, 1996) zu groß sein, um durch die Plasmodesmata zurückdiffundieren zu können. So soll eine Erhöhung der Stoffkonzentrationen und damit ein Transport durch das Phloem möglich sein.

In Blättern gibt es zwei getrennte Synthesorte für Raffinose-Oligosaccharide: Einen in Mesophyllzellen und einen in Intermediärzellen (HOLTHAUS und SCHMITZ 1991, BACHMANN und KELLER 1995). Im Cytosol der Mesophyllzellen wird aus *myo*-Inositol und UDP-Galactose Galactinol synthetisiert (KANDLER und HOPF 1982). Dieses reagiert mit Saccharose zu Raffinose und mit einem weiteren Galactinol-Molekül zu Stachyose. Dieses Tetrasaccharid wird über einen H^+ -Antipporter in die Vakuole transportiert und dort gespeichert (GREUTERT und KELLER 1993). Der gleiche Syntheseweg läuft für die zum Export bestimmten Raffinose-Oligosaccharide auch in den

Intermediärzellen ab (BEEBE und TURGEON 1992, TURGEON und GOWAN 1992, FLORA und MADORE 1993, SPRENGER und KELLER 2000).

Für vermutliche symplastische Phloembelader, die nur Saccharose oder Polyole in Kombination mit Saccharose transportieren, liefert das "polymer trap" Modell keine hinreichende Erklärung, da die transportierten Moleküle alle eine geringe Größe besitzen.

1.2.3 Metabolit-Konzentrationen in den beteiligten Kompartimenten

Die günstigste Methode, um reinen Phloensaft aus Pflanzen zu isolieren, ist die Laser-Aphiden-Technik (BARLOW und McCULLY 1972, FISHER und FRAME 1984). Hierbei wird der Stechrüssel einer Blattlaus mit einem Laserstrahl durchtrennt und der austretende Phloensaft mit einer Mikrokapillare aufgefangen. Diese Technik wurde bisher hauptsächlich bei apoplastischen Phloembeladern angewandt. Die so bestimmten Saccharose-Konzentrationen liegen zwischen 600 und 1400 mM (OHSHIMA et al. 1990, RIENS et al. 1991, WINTER et al. 1992, LOHAUS et al. 1994, 1998, LOHAUS und MOELLERS 2000). Die Saccharose-Konzentrationen im Cytosol der Mesophyllzellen liegen dagegen etwa im Bereich von 20-100 mM (RIENS et al. 1991, WINTER et al. 1992, LEIDREITER et al. 1995, LOHAUS und FISCHER 2001), so daß ein großer Konzentrationsgradient zwischen dem Cytosol der Mesophyllzellen und dem Phloem vorhanden ist (Abb. 3). Die Aminosäure-Konzentration im Phloem (ca. 100-200 mM) ist jedoch gegenüber dem Cytosol der Mesophyllzellen nur leicht erhöht (RIENS et al. 1991, WINTER et al. 1992, LOHAUS und MOELLERS 2000, LOHAUS und FISCHER 2001).

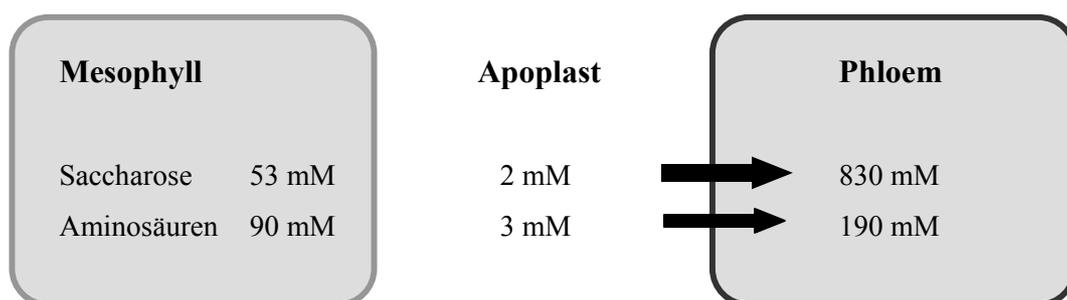


Abb. 3: Saccharose- und Aminosäure-Konzentrationen im Cytosol von Mesophyllzellen, im Apoplasten und im Phloensaft von Spinatblättern in der zweiten Hälfte der Lichtperiode (nach WINTER et al. 1994, LOHAUS et al. 1995).

Für symplastische Phloembelader existieren kaum Veröffentlichungen über Metabolit-Konzentrationen im Phloensaft, der mit Hilfe von Blattlausrüsseln gewonnen wurde und damit aus intakten Pflanzen stammt. MITCHELL et al. (1992) isolierten Phloensaft aus Melonen durch Anschneiden der Stengel. Die Konzentrationen von Saccharose, Raffinose und Stachyose im Exudat

waren mit 50, 5 und 40 mM sehr niedrig. HARITATOS et al. (1996) beschrieben für die gleiche Pflanzenart wesentlich höhere Konzentrationen (130, 70 und 330 mM). Auf hohe Phloemsaft-Konzentrationen von 1.2-1.4 M in *Cucurbita pepo* und *Coleus blumei* konnte aufgrund von Plasmolyse-Experimenten geschlossen werden (TURGEON und HEPLER 1989). Messungen von Aminosäure-Konzentrationen im Phloem und Cytosol der Mesophyllzellen von symplastischen Phloembeladern wurden bisher nicht veröffentlicht.

1.2.4 Einteilung in apoplastische oder symplastische Phloembelader

Aus den in den vorigen Abschnitten beschriebenen Beobachtungen ergeben sich im wesentlichen fünf Kriterien, nach denen bisher apoplastische von symplastischen Phloembeladern unterschieden werden können. Diese sind in folgender Übersicht zusammengefaßt.

Kriterium	Apoplastische Phloembelader	Symplastische Phloembelader
1. Phloemanatomie der „minor veins“	geschlossen (keine Plasmodesmata)	offen (viele Plasmodesmata)
2. Art der transportierten Zucker	Saccharose	Saccharose tw. Raffinose/Stachyose tw. Mannitol/Sorbitol
3. Konzentrationsgradienten zwischen Cytosol der Mesophyllzellen und Phloem	ja	nein
4. Saccharose-Transporter im SE-CC-Komplex	ja	nein
5. Hemmung der Phloembeladung durch PCMBS	ja	nein

1.2.5 Phloemanatomie von *Alonsoa meridionalis* und *Asarina barclaiana*

Als Modellpflanzen zur Untersuchung der symplastischen Phloembeladung wurden für diese Arbeit *Alonsoa meridionalis* und *Asarina barclaiana* ausgewählt. Diese beiden Scrophulariaceen haben sich als günstig erwiesen, da aus ihnen Phloemsaft mit der Laser-Aphiden-Technik gewonnen werden kann und sie in unterschiedlichem Umfang Raffinose-Oligosaccharide transportieren (KNOP 1998). Zudem sind in den beiden Pflanzenarten verschiedene Arten von Geleitzellen vorhanden. Abbildung 4 zeigt

die Phloemanatomie der "minor veins" dieser beiden Pflanzenarten. *Alonsoa meridionalis* enthält zwei Typen von Geleitzellen: Gewöhnliche Geleitzellen und Intermediärzellen. *Asarina barclaiana* besitzt dagegen zwei andere Geleitzell-Typen: Transferzellen und modifizierte Intermediärzellen (KNOP et al. 2001). Diese beiden Geleitzelltypen unterscheiden sich von denen in *Alonsoa* dadurch, daß sie Zellwandeinstülpungen besitzen, die die Oberfläche der Zelle und damit ihre Aufnahmekapazität vergrößern sollen. Identische Ergebnisse erhielten auch TURGEON et al. (1993) bei der Untersuchung anderer Arten der Gattungen *Alonsoa* und *Asarina*.

Die Nutzung von anderen Modellpflanzen wie *Cucurbita* oder *Coleus blumei* erschien wenig sinnvoll, da aus diesen Pflanzenarten bisher kein Phloensaft durch Aphiden gewonnen werden konnte.

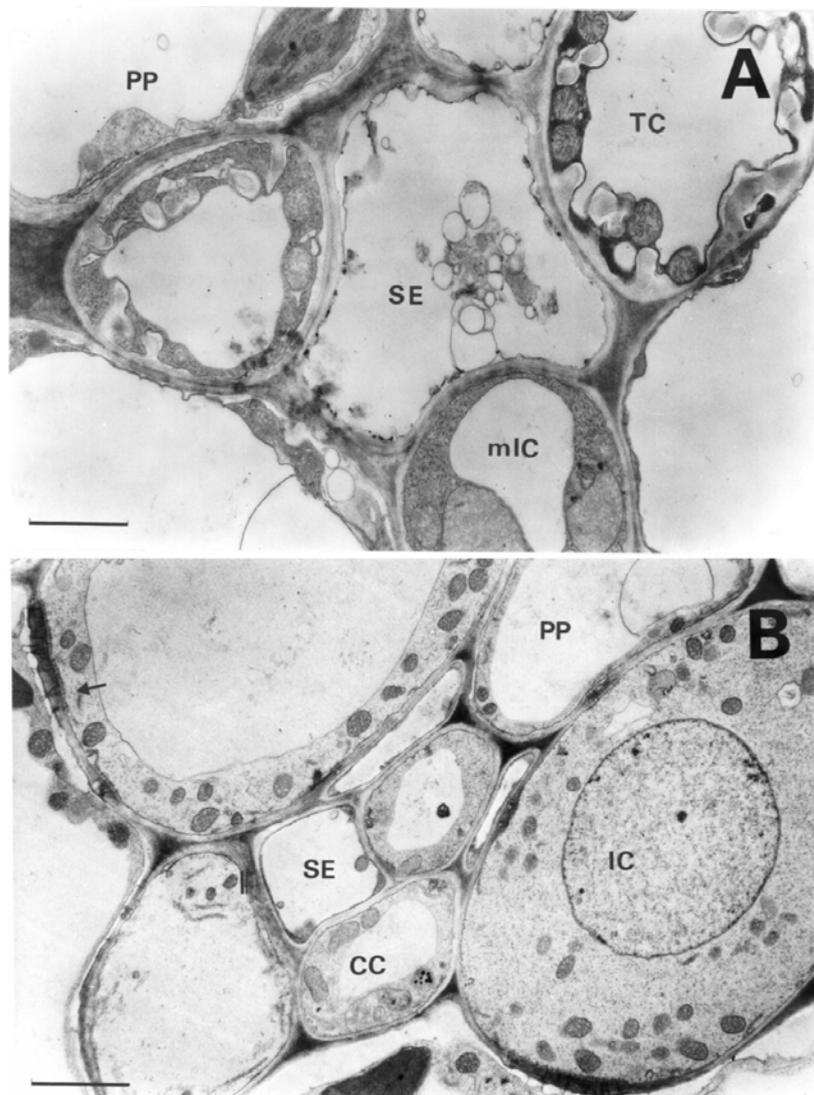


Abb. 4: Phloemanatomie von *Asarina barclaiana* (A) und *Alonsoa meridionalis* (B). CC gewöhnliche Geleitzelle; IC Intermediärzelle; mIC modifizierte Intermediärzelle; PP Phloemparenchymzelle; SE Siebelement; TC Transferzelle; Pfeile zeigen Plasmodesmata. Balken = 1.5 µm (A), 2.6 µm (B). (Aus KNOP et al. 2001).

1.3 Ferntransport und Phloementladung

Nachdem die Metabolite in die "minor veins" aufgenommen worden sind, werden sie zunächst zu den "major veins" (Blattadern 1.-3. Ordnung) transportiert. Aus der Mittelrippe des Blattes gelangen sie dann in den Stengel und schließlich zu den Sink-Organen, wie Wurzeln, Knollen, Samen oder Blüten. Da auch auf dem Transportweg eine hohe Konzentrationsdifferenz zwischen dem Phloem und den umgebenden Zellen besteht, wird vermutet, daß es hier zur "leakage", einem Austreten von Saccharose aus dem SE-CC-Komplex, kommt (KOMOR et al. 1996, VAN BEL 1996, ROTHE et al. 1999). Um den Konzentrationsgradienten aufrechtzuerhalten, wird die Saccharose von Saccharose-Transportern wieder zurück in das Phloem transportiert ("retrieval", GRIMM et al. 1990, 1997, WILLIAMS et al. 2000).

Ist die Saccharose in den Sink-Geweben angekommen, gibt es auch hier prinzipiell zwei Möglichkeiten der Phloementladung: die apoplastische und die symplastische Phloementladung (PATRICK 1990, 1997). Bei der symplastischen Phloementladung gelangt die Saccharose durch zahlreich vorhandene Plasmodesmata zu den Geweben des Verbrauchs oder der Speicherung. Im Gegensatz dazu wird bei der apoplastischen Phloementladung die Saccharose auf noch ungeklärtem Weg aus dem SE-CC-Komplex in den Apoplasten transportiert. Von dort aus kann sie zum einen direkt über Saccharose-Transporter in die Zellen aufgenommen werden, wo sie durch die Saccharose-Synthase in UDP-Glucose und Fructose gespalten wird. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, daß die Saccharose im Apoplasten durch eine Invertase in Glucose und Fructose gespalten und anschließend durch Hexose-Transporter in die Zielzellen aufgenommen wird (STURM und TANG 1999, BÜTTNER und SAUER 2000).

Die Entladung ist im Gegensatz zur Beladung des Phloems nicht spezifisch für unterschiedliche Pflanzenarten. Sie kann in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium oder dem Sink-Gewebe vom einen zum anderen Mechanismus wechseln. So zeigten VIOLA et al. (2001), daß es bei der Entwicklung von Kartoffelknollen zum Umschalten von apoplastischer zu symplastischer Phloementladung kommt. Die Entladung von Makromolekülen scheint in jungen Sink-Geweben in der Regel auf symplastischem Weg zu erfolgen (OPARKA und SANTA CRUZ 2000). IMLAU et al. (1999) exprimierten das "green fluorescent protein" (GFP, 27 kDa) unter Kontrolle des Geleitzell-spezifischen *AtSUC2*-Promotors. Das GFP wurde nicht nur von den Geleitzellen in die Siebelemente und anschließend durch das Phloem transportiert, sondern auch symplastisch in den Sink-Geweben entladen. Mit zunehmendem Alter ließ diese Fähigkeit jedoch in manchen Sink-Geweben nach. Dies korrelierte mit einer Änderung der Anatomie der in diesen Zellen vorhandenen Plasmodesmata. Nur einfache, aber nicht verzweigte Plasmodesmata ließen den Transport von GFP zu (OPARKA et al. 1999). Zudem sind vermutlich Myosin VIII und Calreticulin an der Modifikation der Öffnungsweite der Plasmodesmata und damit an der Regulation der Sink-Stärke beteiligt (BALUSKA et al. 2001).

1.4 Phloemtransport von Proteinen und Nukleinsäuren

Obwohl voll entwickelte Siebelemente keinen Zellkern und wahrscheinlich keine Ribosomen haben, ist schon lange bekannt, daß Phloemsaft eine große Anzahl unterschiedlicher Proteine enthält. Diese werden in den Geleitzellen synthetisiert und unspezifisch (IMLAU et al. 1999), aber auch spezifisch (BALACHANDRAN et al. 1997, RUIZ-MEDRANO et al. 2001) in die Siebelemente transportiert. Im Phloemsaft findet man weit mehr als 100 verschiedene Proteine (FISHER et al. 1992, SAKUTH et al. 1993). Die mengenmäßig bedeutendsten sind die P-Proteine (PP1 und PP2, SMITH et al. 1987, BOSTWICK et al. 1992, CLARK et al. 1997), die in den Siebelementen hochpolymerisierte Aggregate bilden, die sogar lichtmikroskopisch sichtbar sind. Durch Pfropfungsexperimente wurde gezeigt, daß diese entgegen früherer Lehrmeinung phloemmobil sind (GOLECKI et al. 1998, 1999). Inzwischen ist auch eine große Anzahl weiterer Phloemproteine charakterisiert (THOMPSON und SCHULZ 1999, HAYASHI et al. 2000, OPARKA und SANTA CRUZ 2000). So wurden u.a. Saccharose-Transporter, Thioredoxin, Glutaredoxin, Profilin und ein Proteinase-Inhibitor im Phloemsaft nachgewiesen (ISHIWATARI et al. 1995, KÜHN et al. 1997, SZEDERKÉNYI et al. 1997, SCHOBERT et al. 1998, 2000, KEHR et al. 1999). Ein klassisches Beispiel für die Nutzung des Phloems als Transportweg für Makromoleküle ist die Verbreitung verschiedener Pflanzenviren, wie des Gurken-Mosaik-Virus (CMV) oder Tabak-Mosaik-Virus (TMV) (BLACKMAN et al. 1998, OPARKA und SANTA CRUZ 2000). Ein weiteres Phloemprotein, CmPP16, ist ein Paralog zu den viralen Movement-Proteinen und bewirkt den Transport von pflanzlicher mRNA in das Phloem (XOCONOSTLE-CÁZARES et al. 1999).

Diese und weitere Untersuchungen zeigten in den letzten Jahren, daß Proteine nicht die einzigen Makromoleküle im Phloem sind. Auch mRNA wird in die Siebelemente transportiert. Welche Funktion sie dort hat, ist noch nicht eindeutig geklärt, da sie in den Siebelementen wegen des Fehlens von Ribosomen nicht translatiert werden kann. SASAKI et al. (1998) konnten in Phloemsaft, der mit Hilfe der Laser-Aphiden-Technik gewonnen wurde, die mRNA von Actin, Thioredoxin H und Oryzacystatin nachweisen. Insgesamt sollen mehr als 100 verschiedene mRNA-Spezies im Phloemsaft zu finden sein (RUIZ-MEDRANO et al. 1999, CITOVSKY und ZAMBRYSKI 2000). Es wird vermutet, daß RNA-Moleküle unter anderem als Signale für weit entfernte Pflanzenorgane dienen (JORGENSEN et al. 1998, RUIZ-MEDRANO et al. 1999, 2001). Kurze antisense-RNAs aus 25 Nukleotiden dienen der Pflanze als Signale, die im Rahmen des "post-transcriptional gene silencing" durch das Phloem transportiert werden (PALAUQUI et al. 1997, VOINNET et al. 1998, HAMILTON und BAULCOMBE 1999).

Es wird heute durch die zahlreichen Untersuchungen zum Transport von Proteinen und RNAs durch Plasmodesmata immer klarer, daß die Ausschlußgröße der Plasmodesmata nicht "starr" bei einem bestimmten Wert von ca. 1 kDa liegt, sondern daß ihre Ausschlußgröße sehr variabel sein kann und

spezifische Transportmechanismen vorhanden sind (JACKSON 2000, OPARKA und ROBERTS 2001).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte der Mechanismus der Phloembeladung in den Scrophulariaceen *Alonsoa meridionalis* und *Asarina barclaiana* charakterisiert werden. Diese Pflanzen besitzen eine offene Phloemanatomie und werden damit bisher den symplastischen Phloembeladern zugerechnet. Es sollte mit einer Reihe von biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen geklärt werden, ob es bei der Phloembeladung in diesen Pflanzen auch Hinweise gibt, die für einen apoplastischen Weg der Phloembeladung sprechen. Dabei ging es konkret um die Beantwortung folgender Fragen:

- Welche Zucker und Aminosäuren werden im Phloem transportiert, und wie hoch sind ihre Konzentrationen?
- Besitzen die untersuchten Pflanzen Saccharose-Transporter, die möglicherweise an der Phloembeladung beteiligt sind?
- Zeigen diese Transporter die gleichen Charakteristika (Substratspezifität, Inhibitor-Sensitivität) wie die bisher bekannten Saccharose-Transporter aus apoplastischen Phloembeladern?
- Wo sind die Saccharose-Transporter auf zellulärer und subzellulärer Ebene lokalisiert?

2. Material und Methoden

Für alle außer den biochemischen Methoden wurden nur sterilisierte Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet. Alle Lösungen wurden mit dd H₂O angesetzt und, wenn nicht anders beschrieben, entweder autoklaviert oder sterilfiltriert.

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial und Anzucht

Als Modellpflanzen mit vermutlich symplastischer Phloembeladung wurden zwei Mitglieder der Scrophulariaceae verwendet:

- *Alonsoa meridionalis* O.Kuntze
- *Asarina barclaiana* Pennell

Als transformierbare Modellpflanze zur Untersuchung von gewebespezifischer Promotoraktivität diente:

- *Arabidopsis thaliana* L. (Ökotyp Columbia)

Alonsoa meridionalis O.Kuntze, *Asarina barclaiana* Pennell und *Arabidopsis thaliana* L. wurden im Gewächshaus oder in Klimakammern bei einer Belichtungsstärke von 300-330 $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, einer Belichtungsdauer von 15 Stunden und einer Temperatur von 23°C Tag/18°C Nacht in Komposterde angezogen. Die Samen zur Anzucht aller drei Pflanzenarten wurden vom Botanischen Garten der Universität Göttingen bezogen.

Für Versuche, bei denen Pflanzen auf 10 mM Nitrat-Konzentration angezogen wurden, wurden Samen zunächst in Komposterde gepflanzt und nach Erreichen einer Höhe von ca. 10 cm in Hydrokultur umgesetzt.

10 mM Nitrat-Lösung: 4 mM KNO₃
 3 mM Ca(NO₃)₂
 2 mM MgCl₂
 1 mM MgSO₄
 0.6 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 7.2
 Na₂-Fe-EDTA und Spurenelemente in den von RANDALL und BOUMA (1973) beschriebenen Konzentrationen

Um Metabolit-Konzentrationen im diurnalen Verlauf zu bestimmen, wurden ausschließlich Pflanzen aus Klimakammern genutzt, da nur hier wirklich konstante Wachstumsparameter (Licht-/Dunkel-Wechsel von 15h/9h ($300\text{-}330 \mu\text{mol Photonen} * \text{m}^2 * \text{s}^{-1}$); paralleler Temperaturwechsel von $23^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$) eingehalten werden konnten. Die relative Luftfeuchte betrug ca. 60%. Alle Pflanzen wurden, wenn nicht anders beschrieben, im ausgewachsenen Zustand am frühen Nachmittag (5 h vor Ende der Lichtperiode) geerntet.

2.1.2 Bakterien- und Hefestämme

In dieser Arbeit wurden *Escherichia coli* Bakterien des Stammes DH5 α (WOODCOCK et al. 1989) verwendet:

Genotyp: F⁻ ($\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15}$) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17*(r_k⁻m_k⁺) *supE44 relA1 deoR* Δ (*lacZYA-argF*) U169

Zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* L. wurde der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 (pMP90) (KONCZ und SCHELL 1986) benutzt.

Zur Untersuchung von *in vivo*-Transportaktivitäten von pflanzlichen Saccharose-Transportern wurde der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm DBY 2617 (KAISER und BOTSTEIN 1986) verwendet.

Genotyp: Mata₁, *his4-539, lys2-801, ura3-52, suc2-438*

2.1.3 Plasmide

pGEM-T Easy	Amp ^r	Fa. Promega, Madison, USA
pBluescript II KS+	Amp ^r	Fa. Stratagene, La Jolla, USA
pNEV-E	Amp ^r ; URA3	SAUER und STOLZ (1994)
pCAT-GFP	Amp ^r	REICHEL et al. (1996)
pBI101.3	Km ^r	JEFFERSON et al. (1987)
pIB16.41	Km ^r ; BASTA ^{®r}	DRÖGE et al. (1992)

2.1.4 Oligonukleotide (Primer)

Name	Sequenz (5'→3')
Ab-for	TCCCTGTTGACACCATACGTTTCAGTTGC
Ab-rev	AACAACGAAAACAGCAATAGCCCTCGGC
AbCAB-f	GGGGATTTTGGGTTTGACCCACTCGGTC
AbCAB-r	TTGTTATGCCAGGGTCCGCCAAGTGAG
AbPmSUC-f	CCGGAATTCAAGCTTGTAAGAAATGGAGAACGGTGACCATAGAAGCTGCT CCG
AbPmSUC-r	CTTCAAAGGCAAATAAGTAAAATTATAGG
Am-for	AGCTGTCCCTGTTGACCCCATACGTTCC
Am-rev	GACGACGAAAACAGTAACAGCCCTCGG
AmCAB-f	GGGGACTTTGGGTTTGACCCCTTGGGC
AmCAB-r	TTGTTATGCCAGGGATCAGCCAAATGGTC
AmPmSUC-f	CCGGAATTCAAGCTTGTAAGAAATGGAGGTTGGCAATGAGGCCAAATCC
AmPmSUC-r	CCGTGGTTTGCGACACGACTACTACGGTGG
AmSpro5'	CCGGAATTCAAACTCACAAAAAACTCGTG
AmSpro3'	GGCGAATTCGCATGCTAGGGACGTCTGATGATCTTTGAGTGTGTGTATTG TG
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
CAB-for	GGIGA(CT)TT(CT)GGITT(CT)GA(CT)CC
CAB-rev	TT(GA)TT(GA)TGCCAIGG(GA)TC(ACGT)GC
dT ₂₀	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
GFP5'	CCGGACGTCCATGGGTAAAGGAGAAGAACTTTTCAC
GFP3'	GGCGCATGCGTCACTGGATTTTGGTTTTAGG
GUS5'	CCGGACGTCCATGTTACGTCTGTAGAAACCCC
GUS3'	GGCGCATGCGATCTAGTAACATAGATGACACCGC
MM3	CTCGAGGATCCGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT
MM4	CTCGAGGATCCGCGGCCGC
rev	AGCGGATAACAATTCACACAGGA
sut-for	GC(ACGT)GC(ACGT)GG(ACGT)(AG)T(ACGT)CA(AG)TT(CT)GG(ACGT)TGGGC
sut-rev	GC(ACGT)AC(AG)TC(ACGT)A(AG)(AGT)ATCCA(AG)AA(ACGT)CC
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

2.2 Extraktion von Pflanzengeweben

Um wasserlösliche Metabolite aus Blättern zu extrahieren, wurde die Chloroform-Methanol-Extraktion angewandt. Bezugsgröße für die Metabolitgehalte war die eingesetzte Menge an Frischgewicht.

2.2.1 Chloroform-Methanol-Extraktion von Blattgeweben

Die Blätter wurden am frühen Nachmittag nach 8-9 h Belichtung geerntet. Das Blattmaterial wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Extraktion darin aufbewahrt. Die Proben wurden unter flüssigem Stickstoff zermörsert und 100-200 mg des Pulvers zur weiteren Verwendung in ein Reagenzglas eingewogen. Zu diesem wurden 0.6 ml Puffer (20 mM HEPES/KOH pH 7.0) und 5 ml Chloroform:Methanol (1.5:3.5, v/v) gegeben. Die Proben wurden danach mehrmals kräftig geschüttelt und eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Die Extraktion erfolgte durch Ausschütteln mit 3 ml H₂O und anschließende Zentrifugation für 5 min bei 5000 Upm in einer Tischzentrifuge (Hettich EBA 35; Fa. Roth, Karlsruhe). Die hydrophile Oberphase wurde in einen Rundkolben überführt und die Unterphase nochmals mit 2 ml H₂O extrahiert. Die vereinigten Oberphasen wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 1 ml H₂O aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

2.3 Untersuchungen des Apoplasten

2.3.1 Extraktion von Apoplastensaft

Der Apoplastensaft wurde nach LOHAUS et al. (2001) gewonnen. Die Blätter wurden mit 100 mM MES-Puffer pH 5.5 infiltriert. Um Stoffwechsel- und Transportvorgänge während der Extraktionszeit von höchstens 5 min zu minimieren, betrug die Temperatur des Infiltrationspuffers 4°C. Die Infiltration erfolgte durch leichten Unterdruck in einer 50 ml Spritze. Wenn der gesamte Gasraum der Blätter mit Puffer gefüllt war, erschienen die Blätter kräftig dunkelgrün. Nach vorsichtigem Trocknen der Oberflächen wurden die Blätter in Reagenzröhrchen mit durchbohrtem Boden, unter dem ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß befestigt war, gegeben und bei 4°C und 1600-2300 Upm (je nach Konsistenz der Blätter) für 3 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0; Fa. Bodo Schmidt, Göttingen). Der verdünnte Apoplastensaft wurde durch die Zentrifugation aus dem Blatt gezogen und im Reaktionsgefäß aufgefangen. Als Marker für zelluläre Kontaminationen wurde die Aktivität der Malat-Dehydrogenase im Apoplastensaft bestimmt (KNOP 1998). Zur Berechnung der

Metabolitkonzentrationen im Apoplasten aus den Konzentrationen in der Auswaschlösung wurden folgende Verdünnungsfaktoren zugrunde gelegt (KNOP 1998):

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

Die gemessenen Verdünnungsfaktoren waren für *Asarina barclaiana* 5 und für *Alonsoa meridionalis* 7. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

2.4 Gewinnung von Phloemsaft

2.4.1 Aphidentechnik

Zur Gewinnung von Phloemsaft aus intakten Pflanzen wurde die Aphidentechnik (BARLOW und McCULLY 1972, FISHER und FRAME 1984, LOHAUS et al. 1995) verwendet, bei der die inserierten Stechrüssel der Blattläuse mit einem Laserblitz durchtrennt werden. Für die Versuche wurden Blattläuse der Art *Myzus persicae* (Sulzer) verwendet.

Die Blattläuse wurden mit einem weichen Pinsel von ihren Futterpflanzen in einen 1 cm² großen Plastikkäfig gepinselt. Dieser Käfig wurde an der Blattunterseite einer entsprechenden Versuchspflanze befestigt. Es wurden jeweils 10-20 Blattläuse pro Käfig verwendet. Nach ca. 2 h, einem Zeitraum, der sicherstellte, daß die Aphiden das Siebröhrensystem angebohrt hatten, wurde der Käfig entfernt. Das Blatt wurde mit der Unterseite nach unten in eine weich ausgekleidete, durch einen Mikromanipulator bewegliche Plastikhalterung eingespannt. Bei der Platzierung des Blattes war darauf zu achten, daß der Stechrüssel der Blattlaus genau auf das Okularstrichkreuz zentriert wurde. Zwischen Stechrüssel und Objektiv durften sich keine anderen Gliedmaßen der Blattlaus befinden. Um zu vermeiden, daß die Aphiden ihre Stechrüssel aus der angestochenen Siebröhre zogen, durften sie weder stark geblendet noch Vibrationen ausgesetzt werden.

Die Stechborste wurde durch einen Laserblitz, der durch das 40-fach Objektiv des Mikroskops geleitet wurde, vom Aphidenkörper getrennt. Der verwendete Laser war mit einem Neodym-Glasstab (LG 760, Länge 75 mm, Durchmesser 4 mm; Fa. Schott, Mainz) ausgestattet, dessen Wellenlänge 1.06 µm betrug. Die Ladespannung war variabel einstellbar und betrug für die verwendeten Blattläuse 1200-1300 Volt. Die Ausgangsenergie des Laserblitzes war 1 Joule, wobei die Pulsauslösung manuell mit einer Dauer von 150 µsec erfolgte.

Durch den Laserstrahl schmolz die Chitummantelung und die Stechborste wurde durchtrennt, so daß ihr unterer Teil im Siebröhrensystem verblieb. Der Aphidenkörper wurde mit einem Pinsel entfernt und getötet. Der aus der Stechborste austretende Phloemsaft wurde unmittelbar danach mit einer 0.5 µl

Mikrokapillare (Fa. Hilgenberg, Malsfeld) aufgefangen. Die Mikrokapillare wurde so plziert, daß ihre Oberkante plan mit dem Blatt abschloß. Der untere Teil der Kapillare wurde von einer mit einem Mikromanipulator beweglichen Plastikhalterung umschlossen. Ohne das Blatt zu bewegen wurden die restlichen Blattläuse mit einem Pinsel vom Blatt entfernt, da Honigtautropfen der Blattläuse zu Verunreinigungen der Mikrokapillare hätten führen können.

Die Gewinnung des Siebrohrensafts erfolgte in einem klimatisierten Raum bei mindestens 75-85% relativer Luftfeuchte, um mögliche Verdunstungsverluste und damit Konzentrierungen des Phloemsafts zu vermeiden. Die Pflanzen wurden während der Lichtperiode (15h/9h) mit einer 400 W Hg-Hochdruck-Dampflampe beleuchtet. Teilweise war es möglich, aus einer einzelnen Stechborste über mehrere Stunden und Tage Phloemsaft zu gewinnen. In diesem Fall wurden in regelmäßigen Abständen neue Mikrokapillaren auf den Stechrüssel gesetzt.

2.5 Metabolit-Messungen

2.5.1 Chromatographische Bestimmung von Zuckern

Die chromatographische Bestimmung von Zuckern in Blattextrakten, Apoplastensaftproben und Phloemsaftproben erfolgte über ein HPLC-System mit Puls-Amperometrischer Detektion. Die Zucker wurden über eine Anionenaustauscher-Säule (CarboPac PA10; Fa. Dionex, Idstein) mit zugehöriger Vorsäule (CarboPac PA10 Guard; Fa. Dionex) aufgetrennt und isokratisch mit 30 mM NaOH eluiert. Die Flußrate (1 ml/min) und die Elutionsdauer (30 min pro Lauf) wurden über eine Pumpe (LC-9A; Fa. 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; Fa. LKB Pharmacia, Gräfelfing) zur Verfügung. Die elektrochemische Detektion erfolgte über eine Dünnschicht-Amperometrische Zelle (#5040; Fa. ESA, Bedford, USA) mit einer Goldelektrode. Ein Amperometer (Coulochem II; Fa. ESA) 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 μM .

Die Linearität der Eichgeraden war in diesem Bereich gegeben. Nach einer Filtration durch 0.2 µm Cellulosenitrat-Filter (Fa. Schleicher & Schüll, Dassel) konnten Blattextrakt-, Apoplastensaft- und Phloemsaftproben gemessen werden. Bei einer Kühlung des Autosamplers auf 10°C waren die Proben für 24 h stabil. Die Daten wurden kontinuierlich gespeichert und mit Hilfe des Integrationsprogramms PeakNet 5.0 (Fa. Dionex) ausgewertet.

2.5.2 Chromatographische Bestimmung von Aminosäuren

Aminosäuren wurden chromatographisch durch HPLC qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Die Aminosäuren wurden dazu in einer Vorsäulen-Derivatisierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) und β-Mercaptoethanol bei 15°C zu fluorophoren apolaren Indolderivaten umgesetzt. Die Derivatisierung der Aminosäuren mit einem Fluoreszenzfarbstoff setzte die Nachweisgrenze um das 20-fache gegenüber der herkömmlichen Ninhydrin-Derivatisierung herab. Iminosäuren ließen sich mit dieser Methode nicht nachweisen.

Derivatisierungsreagenzien:

OPA-Stock:	16 mM	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
	88 % (v/v)	Methanol
	0.1 M	K-Borat pH 10.4
	1.1 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
Arbeitslösung:	0.5 ml	OPA-Stock
	1 ml	1 M K-Borat pH 10.4

OPA-Stock und K-Borat wurden bis zu 5 Tage lichtgeschützt aufbewahrt. Der Arbeitslösung wurden 5 µl β-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; Fa. LKB Pharmacia) vereinheitlicht und die Säulentemperatur (35°C) konstant gehalten (Säulenofen 2155; Fa. LKB Pharmacia). 20µl Arbeitslösung und 20 µl Probe wurden gemischt und 1 min derivatisiert. Davon wurden 20 µl auf eine Reversed Phase Säule (LiChro Cart 125-4, Superspher 100RP 18 endcapped; Fa. Merck, Darmstadt) aufgetragen. Das Säulenmaterial bestand aus Octadecylsilicat. Um Verunreinigungen der Säule zu verhindern, wurde eine Vorsäule (Superpac ODS2; Fa. LKB Pharmacia) 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; Fa. LKB Pharmacia) und eine Pumpe (HPLC-Pumpe 2248; Fa. LKB Pharmacia) erzeugt. Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad.

Elutionslösungen:

Stockpuffer: 18 mM Natriumphosphat pH 7.1
1.71 mM EDTA

- A: 95 % Stockpuffer
5 % Acetonitril
B: 50 % Stockpuffer
50 % Acetonitril
C: 70 % Acetonitril in Wasser

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

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 500-1000 nA im kontinuierlichen Fluß gemessen (Fluoreszenzdetektor 2144; Fa. LKB Pharmacia). 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-reinem Wasser 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; Fa. Sigma, Deisenhofen) wurden die entsprechenden Konzentrationen an Glutamin, Asparagin, Tryptophan und γ -Aminobuttersäure (GABA) zugesetzt, sowie α -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 Cellulosenitrat-Filter (Fa. Schleicher & Schüll) gefiltert und mit HPLC-reinem Wasser entsprechend verdünnt. Alle Standardgemische und Proben wurden mit 5% (v/v) 1 M K-Borat pH 10.4 gepuffert.

Die Pumpe, der Autosampler und die Meßsequenz wurden von einem Computerprogramm (HPLC-Manager; Fa. LKB Pharmacia) gesteuert und die Daten des Fluoreszenzdetektors kontinuierlich gespeichert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einem Integrationsprogramm (PeakNet 5.0; Fa. Dionex).

2.6 Methoden zur Isolierung von Proteinen

2.6.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus Pflanzen

Es wurden ca. 50 g Blattmaterial geerntet und mit H_2O gewaschen. Alle weiteren Präparationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nachdem die Blätter mit einer Rasierklinge zerkleinert worden waren, wurden sie im "Waring Blendor" dreimal für 15 sec mit 200 ml halbgefrorenem Homogenisationspuffer aufgebrochen.

Anschließend wurde das Homogenat durch zwei Lagen Mull und eine Lage Miracloth filtriert. Große Zellbruchstücke wurden 20 min bei 13000 g abzentrifugiert (Sorvall RC-5B, Rotor SS34; Fa. Kendro, Newtown, USA). Der Überstand enthielt sowohl das lösliche wie auch das membrangebundene Blattprotein. Die Lösung konnte, falls es der weitere Versuchsverlauf erforderte, noch mittels Ultrafiltration (Centricon YM30; Fa. Millipore, Eschborn) aufkonzentriert werden; zudem bestand die Möglichkeit, aus dem Überstand die mikrosomale Fraktion zu isolieren, aus der wiederum Plasmamembranen angereichert werden konnten.

Homogenisationspuffer:	HEPES/KOH pH 7.0	50 mM
	EDTA	5 mM
	Saccharose	330 mM
	BSA (entfettet)	0.2 % (w/v)
	Casein (enz. Hydrolysat)	0.2 % (w/v)
	PVPP	0.2 % (w/v)
	Ascorbat*	5 mM
	DTT*	5 mM
	Benzamidin*	2 mM
	ϵ -Amino-Caprone* [*]	2 mM
	Phenazinmethosulfat*	0.5 mM

*Diese Substanzen wurden dem Puffer frisch zugesetzt

2.6.2 Isolierung von Membranproteinen aus Pflanzen

Aus dem Überstand der Gesamtproteinisolierung (2.6.1) konnte zunächst durch eine Ultrazentrifugation die Gesamtheit der Membranen, die sogenannte mikrosomale Fraktion gewonnen werden. Dazu wurde der Überstand für 1 h bei 100000 g zentrifugiert (Centrikon T-1065, Rotor SW28; Fa. Kendro). Das Sediment enthielt die Mikrosomen und diente als Ausgangsmaterial zur Plasmamembranpräparation.

Dazu wurde das Sediment in 5 ml PSK-Puffer aufgenommen und in einem Glaspotter homogenisiert. Die anschließende Präparation erfolgte in einem Zwei-Phasen-System (ROBINSON und HINZ 2001), wobei sich die verschiedenen Organellenmembranen unterschiedlich zwischen einer oberen PEG-Phase und einer unteren Dextran-Phase verteilen. Plasmamembranen reichern sich in der oberen PEG-Phase an.

Zunächst wurde ein großes Volumen an Zwei-Phasen-Mischung hergestellt. Dazu wurden 75.6 g Dextran 500-Lösung, 37.8 g PEG 3350-Lösung, 60 g PSK-Puffer und 66.6 g H₂O in einen Scheidetrichter gegeben und kräftig geschüttelt. Bei Lagerung über Nacht bei 4°C stellte sich eine klare Phasentrennung ein. Die untere Dextran- und die obere PEG-Phase wurden getrennt und bei 4°C gelagert.

Als nächster Schritt erfolgte die Herstellung eines kleinen Volumens von Zwei-Phasen-Mischung in einem SS34-Röhrchen durch Mischen von 7.5 g Dextran 500-Lösung, 3.78 g PEG 3350-Lösung, 4.75 g PSK-Puffer und 2.91 g H₂O. Auf dieses kleine Zwei-Phasen-System wurden 5 g der mikrosomalen Fraktion gegeben, das Röhrchen mit Parafilm verschlossen und kräftig geschüttelt. Durch eine Zentrifugation für 5 min bei 1500 g in einem "swing out"-Rotor (Sorvall RC-5B, Rotor HB6) bildeten

sich zwei Phasen. Die plasmamembranhaltige obere Phase wurde abgenommen und mit frischer unterer Phase aus der großen Zwei-Phasen-Mischung versetzt, so daß sich ein Gesamtgewicht von 24 g ergab. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Am Schluß lag eine obere PEG/Plasmamembran-Phase vor, die dreimal mit unterer Dextran-Phase gewaschen worden war. Diese PEG/Plasmamembran-Phase wurde mit Waschpuffer auf 75 ml aufgefüllt. Durch Zentrifugation für 1 h bei 100000 g (Centrikon T-1065, Rotor SW28) wurden die Plasmamembranen pelletiert, in 1 ml Waschpuffer aufgenommen und in einem Glaspotter homogenisiert. Die in den Plasmamembranen enthaltenen Proteine wurden nun durch ein geeignetes Detergens (in diesem Versuch DDM) solubilisiert und standen so für weiterführende Untersuchungen (Western-Blot, 2.15.2) zur Verfügung.

PSK-Puffer:	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ pH 7.8	20 mM
	Saccharose	1 M
	KCl	8 mM
Dextran 500-Lösung:	Dextran 500	20 % (w/w)
PEG 3350-Lösung:	PEG 3350	40 % (w/w)
Waschpuffer:	Tris/HCl pH 7.5	50 mM
	Saccharose	250 mM
	EDTA	1 mM
DDM-Stammlsg.:	20% n-Dodecylmaltosid in Puffer 0 (siehe 2.6.3)	

2.6.3 Isolierung von Membranproteinen aus Hefe

Um die Expression von Saccharose-Transportproteinen aus *Asarina barclaiana* und *Alonsoa meridionalis* in Hefe nachzuweisen, wurden die mit sense- bzw. antisense-Konstrukten der Transporter transformierten Hefen neben der Messung von ¹⁴C-Saccharose-Aufnahme auch auf das Vorhandensein der Transportproteine in ihrer Plasmamembran immunologisch untersucht.

Hierzu wurden 250 ml CAAG-Medium mit der entsprechenden Hefekultur angeimpft und bis zur stationären Phase (OD₆₀₀ ≥ 6) bei 29°C wachsen gelassen. Alle Isolierungsschritte erfolgten bei 4°C. Die Hefe-Suspension wurde durch eine Zentrifugation für 10 min bei 1000 g (Sorvall RC-5B, Rotor GS3) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 40 ml H₂O resuspendiert. Nach Überführung in 50 ml Falcon-Tubes wurde nun bei 1600 Upm für 10 min in der Megafuge 1.0 (Fa. Heraeus) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml Aufschlußpuffer gelöst und wiederum bei 1600 Upm

für 10 min zentrifugiert. Das nun entstandene Pellet wurde mit Aufschlußpuffer auf 5 ml aufgefüllt und zum Aufbrechen der Zellen ca. 3 g Glasperlen (\varnothing 0.5 mm) und 5 μ l PIM-Mix zugegeben. Durch viermaliges Vortexen für 30 sec wurden die Hefe-Zellen aufgebrochen. Das Zellhomogenat über dem Glasperlensediment wurde in 1.5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und die Glasperlen nochmals mit 1 ml Aufschlußpuffer nachgewaschen. Die vereinigten Zellhomogenate wurden nun für 5 min bei 3000 Upm zentrifugiert, damit große Zellbruchstücke und Organellen pelletierten. Der Überstand wurde danach für 1 h bei 100000 g zentrifugiert (Centrikon T-1065, Rotor TFT65.13). Die dadurch pelletierten Membranen wurden in 420 μ l Puffer 0 resuspendiert und die darin enthaltenen Proteine durch Zugabe von 60 μ l DDM-Stammlösung sowie 4 μ l PIM-Mix solubilisiert. Die so erhaltenen Membranproteine wurden im Western-Blot untersucht.

CAAG-Medium: 1% Casaminoacids (w/v)
 0.67% Yeast Nitrogen Base (w/v)
 2% Glucose (w/v)

Aufschlußpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 7.5
 5 mM EDTA

DDM-Stammlsg.: 20% n-Dodecylmaltosid in Puffer 0

Puffer 0: 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 8.0
 50 mM NaCl

PIM-Mix: 100 mM PMSF (in Isopropanol)
 250 mM Benzamidin (in H₂O)
 1 mg/ml Pepstatin (in Methanol)
 1 mg/ml Leupeptin (in H₂O)
 zu gleichen Teilen mischen, 4 μ l zur Probe geben

Arbeitskonzentrationen von Protease-Inhibitoren:

PMSF	1-10 μ M
Benzamidin	1 mM
Pepstatin	1 μ g/ml
Leupeptin	1 μ g/ml
EDTA	5 mM

2.7 Quantitative Proteinbestimmung

2.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Gehalts an löslichem Protein erfolgte nach BRADFORD (1976). 50 µl der Probe, die zwischen 5 und 10 µg Protein enthalten sollte, wurde mit 1 ml Farbmix versetzt. Nach 5 min wurde am Photometer (Uvikon 932; Fa. Kontron, Mailand, Italien) die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Nullwert diente eine Probe mit 50 µl Probenpuffer, die in gleicher Weise behandelt worden war. Zur Kalibrierung wurde eine Eichreihe aus entfettetem BSA hergestellt und anstelle der Probe eingesetzt. Diese Eichreihe war über längere Zeit stabil.

Farbmix:	600 ml	H ₂ O
	100 ml	85% H ₃ PO ₄
	70 mg/50 ml abs. EtOH	Coomassie Brilliant Blue G-250
	ad 1000 ml	H ₂ O

2.7.2 Proteinbestimmung nach Peterson

Zur Quantifizierung von Membranproteinen wurde die Proteinbestimmung nach PETERSON (1977) durchgeführt. Hierbei werden die Proteine zunächst in Desoxycholat solubilisiert, mit Trichloressigsäure ausgefällt, anschließend vom Medium abgetrennt und wieder in SDS gelöst. Die Proben, die einen Proteingehalt von 1-20 µg haben sollten, wurden auf 1 ml mit H₂O aufgefüllt. Danach wurden je 100 µl Desoxycholat und Trichloressigsäure hinzugegeben. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min wurden die ausgefallenen Proteine für 15 min bei 13000 Upm pelletiert. Die Überstände wurden quantitativ entfernt. Die Sedimente wurden dann in 480 µl H₂O und 500 µl Reagenz A gelöst. Nach einer Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurde 250 µl Folinreagenz zugegeben und für weitere 40 min inkubiert. Die Extinktion wurde am Photometer (Uvikon 932; Fa. Kontron) bei 578 nm gemessen. Die Eichung erfolgte durch BSA-Standards von 2-20 µg, die in gleicher Weise behandelt worden waren.

Natriumdesoxycholat	0.15 % (w/v)
Trichloressigsäure	72 % (w/v)
BSA (entfettet)	0.3 mg/ml

Folin-Ciocalteus-Reagenz 1:6 in H₂O

Reagenz A: Mischung aus den Lösungen 1, 2, 3 und 4 in gleichen Volumenanteilen

1. Kupfer-Tartrat-Carbonat-Mischung	
Na ₂ CO ₃	10 % (w/v)
Kupfersulfat	0.1 % (w/v)
Kalium-Natrium-Tartrat	0.2 % (w/v)
2. SDS	10 % (w/v)
3. NaOH	0.8 N
4. H ₂ O	

2.8 Methoden zur Präparation von Nukleinsäuren

2.8.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von RNA aus verschiedenen Pflanzenarten und -teilen wurden unterschiedliche Isolierungsmethoden angewandt, da aufgrund unterschiedlicher Gehalte an Sekundärmetaboliten, Stärke und Zellwandbestandteilen (z.B. in Blüten) nicht jede Methode erfolgreich durchzuführen war.

2.8.1.1 GHC-Methode

Zur Isolierung von RNA wurde die Methode von LOGEMANN et al. (1987) modifiziert. Es wurden ca. 500 mg Blattmaterial unter Zugabe von 0.8 ml GHC-Puffer und 10 µl β-Mercaptoethanol in flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach dem Auftauen der Probe wurde sie in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 1 Vol. Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:25:1, v/v/v) ausgeschüttelt. Dann wurde 5 min zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen, mit 1/20 Vol. 1 M Essigsäure und 0.7 Vol. abs. Ethanol (99.6%) versetzt und gut gemischt. Die RNA wurde anschließend für mindestens 1 h bei -80°C gefällt.

Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation, um die RNA zu sedimentieren. Das Pellet wurde mit 150 µl 3 M Natriumacetat pH 5.0 versetzt und resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min. Das Sediment wurde mit 150 µl 70% Ethanol gewaschen und für 5 min bei 37°C in einem Heizblock getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die RNA in 50-100 µl Wasser bei 65°C für 5 min gelöst. Abschließend erfolgte noch einmal eine Zentrifugation für 5 min, in der die Polysaccharide

sedimentierten. Der Überstand wurde abgenommen und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.8.6).

GHC-Puffer: 8 M Guanidiniumhydrochlorid
20 mM MES pH 7.0
20 mM EDTA

Herstellung von Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:25:1, v/v/v):

100 g Phenol wurden in 100 ml Tris-Puffer (100 mM pH 8.0) für ca. 15 min gerührt. Anschließend wurde die Phenolphase von der Wasserphase in einem Scheidetrichter getrennt. Danach wurde die Phenolphase so oft mit Tris-Puffer ausgeschüttelt, bis diese einen pH-Wert von 8 erreicht hatte. Die untere, sich abscheidende Phenolphase wurde für die Herstellung des Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemischs (25:25:1, v/v/v) verwendet.

2.8.1.2 „PEQLAB“-Methode

100-200 mg Pflanzenmaterial wurden in flüssigem N₂ zu feinem Pulver gemörsert. Dieses wurde in ein vorgekühltes 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 ml RNAPure (Fa. Peqlab, Erlangen) zugegeben. Die Proben wurden kräftig geschüttelt und für 5-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 Upm. Der wässrige Überstand wurde in ein neues 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 200 µl Chloroform zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde wieder für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation wurde die wässrige Oberphase wiederum in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 0.6 Vol. Isopropanol für 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Die RNA wurde dann durch eine Zentrifugation für 10 min pelletiert.

Das Pellet wurde anschließend zweimal mit 75% kaltem Ethanol gewaschen und abschließend bei 37°C getrocknet. Die RNA-Probe konnte nun in einem geeigneten Volumen H₂O (i.d.R. 50 µl) resuspendiert werden. Zur besseren Löslichkeit trug eine Inkubation bei 65°C für 5 min bei. Die Qualität und Menge an RNA wurde durch Auftrennung in einem TEA-Agarosegel und photometrische Bestimmung (2.8.6) abgeschätzt.

2.8.1.3 RNA-Isolierung mit verschiedenen kommerziellen Kits

Für Gewebe, aus denen mit den oben genannten Methoden keine RNA gewonnen werden konnte, wurden RNA-Isolierungskits verschiedener Hersteller benutzt. Diese waren im Einzelnen:

Invisorb Spin Plant-RNA Mini Kit	Fa. Invitex, Berlin
RNeasy Plant Mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden
Purescript RNA Isolation Kit	Fa. Biozym, Hess. Oldendorf

Es wurde jeweils nach den vom Hersteller empfohlenen Isolierungsschritten vorgegangen.

2.8.1.4 mRNA-Isolierung

Für manche Anwendungen, wie z.B. RACE oder RT-PCR mit degenerierten Primern, war es sinnvoll, die mRNA von der rRNA und tRNA zu separieren, da die mRNA nur einen sehr geringen Teil der Gesamt-RNA ausmacht. Bei der RT-PCR mit degenerierten Primern ist die Gefahr unspezifischer Amplifikation besonders groß, da potentielle Primerbindungsstellen durch die Vielfalt an existierenden Primervarianten und -kombinationen relativ stark über die gesamte RNA-Population verteilt sein können.

Zur Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA wurden Metallkügelchen ("Dynabeads"; Fa. Dynal, Hamburg) benutzt, an die kurze oligo-dT-Sequenzen (25 Nukleotide) gebunden waren. An diese kurzen Sequenzen konnten die mRNAs über ihren poly-A-Schwanz selektiv binden.

Ca. 80 µg Gesamt-RNA wurden mit Lösung F auf 100 µl aufgefüllt und 2 min auf 65°C erhitzt. 100 µl resuspendierte Dynabeads wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 30 sec in den dazugehörigen Magneten gestellt und daraufhin der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Dynabeads zweimal mit 100 µl Lösung B gewaschen und dann in 100 µl Lösung B resuspendiert. Nun wurde die RNA zugegeben (d.h. 200 µl Gesamtvolumen), das Reaktionsgefäß kurz geschwenkt und für 3-5 min bei Raumtemperatur im Roller inkubiert. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde nun wieder für 30 sec in den Magneten gestellt und der Überstand entfernt. Daraufhin wurden die Dynabeads mit der gebundenen mRNA zweimal mit 200 µl Lösung E gewaschen. Die Elution der mRNA erfolgte in zwei Schritten mit 20 (12 + 8) µl Lösung F, wobei nach Zugabe der Lösung F jeweils für 2 min bei 65°C inkubiert und dann der mRNA-haltige Überstand abgenommen wurde.

Die Dynabeads konnten für weitere Isolierungen regeneriert werden. Dazu wurden zu 200 µl benutzter Dynabeads 200 µl Lösung G gegeben und für 2 min bei 65°C inkubiert. Nachdem der Überstand im Magneten entfernt worden war, wurden die Dynabeads noch zweimal mit 200 µl Lösung G gewaschen. Danach folgten vier Waschschrte mit Lösung H, so daß der pH-Wert wieder ≤ 8.0 war.

Zum Abschluß wurden die Dynabeads im gewünschten Vol. Lösung H (i.d.R. 200 µl) aufgenommen und bei 4°C gelagert. Dynabeads können bis zu fünfmal verwendet werden.

Lösung B (2x binding buffer):

20 mM Tris/HCl pH 7.5
1 M LiCl
2 mM EDTA

Lösung E (washing buffer):

10 mM Tris/HCl pH 8.0
0.15 M LiCl
1 mM EDTA

Lösung F (elution solution):

10 mM Tris/HCl pH 7.5

Lösung G (reconditioning solution):

0.1 M NaOH

Lösung H (storage buffer):

250 mM Tris/HCl pH 8.0
20 mM EDTA
0.1% Tween 20
0.02% Natriumazid

2.8.2 Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen

2.8.2.1 Isolierung großer DNA-Mengen

Für die Isolierung großer, hochreiner und intakter genomischer DNA aus Pflanzen wurde der DNeasy Plant Maxi Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Mit diesem war es möglich, aus 1 g sehr jungem Blattmaterial

ca. 50-80 µg genomische DNA zu gewinnen. Als Ausgangsmaterial diente junges Gewebe, da dort der Grad an Polyphenolen, Stärke und anderen mit der Isolierung interferierenden Substanzen sehr gering war. Auf diese Weise isolierte DNA konnte für die Herstellung von "Genome Walker Libraries" (2.10.3.1) verwendet werden.

2.8.2.2 Isolierung von DNA zum Pflanzen-Screening

Zur Identifizierung transgener Pflanzen gibt es neben der Möglichkeit auf einen Marker (z.B. Antibiotika-Resistenz, Herbizid-Resistenz) hin zu selektieren auch die Möglichkeit, das eingebaute Transgen im Genom der Pflanze nachzuweisen. Dies kann durch einen DNA-Gel-Blot oder einfacher und schneller durch PCR erfolgen. Dazu muß genomische DNA der zu untersuchenden Pflanze isoliert werden.

Für die nachfolgend beschriebene Methode genügten ca. 0.1-0.5 cm² Blattmaterial, so daß Pflanzen schon in einem sehr jungen Stadium gescreent werden konnten. Zunächst wurde das Blattmaterial geerntet und in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Unter Zugabe von etwas Seesand wurde die Probe mit einem Mikropistill (Fa. Schütt, Göttingen) fein zermahlen. Nun wurden 200 µl CTAB-Puffer zugesetzt und weiter gut durchmischt. Es folgte eine Inkubation bei 65°C für 0.5-2 h. Danach wurden 200 µl Chloroform zugegeben und vorsichtig gevortext. Nach einer kurzen Zentrifugation zur Phasentrennung (2 min) wurde die wässrige Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 600 µl abs. Ethanol für 20 min bei -20°C gefällt. Während einer Zentrifugation für 15 min pelletierte die DNA, welche dann mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen wurde. Nach dem Trocknen der DNA für 15 min bei 37°C wurde sie ebenfalls bei 37°C in 50 µl RNase-H₂O gelöst und bei -20°C gelagert.

CTAB-Puffer:	2%	CTAB (w/v)
	100 mM	Tris/HCl pH 8.0
	20 mM	EDTA
	1.4 M	NaCl
	1%	PVP 4000 (w/v)

RNase-H₂O: 1 µl 10 mg/ml RNase A auf 50 µl auffüllen

2.8.3 Isolierung von Plasmid-DNA

2.8.3.1 Mini-Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Von potentiell positiven Kolonien (z.B. bei Plasmiden mit Blau/weiß-Selektion weiße Kolonien) auf den Transformations-Platten wurden einige mit sterilen Zahnstochern gepickt und in Reagenzgläser mit 3 ml LB-Flüssigmedium und dem geeigneten Antibiotikum überführt. Diese wurden über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nachdem die Bakterienkulturen gewachsen waren, wurden sie auf zwei 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und jeweils eine der Doppelproben bei -20°C eingefroren. Die Pellets der nicht eingefrorenen Proben wurden in 150 µl STEL-Puffer resuspendiert und 30 sec bei 100°C inkubiert. Dadurch erfolgte eine Lyse der Bakterienzellen („Triton boiling“). Anschließend wurde wieder für 20 min zentrifugiert. Nachdem das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt worden war, wurde zum Überstand 180 µl Isopropanol gegeben und gut gemischt.

Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Es folgte nun eine letzte Zentrifugation für 5 min. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet für 5 min bei 37°C getrocknet. Danach wurde es in 50 µl RNase-H₂O (2.8.2.2) gelöst (15 min bei 37°C).

LB-Flüssigmedium: 10 g/l Select Pepton 140
 5 g/l Hefe Extrakt
 10 g/l NaCl
 mit NaOH auf pH 7.5 einstellen
 für Agar-Platten 1.5% (w/v) Select-Agar vor dem Autoklavieren zugeben

		<u>Stamm-Lsg.</u>	<u>End-Konzentration</u>
Antibiotika:	Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml (1:1000)
	Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml (1:1000)

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

Zusätzlich erfolgte eine Mini-Plasmid-Präparation der b-Probe mit einem „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ (Fa. Qiagen), falls sich durch die Restriktionsanalyse (2.11.7) herausstellte, daß ein Klon

sequenziert werden sollte. Der Kit basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen, gefolgt von einer Bindung der DNA an Kieselgel in Anwesenheit hoher Salz-Konzentrationen. Die DNA wurde für die Sequenzierung mit 50 µl H₂O von der Säule eluiert.

2.8.3.2 Midi-Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Es wurde zunächst eine 15 ml Kultur eines positiven Klons in TB-Medium (2.8.3.3) mit geeignetem Antibiotikum (2.8.3.1) angesetzt und für 6-10 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Kultur in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und 20 min bei 4300 Upm und 4°C (Megafuge 1.0) zentrifugiert. Anschließend wurden die Plasmide entsprechend den Angaben des Herstellers aus dem Bakterienpellet mit dem „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II“ (Fa. Peqlab) isoliert. Die Ausbeute lag bei bis zu 50 µg Plasmid-DNA.

2.8.3.3 Maxi-Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Die Maxi-Plasmid-Präparation diente der Gewinnung großer Mengen an Plasmid-DNA. Zudem war die isolierte DNA nicht so verunreinigt wie die durch Mini-Plasmid-Präparation erhaltene.

Zunächst wurde eine 50 ml Kultur eines positiven Klons in TB-Medium mit geeignetem Antibiotikum (2.8.3.1) angesetzt und für 6-10 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Kultur in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und 20 min bei 4300 Upm und 4°C (Megafuge 1.0) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 5 ml 25 mM Tris/HCl pH 8.0 resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 ml 0.2 M NaOH / 1% (w/v) SDS zugegeben und weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß an die Zugabe von 7.5 ml 3 M K-Acetat pH 4.8 erfolgte eine dritte Inkubation auf Eis.

Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 4300 Upm wurde der Überstand durch 2 Lagen Miracloth in SS34-Röhrchen gefiltert und 10 ml Isopropanol zugegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10000 Upm und 4°C in einer Sorvall RC-5B Zentrifuge (Rotor SS34). Der Überstand wurde abgegossen und das Sediment für 5 min getrocknet. Das Pellet wurde in 2 ml H₂O aufgenommen und 2 ml 5 M LiCl / 50 mM Tris/HCl pH 8.0 zugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde wieder 10 min bei 10000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische SS34-Röhrchen pipettiert, 10 ml abs. Ethanol zugegeben und für 1 h bei -20°C gefällt.

Um die DNA zu pelletieren, wurde für 20 min bei 12000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das getrocknete Pellet in 600 µl Wasser resuspendiert. Die Röhrchen wurden noch einmal kurz anzentrifugiert und die Suspension in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Diese wässrige Lösung wurde einmal mit 600 µl Phenol und dann mit 600 µl Phenol:Chloroform (1:1, v/v)

extrahiert, indem die Mischungen 5 min bei 13000 Upm in der Eppendorffzentrifuge zur Phasentrennung zentrifugiert wurden. Die obere, wässrige Phase wurde weiterverwendet. Dazu wurden 5 µl 2.5 mg/ml RNase A hinzugefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgten vier weitere Extraktionen, zweimal mit 500 µl Phenol:Chloroform (1:1, v/v) und zweimal mit 500 µl Chloroform. Zur verbleibenden wässrigen Oberphase wurden 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat pH 6.0 und 2.5 Vol. abs. Ethanol gegeben und die DNA für 1 h bei -20°C gefällt.

Nach einer Zentrifugation für 10 min wurde das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und wieder für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurde das Pellet kurz getrocknet (5 min bei 37°C) und in 200 µl H₂O resuspendiert (15 min bei 37°C). Die Ausbeute betrug bis zu 1 mg Plasmid-DNA.

TB-Medium: TB-Medium 1 + TB-Medium 2 im Verhältnis 9:1

TB-Medium 1:	12 g	Select Pepton 140
	24 g	Hefe-Extrakt
	4 ml	Glycerin
	900 ml	H ₂ O

TB-Medium 2:	2.3 g	KH ₂ PO ₄
	16.4 g	K ₂ HPO ₄
	ad 100 ml	H ₂ O

2.8.3.4 Mini-Plasmid-Präparation aus *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Isolierung von Plasmiden aus *Agrobacterium tumefaciens* wurde eine Methode in Anlehnung an LE GOUILL et al. (1994) verwendet. Die Plasmide wurden isoliert, um das Gelingen der Transformation zu verifizieren.

Dazu wurden Übernacht-Kulturen der entsprechenden Kolonien in YEB-Medium (2.11.5) angezogen und in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden durch eine zweiminütige Zentrifugation pelletiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert und anschließend 200 µl Lösung II zugegeben. Durch diese Lösung erfolgte eine Lyse der Zellen. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran wurden als letztes 150 µl Lösung III hinzugefügt und gevortext.

Durch eine Zentrifugation für 10 min erfolgte eine Phasentrennung, wobei die wässrige Oberphase weiterverwendet wurde. Diese wurde mit 1 Vol. Phenol:Chloroform (1:1, v/v) versetzt und kräftig

geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die obere Phase mit 2 Vol. kaltem abs. Ethanol versetzt und für 5 min zentrifugiert. Das Plasmid-Pellet wurde anschließend mit 150 µl 70% Ethanol gewaschen, 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert. Die isolierten Plasmide konnten nun z.B. durch Restriktionsverdau (2.11.7) charakterisiert werden.

Lösung I: 50 mM Glucose
 10 mM EDTA
 25 mM Tris/HCl pH 8.0

Lösung II: 0.2 M NaOH
 1% SDS (w/v)

Lösung III: 3 M K-Acetat pH 4.8

2.8.4 Ethanolfällung von DNA

Da verschiedene DNA-Proben konzentriert oder in einem anderen Puffer aufgenommen werden mußten, wurde eine Fällung der DNA durchgeführt. Hierzu wurden zu 100 µl DNA-Lösung 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat pH 5.2 und 2.5 Vol. abs. Ethanol gegeben. Es folgte eine Fällung bei -20°C für mindestens eine Stunde. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation wurde das Pellet in 50 µl H₂O oder Puffer aufgenommen.

2.8.5 Phenol-Chloroformfällung von DNA

Zur Reinigung der DNA von Proteinen wurde die Lösung mit 1 Vol. Phenol:Chloroform (1:1, v/v) gemischt und für 5 min in einer Eppendorfszentrifuge zur Phasentrennung zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der erste Schritt wiederholt. Es folgten zwei weitere Reinigungsschritte, in denen 1 Vol. Chloroform zum wässrigen Überstand gegeben und wiederum für 5 min zentrifugiert wurde.

Anschließend wurde die wässrige Oberphase mit 0.1 Vol. 3 M Na-Acetat pH 6.0 und 2.5 Vol. abs. Ethanol versetzt und die DNA für 1 h bei -20°C gefällt. Zum Pelletieren wurde für 10 min zentrifugiert und das Pellet mit 150 µl 70% Ethanol gewaschen, 15 min bei 37°C getrocknet und in der gewünschten Menge H₂O gelöst.

2.8.6 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

2 * 1 µl Aliquot der Nukleinsäurelösungen wurden in 600 µl Wasser gelöst und die Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen (Uvikon 932). Der Quotient der Extinktionswerte (260/280 nm) stellt ein Maß für die Verunreinigung der Lösung mit UV-absorbierenden Stoffen (Proteine) dar. Idealerweise sollte der Wert zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden nach folgenden Formeln berechnet:

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

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

Die Extinktionskoeffizienten gelten für doppelsträngige DNA und einzelsträngige RNA (SAMBROOK et al. 1989).

2.9 cDNA-Synthese

3 µg RNA und 1 µl dT₂₀-Primer (50 µM) wurden mit H₂O auf 12.8 µl aufgefüllt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Die Probe wurde wieder auf Eis gestellt und 4 µl 5x RT-Puffer (Fa. MBI, St. Leon-Rot), 2 µl 10 mM dNTP, 0.5 µl RNase-Inhibitor (Fa. MBI) und 0.7 µl M-MuLV-Reverse Transcriptase (Fa. MBI) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C. Um die Reverse Transcriptase zu inaktivieren, erfolgte ein 5-minütiges Erhitzen auf 95°C. 1-4 µl des Ansatzes wurden für jeweils einen PCR-Ansatz verwendet.

Je nach Art der zu transkribierenden mRNA wurde stattdessen eine Reverse Transkriptase verwendet, die bei höheren Temperaturen arbeitet (Thermoscript Reverse Transcriptase; Fa. Gibco BRL, Karlsruhe). Dies ist besonders von Vorteil, wenn sich der Primer an eine Sequenz sehr spezifisch anlagern muß, wie es z.B. bei der cDNA-Synthese im Rahmen des 5'-RACE der Fall ist (2.10.4.2).

2.10 DNA-Amplifikation

2.10.1 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:

$$T_m = 69.3 + 0.41 * [\% \text{ G/C}] - 650/\text{Primerlänge}$$

Um eine gute Amplifikationsrate zu gewährleisten, mußten die Primer so beschaffen sein, daß sie eine geringe Tendenz zur Bildung von Sekundärstrukturen und zur Hybridisierung mit sich selbst besaßen. Dies wurde mit den Computerprogrammen „foldrna“ und „bestfit“ des Wisconsin Package der Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA getestet.

Alle diese Kriterien sollten auch degenerierte Primer erfüllen. Sie dienen zur Amplifikation von noch nicht bekannten DNA-Sequenzen, von denen allerdings schon verwandte Sequenzen bekannt sind, z.B. weitere Mitglieder einer Genfamilie, oder Homologe aus anderen Pflanzenarten. Hierzu wurden zunächst die schon bekannten Aminosäure-Sequenzen miteinander verglichen („aligned“), um so konservierte Regionen zu finden. Aus der Aminosäuresequenz dieser konservierten Regionen wurde dann eine Nukleotidsequenz rückübersetzt. Da der genetische Code jedoch degeneriert ist, gab es im Primer mehrere Positionen, an denen 2, 3 oder 4 verschiedene Nukleotide eingebaut sein mußten. Daher waren konservierte Regionen sehr günstig, die Aminosäuren mit einem geringen Degenerationsgrad besaßen (z.B. Methionin, Tryptophan). Regionen, in denen die Aminosäuren Arginin, Leucin oder Serin vorhanden waren, konnten dagegen in der Regel nicht genutzt werden, da für diese Aminosäuren jeweils sechs verschiedene Triplets codieren.

2.10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, MULLIS und FALOONA 1987) ist eine Methode, mit der gezielt spezifische DNA-Sequenzen mehr als 10^6 -fach vermehrt werden. Die DNA wird zyklisch immer wieder thermisch denaturiert und mit Primern hybridisiert, die von hitzestabiler DNA-Polymerase verlängert werden. Für die PCR wurde ein Thermocycler mit beheizbarem Deckel verwendet (TGradient Thermocycler; Fa. Biometra, Göttingen). Ein Standardansatz (25 μ l) bestand aus folgenden Komponenten:

2.5 µl	10x <i>Taq</i> -Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9.0; 500 mM KCl)
1.5-3.5 µl	25 mM MgCl ₂
0.5 µl	10 mM dNTP
0.5 µl	5'-Primer (10 pmol/µl)
0.5 µl	3'-Primer (10 pmol/µl)
1 µl	Template
0.5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
ad 25 µl	H ₂ O

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und im Thermocycler die Amplifikationsreaktion gestartet.

Standard-Programmierung:

94°C 5 min (Denaturierung)

94°C 1 min (Denaturierung)

50°C 1 min (Annealing)

72°C 1-3 min (Elongation)

Dieser Zyklus wurde 35x wiederholt.

72°C 7 min (terminale Elongation)

Je nach Art der Primer und des zu amplifizierenden Templates wurden z.B. die MgCl₂-Konzentration, die Annealing-Temperatur, die Elongationszeit oder die Anzahl der Zyklen variiert. Zudem konnte der Heizblock des Thermocyclers so eingestellt werden, daß sich ein Temperaturgradient von z.B. 50-64°C ergab. So konnte innerhalb einer PCR die optimale Annealing-Temperatur der Primer herausgefunden werden. Durch eine TEA-Agarose-Gelelektrophorese (2.12.1) wurden die Amplifikationsprodukte analysiert.

2.10.3 Amplifikation eines Promotors aus genomischer DNA durch den „Universal Genome Walker Kit“

Der "Universal Genome Walker Kit" (Fa. Clontech, Heidelberg) ist eine einfache Methode zur Isolierung einer unbekannt genomschen DNA-Sequenz, z.B. eines Promotors. Voraussetzung ist, daß diese in der Nähe einer bekannten Sequenz, z.B. der cDNA eines Gens, vor das der Promotor geschaltet ist, liegt.

Das Protokoll des "Universal Genome Walker Kit" besteht aus zwei Teilen, der Konstruktion der "Genome Walker Libraries" und dem eigentlichen "Genome Walker DNA walking".

2.10.3.1 Konstruktion von „Genome Walker Libraries“

Für die Konstruktion von "Genome Walker Libraries" muß die genomische DNA, die als Ausgangsmaterial dient, sehr sauber sein und ein hohes durchschnittliches Molekulargewicht besitzen. Daher wurde die mit dem "DNeasy Plant Maxi Kit" isolierte DNA (2.8.2.1) auf ihre Qualität überprüft:

Zunächst wurde die Größe der genomischen DNA in einem 0.7%igen Agarosegel (2.12.1) festgestellt. 1 µl der DNA und 1 µl Kontroll-DNA wurden neben einem 1-kb-Größenstandard aufgetrennt. Die genomische DNA sollte größer als 50 kb sein und ein Minimum an Schmier zeigen.

Anschließend wurde die Reinheit der genomischen DNA anhand eines *DraI*-Verdaus überprüft. In einem 0.5 ml Reaktionsgefäß wurden folgende Komponenten miteinander vereint:

5 µl	genomische DNA
1.6 µl	<i>DraI</i> (10 U/µl)
2 µl	10x <i>DraI</i> -Reaktionspuffer
11.4 µl	H ₂ O

Es wurde ebenfalls ein Kontroll-Verdau ohne Restriktionsenzym angesetzt. Beide Ansätze wurden vorsichtig gemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 5 µl jedes Reaktionsansatzes und 0.5 µl genomische DNA als Kontrolle in einem 0.7%igen Agarosegel aufgetrennt. Hier war als Zeichen eines geglückten Verdaus ein Schmier zu erkennen.

Für die Konstruktion der "Genome Walker Libraries" wurde die genomische DNA mit fünf verschiedenen Restriktionsenzymen (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *ScaI*, *StuI*) verdaut, die alle Fragmente mit glatten Enden bildeten. Jeder Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

25 µl	genomische DNA (0.1 µg/µl)
8 µl	Restriktionsenzym (10 U/µl)
10 µl	10x Reaktionsenzym-puffer
57 µl	H ₂ O

Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden sie bei geringer Geschwindigkeit für 5-10 sec gevortext und im Anschluß über Nacht bei 37°C

weiter inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden von jedem Ansatz 5 µl in einem 0.7%igen Agarosegel aufgetrennt um festzustellen, ob der Enzymverdau vollständig stattgefunden hatte.

In den fünf Reaktionsgefäßen befanden sich jetzt im Idealfall viele Fragmente genomischer DNA unterschiedlicher Größe mit glatten Enden. Diese wurden im folgenden Schritt vom noch vorhandenen Enzym gereinigt.

Dazu wurden zu jedem Reaktionsgefäß 95 µl Phenol gegeben, kurz gemischt und anschließend bis zur Phasentrennung (5 min) 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 abermals in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis mit 2 Vol. 95% kaltem Ethanol, 1/10 Vol. 3 M Na-Oxalacetat pH 4.5 und 20 µg Glycogen versetzt. Die Suspensionen wurden kurz gevortext und anschließend für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 80% kaltem Ethanol gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend wurde es 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 Reaktionsansatzes in einem 0.7%igen Agarosegel aufgetrennt.

Für die Erstellung der "Genome Walker Libraries" wurden nun die in den einzelnen Ansätzen vorhandenen Fragmente mit Genome Walker Adaptoren ligiert.

Genome Walker Adaptor:

5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGT-3'
3'-CCCGACCA-5'

Von jedem Reaktionsansatz wurden 4 µl der verdauten, gereinigten DNA in ein frisches 0.5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit folgenden Substanzen gemischt:

1.9 µl Genome Walker Adaptor (25 µM)
1.6 µl 5x Ligationspuffer
0.5 µl T4 DNA-Ligase (1 U/µl)

Die Ligationsansätze wurden vorsichtig gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Reaktion durch eine Inkubation für 5 min bei 70°C gestoppt. Abschließend wurde jeder Ligationsansatz in 72 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.10.3.2 Genome Walker DNA „Walking“

Das Genome Walker DNA "Walking" besteht aus zwei aufeinanderfolgenden PCR-Amplifikationen pro Library. Für die beiden PCR-Reaktionen wurden zwei unterschiedliche Primerpaare benutzt. In der ersten PCR wurden ein genspezifischer Primer (GSP1) und als Gegenprimer ein außen auf den Genome Walker Adaptoren liegender Adaptor-Primer (AP1) verwendet. Die zweite PCR-Reaktion war eine Reamplifikation der ersten PCR zur Erhöhung der Spezifität. Diese erfolgte mit weiter innen liegenden Primern: Einem genspezifischen Primer (GSP2) und einem weiter innen auf dem Adaptor liegenden Adaptor-Primer (AP2). Die Adaptor-Primer waren im Kit enthalten, während die genspezifischen Primer selbst abgeleitet werden mußten.

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

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

Beim Design der genspezifischen Primer sollten möglichst verschiedene Kriterien erfüllt werden. Die Sequenzen sollten so weit wie möglich am 5'-Ende des schon bekannten DNA-Abschnitts liegen. Der GSP2 sollte nicht mit dem GSP1 überlappen, die Sequenzen sollten 26-30 Nukleotide lang sein und einen G/C-Gehalt von 40-60% besitzen. Die T_m sollte bei ca. 67°C liegen und von den letzten sechs Positionen am 3'-Ende sollten nicht mehr als 3 Nukleotide G oder C sein.

Für die erste PCR-Reaktion, die mit allen fünf Libraries durchgeführt wurde, wurden pro Reaktion in einem 0.5 ml Reaktionsgefäß folgende Substanzen benötigt:

37.8 µl	H ₂ O
5 µl	10x <i>Tth</i> PCR reaction buffer
1 µl	10 mM dNTP
2.2 µl	25 mM Mg(OAc) ₂
1 µl	GSP1 (10 µM)
1 µl	AP1 (10 µM)
1 µl	50x Advantage <i>Tth</i> Polymerase Mix
1 µl	<u>Genome Walker Library (1-5)</u>
50 µl	Gesamtvolumen

Die erste PCR lief mit folgendem Programm ab:

7 Zyklen:	94°C	25 sec (Denaturierung)
	72°C	3 min (Annealing + Elongation)
32 Zyklen:	94°C	25 sec (Denaturierung)
	67°C	3 min (Annealing + Elongation)
	67°C	7 min (terminale Elongation)

Zur Analyse der ersten PCR-Reaktionen wurden jeweils 8 µl der Produkte in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Falls DNA-Banden aus einer der Libraries auf dem Gel zu sehen waren, wurde mit der zweiten PCR-Reaktion fortgefahren: 1 µl der ersten PCR-Reaktion wurde mit 49 µl H₂O verdünnt und 1 µl davon eingesetzt:

37.8 µl	H ₂ O
5 µl	10x <i>Tth</i> PCR reaction buffer
1 µl	10 mM dNTP
2.2 µl	25 mM Mg(OAc) ₂
1 µl	GSP2 (10 µM)
1 µl	AP2 (10 µM)
1 µl	50x Advantage <i>Tth</i> Polymerase Mix
1 µl	<u>Produkt aus erster PCR (1:50 verdünnt)</u>
50 µl	Gesamtvolumen

Die zweite PCR lief mit folgendem Programm ab:

5 Zyklen:	94°C	25 sec
	72°C	3 min
20 Zyklen:	94°C	25 sec
	67°C	3 min
	67°C	7 min

5 µl der PCR-Produkte der zweiten PCR wurden wiederum zur Analyse in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Falls auch hier ein Amplifikationsprodukt zu sehen war, wurden interessante Fragmente

kloniert und sequenziert (2.10.6).

2.10.4 Amplifikation von cDNA-Enden (RACE)

Durch die RACE-Technik ("rapid amplification of cDNA ends", FROHMAN et al. 1988) ist es möglich, die vollständige Sequenz von cDNAs zu erhalten, falls schon ein Fragment dieser cDNA bekannt ist. Zum einen kann man die Sequenz zwischen Fragment und 3'-Ende und zum anderen zwischen Fragment und 5'-Ende erhalten, indem man durch PCR mit einem genspezifischen Primer und einem Oligo-dT-Primer die gesuchten Teilstücke amplifiziert.

2.10.4.1 3'-RACE

Das 3'-RACE funktioniert prinzipiell wie die RT-PCR (2.9; 2.10.2). Allerdings dienen als forward-Primer von cDNA-Fragmenten abgeleitete Oligonukleotide, als reverse-Primer entweder MM3 oder MM4 (2.1.4).

Zunächst wurde Gesamt-RNA aus einem Gewebe isoliert, in dem die Expression des cDNA-Fragments, dessen 3'-Ende identifiziert werden sollte, am höchsten war. Anschließend wurde aus der Gesamt-RNA die mRNA gewonnen (2.8.1.4).

2.10.4.1.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese im Zuge des 3'-RACE wurde mit einer besonderen Form von Reverser Transcriptase durchgeführt, die eine reverse Transkription bei Temperaturen bis zu 65°C erlaubt ("Thermoscript" Kit, Fa. Gibco BRL).

2 µl der isolierten mRNA (2.8.1.4) wurden mit 1 µl (50 µM) eines dT₂₀-Primers und 7 µl H₂O versetzt, 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis gestellt.

Nun wurden folgende Komponenten hinzugefügt: 4 µl 5x RT-Puffer, 1 µl 100 mM DTT, 2 µl 10 mM dNTP, 1 µl H₂O, 1 µl RNase-out (40 U/µl), 1 µl Thermoscript Reverse Transcriptase (15 U/µl). Während einer Inkubation für 1 h bei 50°C erfolgte die Synthese der cDNA. Zur Inaktivierung der Reversen Transcriptase folgte ein Hitzeschock bei 85°C für 5 min. Nun wurde 1 µl RNase H (2 U/µl) zugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert.

2.10.4.1.2 3'-RACE-PCR

Da es sich bei Saccharose-Transportern um Gene handelt, die nicht sehr stark exprimiert werden, wurde eine besondere PCR-Variante entwickelt. Diese berücksichtigte, daß einer der Primer (MM3) eine sehr ungünstige Annealing-Temperatur besitzt. Die einzige Möglichkeit, überhaupt Amplifikationsprodukte zu erhalten, begann mit einer ersten PCR, die sowohl im "Hot Start"-Verfahren als auch mit einem "Inversen Touchdown" durchgeführt wurde. Dabei wurde die Annealing-Temperatur in jedem Amplifikationsschritt um jeweils 1°C erhöht. Zusätzlich war noch eine anschließende PCR (Reamplifikation) nötig, um eine ausreichende Amplifikationsrate zu erzielen. In einen Gesamtansatz von 50 µl wurden folgende Komponenten pipettiert:

5 µl	10x <i>Taq</i> -Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9.0; 500 mM KCl)
3-6 µl	25 mM MgCl ₂
1 µl	10 mM dNTP
1 µl	genspezifischer Primer (10 pmol/µl)
1 µl	MM3-Primer (10 pmol/µl)
2 µl	cDNA-Synthese-Produkt (2.10.4.1.1)
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (Zugabe während der PCR)
ad 50 µl	H ₂ O

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und im Thermocycler die Amplifikationsreaktion gestartet.

1. PCR ("Hot Start" + "Inverser Touchdown")

94°C	5 min (Denaturierung)
80°C	3 min (Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase)

94°C	1 min (Denaturierung)
42-55°C	1 min (Annealing, + 1°C/Zyklus)
72°C	2.5 min (Elongation)

Dieser Zyklus wurde 13x wiederholt.

94°C	1 min (Denaturierung)
55°C	1 min (Annealing)
72°C	2.5 min (Elongation)

Dieser Zyklus wurde 20x wiederholt.

72°C	7 min (terminale Elongation)
------	------------------------------

Es folgte eine Reamplifikation, um die Spezifität des PCR-Produkts und dessen Menge durch Nutzung weiterer Primer zu erhöhen. Diese waren zum einen ein weiter innen liegender genspezifischer ("nested") Primer und zum anderen MM4, dessen Sequenz mit Ausnahme des Oligo-dT-Schwanzes der von MM3 entspricht.

2. PCR (Reamplifikation)

Versuchsansatz:

5 µl	10x <i>Taq</i> -Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9.0; 500 mM KCl)
3-6 µl	25 mM MgCl ₂
1 µl	10 mM dNTP
1 µl	"nested" Primer (10 pmol/µl)
1 µl	MM4-Primer (10 pmol/µl)
0.5 µl	PCR-Produkt der 1. PCR
1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (Zugabe während der PCR)
ad 50 µl	H ₂ O

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und im Thermocycler die Amplifikationsreaktion gestartet.

Programmierung:

94°C	5 min (Denaturierung)
80°C	3 min (Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase)
94°C	1 min (Denaturierung)
58°C	1 min (Annealing)
72°C	2.5 min (Elongation)
Dieser Zyklus wurde 25x wiederholt.	
72°C	7 min (Denaturierung)

Durch eine TEA-Agarose-Gelelektrophorese (2.12.1) wurden die Amplifikationsprodukte analysiert.

2.10.4.2 5'-RACE

Das 5'-RACE ist methodisch wesentlich komplizierter als das 3'-RACE, da zusätzlich an das 5'-Ende der cDNA ein Oligo-dA-Schwanz synthetisiert werden muß. An diesen kann sich als Gegenprimer zum genspezifischen Primer ein modifizierter Oligo-dT-Primer anlagern (MM3, 2.1.4). Als Primer für die cDNA-Synthese dient ein genspezifischer Primer, der in dem Bereich des Transkripts liegt, der schon bekannt ist. Dieser Primer ist komplementär zum Transkript und mit seiner freien 3'-OH-Gruppe in Richtung des 5'-Endes des Transkripts orientiert. Daher wird bei der cDNA-Synthese der gesamte 5'-Bereich revers transkribiert.

Zunächst wurde Gesamt-RNA aus einem Gewebe isoliert, in dem die Expression des cDNA-Fragments, dessen 5'-Ende identifiziert werden sollte, am höchsten war. Anschließend wurde aus der Gesamt-RNA die mRNA gewonnen (2.8.1.4).

2.10.4.2.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese im Zuge des 5'-RACE wurde mit einer besonderen Form von Reverser Transcriptase durchgeführt, die eine reverse Transkription bei Temperaturen bis zu 65°C erlaubt ("Thermoscript" Kit, Fa. Gibco BRL).

4 µl der isolierten mRNA (2.8.1.4) wurden mit 0.5 µl (100 pmol/µl) eines genspezifischen Primers und 6.5 µl H₂O versetzt, 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis gestellt.

Nun wurden folgende Komponenten hinzugefügt: 4 µl 5x RT-Puffer, 1 µl 100 mM DTT, 2 µl 10 mM dNTP, 1 µl RNase-out (40 U/µl), 1 µl Thermoscript Reverse Transcriptase (15 U/µl). Während einer Inkubation für 30 min bei 60°C erfolgte die Synthese der cDNA. Zur Inaktivierung der Reversen Transcriptase folgte ein Hitzeschock bei 85°C für 5 min. Nun wurde 1 µl RNase H (2 U/µl) zugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt.

2.10.4.2.2 Isolierung der cDNA

Der Ansatz aus der cDNA-Synthese wurde von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Dieser Schritt war notwendig, da die Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) jedes freie Nukleotid an das 3'-Ende von cDNAs anhängen kann. Um freie von gebundenen Nukleotiden zu trennen, erfolgte eine Aufreinigung mit einem "High Pure PCR Product Purification Kit" (Fa. Roche, Mannheim). Das Prinzip der Aufreinigung bestand in der selektiven Bindung von Nukleinsäuren an die Oberfläche von Glasfasern in Anwesenheit eines chaotropen Salzes. Die Elution der cDNAs von den Glasfasern erfolgte mit 50 µl 1x TdT-Puffer (2.10.4.2.3).

2.10.4.2.3 Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase-Reaktion

Die Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase-Reaktion (TdT-Reaktion, ROYCHOUDHURY et al. 1976) katalysiert die Synthese von Nukleotiden an das freie 3'-Ende von DNA-Molekülen. In diesem Fall wurde ein Oligo-dA-Schwanz an das Ende einer zu amplifizierenden cDNA synthetisiert, um eine definierte Bindungsstelle für einen Gegenprimer (MM3, 2.1.4) zum genspezifischen Primer zur Durchführung einer PCR zu erhalten.

Die Reaktion lief in folgendem Ansatz ab: Zu 50 µl des Eluats aus 2.10.4.2.2 wurden 1 µl 5x TdT-Puffer, 1.5 µl 1 mM dATP, 1.5 µl H₂O und 1 µl TdT (19 U/µl, Fa. Promega) gegeben. Der Ansatz wurde eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend für 5 min auf 70°C erhitzt. 5 µl aus dem Ansatz wurden für die 5'-RACE-PCR verwendet.

5x TdT-Puffer: 500 mM Cacodylat-Puffer pH 6.8
5 mM CoCl₂
0.5 mM DTT

2.10.4.2.4 5'-RACE-PCR

Da es sich bei Saccharose-Transportern um Gene handelt, die nicht besonders stark exprimiert werden, wurde eine besondere PCR-Variante entwickelt. Diese berücksichtigte, daß einer der Primer (MM3) eine sehr ungünstige Annealing-Temperatur besitzt. Wie beim 3'-RACE wurde mit einer ersten PCR, die sowohl im "Hot Start"-Verfahren als auch mit einem "Inversen Touchdown" durchgeführt wurde, begonnen. Dabei wurde die Annealing-Temperatur in jedem Amplifikationsschritt um jeweils 1°C erhöht. Zusätzlich waren noch anschließende Reamplifikationen nötig, um eine genügende Amplifikationsrate zu erzielen. In einen Gesamtansatz von 50 µl wurden folgende Komponenten pipettiert:

5 µl 10x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9.0; 500 mM KCl)
3-6 µl 25 mM MgCl₂
1 µl 10 mM dNTP
1 µl genspezifischer Primer (10 pmol/µl)
1 µl MM3-Primer (10 pmol/µl)
2 µl TdT-Produkt (2.10.4.2.3)
1 µl *Taq*-Polymerase (Zugabe während der PCR)
ad 50 µl H₂O

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und im Thermocycler die Amplifikationsreaktion gestartet.

1. PCR ("Hot Start" + "Inverser Touchdown")

94°C 5 min (Denaturierung)
80°C 3 min (Zugabe der *Taq*-Polymerase)

94°C 1 min (Denaturierung)
42-55°C 1 min (Annealing, + 1°C/Zyklus)
72°C 1 min (Elongation)

Dieser Zyklus wurde 13x wiederholt.

94°C 1 min (Denaturierung)
55°C 1 min (Annealing)
72°C 1 min (Elongation)

Dieser Zyklus wurde 20x wiederholt.

72°C 7 min (terminale Elongation)

Es folgte eine Reamplifikation, um die Spezifität des PCR-Produkts durch Nutzung weiterer Primer zu erhöhen. Diese waren zum einen ein weiter innen liegender genspezifischer ("nested") Primer und zum anderen MM4, dessen Sequenz mit Ausnahme des Oligo-dT-Schwanzes der von MM3 entspricht.

2. PCR (1. Reamplifikation)

Versuchsansatz:

5 µl 10x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9.0; 500 mM KCl)
3-6 µl 25 mM MgCl₂
1 µl 10 mM dNTP
1 µl "nested" Primer (10 pmol/µl)
1 µl MM4-Primer (10 pmol/µl)
0.5 µl PCR-Produkt der 1. PCR
1 µl *Taq*-Polymerase (Zugabe während der PCR)
ad 50 µl H₂O

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und im Thermocycler die Amplifikationsreaktion gestartet.

Programmierung:

94°C	5 min (Denaturierung)
80°C	3 min (Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase)
94°C	1 min (Denaturierung)
58°C	1 min (Annealing)
72°C	1 min (Elongation)
Dieser Zyklus wurde 30x wiederholt.	
72°C	7 min (Denaturierung)

Es folgte eine zweite Reamplifikation (3. PCR), um die Menge des PCR-Produkts so zu erhöhen, daß es gut zu isolieren war. Durch eine TEA-Agarose-Gelelektrophorese (2.12.1) wurden die Amplifikationsprodukte analysiert.

2.10.5 Kolonie-PCR

Zur schnellen Untersuchung von Bakterienkolonien auf das Vorhandensein eines Plasmids mit dem gewünschten Insert (z.B. PCR-Produkt) bietet sich neben der Mini-Plasmid-Präparation mit anschließendem Restriktionsverdau (2.8.3.1; 2.11.7) auch die Technik der Kolonie-PCR an. Diese hat den Vorteil, daß eine hohe Zahl an Bakterienkolonien (ca. 50) einfach und sehr schnell sequenzspezifisch auf das richtige Insert gescreent werden kann, was bei Ligationen mit geringer Insertionsrate nötig ist. Zudem kann gleichzeitig die Richtung der Insertion bestimmt werden. Bei sehr niedrigen Insertionsraten kann alternativ ein Kolonie-Screening (2.13.2) durchgeführt werden, bei dem bis zu 500 Kolonien auf einmal untersucht werden können.

Nachdem im Anschluß an eine Transformation (2.11.6.1) Bakterienkolonien gewachsen waren, wurde eine möglichst große Anzahl Kolonien mit sterilen Zahnstochern gepickt, wobei der Zahnstocher zunächst in ein mit 10 µl H₂O gefülltes 0.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß getaucht wurde. Dann wurde mit dieser Kolonie am Zahnstocher eine Übernacht-Kultur mit LB-Medium und geeignetem Antibiotikum angeimpft. Diese Kulturen konnten ggf. am nächsten Tag für eine Mini-Plasmid-Präparation verwendet werden.

Durch Erhitzen auf 100°C für 10 min wurden die im 0.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß befindlichen Bakterienzellen zerstört und die darin enthaltenen Plasmide freigesetzt. Zu diesen schon vorhandenen 10 µl Bakteriensuspension wurden folgende Substanzen zugegeben:

2.5 µl	10x <i>Taq</i> -Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9.0; 500 mM KCl)
3 µl	25 mM MgCl ₂
0.5 µl	10 mM dNTP
0.5 µl	5'-Primer (10 pmol/µl)
0.5 µl	3'-Primer (10 pmol/µl)
0.5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
ad 25 µl	H ₂ O

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und im Thermocycler die Amplifikationsreaktion gestartet. Die Programmierung des Thermocyclers erfolgte wie in 2.10.2 beschrieben. Anschließend wurde eine TEA-Agarose-Gelelektrophorese (2.12.1) zur Analyse der Amplifikationsprodukte durchgeführt.

2.10.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach SANGER et al. (1977). Dazu wurde ein Kit benutzt, der mit dRhodamin markierte Didesoxynukleotide enthielt („ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“; Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt). Die verschiedenen markierten ddNTPs haben Absorptions- und Emissionsspektren von 450-650 nm. Folgender Ansatz wurde für die Kettenverlängerungsreaktion verwendet:

2 µl	Terminator Ready Reaction Mix
300-600 ng	Plasmid
5 pmol	Sequenzierungs-Primer
ad 10 µl	H ₂ O

Als Sequenzierungs-Primer dienten Abschnitte auf den jeweiligen Vektoren, die in der Nähe der Insertionsstelle lagen (T3, T7, rev; 2.1.4). Zusätzlich wurden noch verschiedene genspezifische Primer bei Sequenzierung großer DNA-Fragmente verwendet.

Die Kettenverlängerung erfolgte im Biometra TGradient Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

96°C	10 sec
50°C	5 sec
60°C	4 min

Dieser Zyklus wurde 25x wiederholt.

Nach dieser Reaktion mußten die nicht eingebauten dRhodamin-ddNTPs durch eine Ethanol-fällung entfernt werden. Dazu wurden zu 10 µl PCR-Ansatz 1 µl Na-Acetat (1.5 M Na-Acetat pH \geq 8.0; 250 mM EDTA) und 36 µl 99.6% Ethanol gegeben und gut gemischt. Die Probe wurde für 45 min auf Eis inkubiert und nach einer 15-minütigen Zentrifugation der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 100 µl 70% Ethanol aufgenommen und gut gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min wurde der Überstand abgenommen und das Pellet für 1 min bei 90°C getrocknet. Dieses Pellet wurde in 20 µl Template Suppression Reagent gelöst und bei 95°C für 2 min denaturiert. Die Probe konnte nun im ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems) sequenziert werden. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit denen schon bekannter Gene wie in 2.19.1 beschrieben verglichen.

2.11 Klonierungsmethoden

2.11.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Vor der Ligation eines bestimmten DNA-Fragments in ein Plasmid mußte dieses DNA-Stück von anderen im Versuchsansatz vorhandenen DNA-Fragmenten getrennt werden. Dies ist zum einen bei dem Produkt einer PCR erforderlich, da dort oft auch unerwünschte Amplifikationsprodukte entstehen, zum anderen bei einer Restriktionsverdau, bei der i.d.R. auch mindestens zwei DNA-Fragmente entstehen. Die Trennung des gesuchten DNA-Fragments von den unerwünschten erfolgte durch eine präparative TEA-Agarose-Gelelektrophorese (2.12.1). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 60 Volt. Die gesuchte DNA-Bande wurde dann unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA von der Agarose und dem gebundenen Ethidiumbromid durch einen Kit ("Qiaex Gel Extraction Kit"; Fa. Qiagen) eluiert. Dieser Kit beruht auf der selektiven Bindung von Nucleinsäuren an Kieselgel-Partikel bei hohen Salzkonzentrationen. Im letzten Schritt der Elution wurde die DNA in 20 µl H₂O aufgenommen. Um den Erfolg der Elution zu überprüfen, wurde wiederum eine TEA-Agarose-Gelelektrophorese mit 1 µl des Eluats durchgeführt.

2.11.2 Phosphatase-Behandlung

Um die Wahrscheinlichkeit des Einbaus eines Inserts in ein Plasmid im Rahmen einer Ligation zu erhöhen, wurden manche Plasmide mit dem Enzym Phosphatase behandelt. Dieses Enzym entfernt die Phosphatreste an den 5'-Enden eines DNA-Doppelstrangs und verhindert damit eine Religation. Anschließend kann diese nur durch Einbau eines Inserts mit intakten 5'-Phosphatresten erfolgen. Eine

geringe Insertionsrate tritt besonders häufig bei Ligationen von DNA-Strängen mit glatten ("blunt") Enden auf.

Nachdem ein Plasmid mit den gewünschten Restriktionsenzymen aufgeschnitten worden war, wurde dem Versuchsansatz 0.1 Vol. 10x Dephosphorylierungspuffer und 1 U alkalische Phosphatase (Fa. Roche) zugegeben. 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-Chloroformfällung (2.8.5) aus dem Ansatz entfernt werden. Bei der Lagerung der Phosphatase war darauf zu achten, daß sie nicht unter 4°C gelagert wurde, da sie durch Einfrieren relativ schnell inaktiv wurde.

10x Dephosphorylierungspuffer:	Tris/HCl pH 8.5	0.5 M
	EDTA	1 mM

2.11.3 Ligation

Das durch Elution gereinigte DNA-Fragment (z.B. PCR-Produkt) wurde durch Ligation in ein geeignetes Plasmid (z.B. Klonierungsvektor pGEM-T Easy, Fa. Promega) eingebaut. Für PCR-Produkte konnte die sogenannte T/A-Klonierung genutzt werden, da PCR-Produkte an ihren 3'-Enden ein überhängendes A besitzen. pGEM-T Easy besitzt korrespondierend dazu ein überhängendes T an seinen freien 3'-Enden. In den übrigen Fällen mußte darauf geachtet werden, daß die durch Restriktionsenzyme gewonnenen Enden von Vektor und Insert übereinstimmten.

Für die Ligation wurden i.d.R. 0.5 µl Plasmid, 1 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (Fa. Promega) und 7.5 µl zu inserierendes DNA-Fragment gemischt und bei 15°C über Nacht inkubiert. 5 µl des Ansatzes wurden für die Transformation (2.11.6.1) verwendet, der Rest wurde für eine mögliche zweite Transformation bei 4°C gelagert.

10x T4-DNA-Ligase-Puffer:	300 mM	Tris/HCl pH 7.8
	100 mM	MgCl ₂
	100 mM	DTT
	10 mM	ATP

2.11.4 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde die Methode von INOUE et al. (1990) benutzt. Es wurde eine Kultur *E. coli* DH5α-Zellen in 5 ml SOC-Medium in einem 50 ml Falcon-Tube über Nacht

bei 37°C inkubiert. Hieraus wurden 200 ml SOC-Medium in einem 2 l - Erlenmeyer-Kolben angeimpft und bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4-0.6 wachsen gelassen. Der Erlenmeyer-Kolben war, wie alle anderen Glasgefäße auch, zuvor mit H₂O gefüllt autoklaviert worden. Die Bakterienkultur wurde dann auf Falcon-Tubes aufgeteilt und bei 4000 Upm für 10 min in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge (Megafuge 1.0) abzentrifugiert.

Die Bakterienpellets wurden auf Eis mit je 15 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4000 Upm in zwei Falcon-Tubes. Die Pellets wurden wieder in je 15 ml Transformationspuffer resuspendiert und unter kräftigem Mischen in jedes Tube 525 µl DMSO gegeben. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Bakteriensuspensionen in 200 µl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Transformationspuffer: 10 mM PIPES
 15 mM CaCl₂
 250 mM KCl
 pH-Wert mit KOH auf 6.7 einstellen
 ad 55 mM MnCl₂
 abschließend sterilfiltrieren

SOC-Medium (in 100 ml): 2 g Select Pepton 140
 0.5 g Hefe-Extrakt
 1 ml 1 M NaCl
 0.25 ml 1 M KCl
 separat für 10 Minuten autoklavieren:
 1 ml 1 M MgCl₂
 1 ml 1 M MgSO₄
 1 ml 2 M Glucose

2.11.5 Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens* Zellen

Zur Präparation von kompetenten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen wurde eine 3 ml-Vorkultur (YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika) 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 OD₆₀₀ = 0.5 angezogen. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 4300 Upm und 4°C in einer Heraeus Megafuge 1.0 wurden die Agrobakterien in 10 ml 0.15 M NaCl-Lösung resuspendiert. Nach

einer weiteren Zentrifugation wurde das Zellsediment in 1 ml eiskalter 75 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Eine Lagerung bei -70°C ermöglichte eine Nutzung der Zellen über mehrere Wochen.

YEB-Medium: 2 g/l Select Yeast Extract
 5 g/l Lab-Lemco-Powder (Fa. Roth)
 5 g/l Pepton (Casein-Hydrolysat)
 5 g/l Saccharose

pH-Wert auf 7.0 einstellen, anschließend autoklavieren
 danach 2 ml 1 M MgSO₄ (sterilfiltriert) zugeben

		<u>Stamm-Lsg.</u>	<u>End-Konzentration</u>
Antibiotika:	Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml (1:1000)
	Gentamycin	25 mg/ml	25 µg/ml (1:1000)
	Rifampicin	10 mg/ml (in MetOH)	50 µg/ml (1:200)

2.11.6 Transformationsmethoden

2.11.6.1 Transformation von *E. coli*

200 µl kompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 5 µl des Ligationsansatzes (2.11.3) zugegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C. Der Ansatz wurde wieder auf Eis gestellt und 1 ml SOC-Medium (2.11.4) zugegeben. Danach wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C inkubiert.

Die transformierten Zellen wurden nun auf LB-IPTG-x-Gal-Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen, d.h. auf zwei Platten jeweils 0.2 ml und 1 ml. Diese Platten wurden dann bei 37°C über Nacht inkubiert, so daß die transformierten Zellen Kolonien bilden konnten. Manche Vektoren ermöglichten eine Blau/Weiß-Selektion. Die Bakterien mit einem Vektor ohne Insert bildeten blaue Kolonien, da ihr *lacZ*-Gen nicht unterbrochen war. Bakterien mit einem Vektor mit Insert bildeten weiße Kolonien, da die kodierende Region für das α-Peptid der β-Galactosidase durch die Insertion unterbrochen war. Das *lacZ*-Gen (= β-Galactosidase) bewirkt die Umsetzung des farblosen Stoffes x-Gal zu einem blauen Derivat.

Amp100: 100 mg Ampicillin/ml

Km50: 50 mg Kanamycin/ml

LB-Flüssigmedium: 10 g/l Select Pepton 140
5 g/l Hefe Extrakt
10 g/l NaCl
mit NaOH auf pH 7.5 einstellen

LB-IPTG-x-Gal-Agar: x ml LB-Medium
1.5% Select-Agar
1:1000 Amp100 oder Km50
1:500 100 mM IPTG
1:500 x-Gal (2% (w/v) in DMF)

Amp100 bzw. Km50, IPTG und x-Gal wurden nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.11.6.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens wurde durch Elektroporation transformiert. Dazu wurden 30 µl kompetente Agrobakterien (2.11.5) 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 gestellt. Der Pulser wurde zuvor auf 2.5 V/ 200 kΩ/ 25 µF/ 4.6 msec eingestellt. Durch gleichzeitiges Drücken der Pulsknöpfe wurde ein einmaliger Strompuls ausgelöst. Danach wurde die Küvette sofort auf Eis gestellt und 1 ml SOC-Medium (2.11.4) 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 (2.11.5) mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für zwei Tage bei 28°C inkubiert.

Von den positiven Kolonien wurden Mini-Plasmid-Präparationen (2.8.3.1) durchgeführt und 5 µl DNA zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (2.11.6.1). Von den transformierten *E. coli* Zellen konnte dann ausreichend Plasmid-DNA für eine Charakterisierung durch Restriktionsverdau isoliert werden. Von den positiven Agrobakterien-Kolonien wurden Glycerinkulturen angelegt (2.11.8).

2.11.6.3 Hefe-Transformation

Die Hefetransformation wurde mit Modifikationen nach SAUER und STOLZ (2000) durchgeführt. Alle Schritte wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt. Der zu transformierende Hefe-Stamm DBY2617 (2.1.2) wurde über Nacht in 20 ml YPD-Medium oder einem

anderen geeigneten Medium bis zur mittellogarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} 2-3 \cong 2-3 \cdot 10^7$ Zellen/ml) angezogen. Alternativ erfolgte die Anzucht von $OD_{600} 0.5$ auf $OD_{600} 2$ während eines Tags. 1.4 ml der Übernacht-Kultur wurden in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und kurz (1 min bei 5000 Upm) sedimentiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt. Danach wurde das Zellsediment durch kurzes Vortexen gelockert und mit 10 μ l Carrier-DNA-Lösung sowie der zu transformierenden DNA (z.B. 0.3 μ g oder 3 μ g) versetzt. Diese Mischung wurde kurz gevortext, mit 500 μ l LP-Mix versetzt und erneut durchmischt. Im Anschluß fügte man 55 μ l DMSO hinzu, invertierte den Ansatz kurz und ließ ihn für 15 min inkubieren.

Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 15 min gab man zur Verdünnung des Ansatzes 500 μ l TE-Puffer hinzu, invertierte mehrmals kurz und sedimentierte die Zellen für 1 min bei 4000 Upm. Das Pellet wurde nun in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und erneut für 2 min bei 4000 Upm abzentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde abschließend in 100 μ l TE-Puffer aufgenommen und auf einem geeigneten Selektivmedium (z.B. CAAG-Medium, 2.18.1) ausplattiert. Nach zwei Tagen Inkubation bei 29°C erschienen die transformierten Hefezellen als Kolonien auf den Agarplatten.

YPD-Medium:	Select Yeast Extract	1 % (w/v)
	Bacto Pepton	2 % (w/v)
	Glucose	2 % (w/v)
	ggf. 1.5% Agar	
LP-Mix:	PEG 4000	40 % (w/v)
	Lithiumacetat	100 mM
	Tris/HCl pH 7.5	10 mM
	EDTA	1 mM
TE-Puffer:	Tris/HCl pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM

Carrier-DNA: 10 mg/ml sterile, gescherte, denaturierte Heringssperma-DNA in TE-Puffer. Heringssperma-DNA wird in der genannten Konzentration in TE-Puffer gelöst und bis zu einer mittleren Länge von 1-2 kb geschert, z.B. durch Ultraschallbehandlung oder durch mehrmaliges Aufziehen durch eine enge Kanüle. Anschließend wird die DNA-Lösung aliquotiert (200 μ l/Gefäß) und durch 10 min Kochen bei 100°C thermisch denaturiert. Danach wird die Lösung im Eisbad abgeschreckt, in ein frisches Gefäß überführt und mit 1/15 Vol. 5 M NaCl sowie 2.5 Vol. abs. Ethanol versetzt. Das dadurch sterilisierte Präzipitat wird pelletiert, im gleichen Ausgangsvolumen TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.11.6.4 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia erfolgte nach der „floral dip“-Methode (CLOUGH und BENT 1998, BENT 2000). 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 enthält, bei 25-28°C in 500 ml YEB-Flüssigmedium (2.11.5) angezogen, das die notwendigen Antibiotika enthält (normalerweise Kanamycin, Gentamycin und Rifampicin). Nach Erreichen einer OD_{600} von 0.6-1.0 wurde die Bakterien-Suspension in einer Megafuge 1.0 (Fa. Heraeus) für 10 min bei 4300 Upm abzentrifugiert und das Pellet in soviel 5% (w/v) Saccharose-Lösung resuspendiert, daß sich eine OD_{600} von 0.8 ergab. Diese Bakterien-Suspension wurde in ein breithalsiges Becherglas überführt und als mildes Detergens 0.05% (v/v) Silwet L-77 (Fa. Lehle Seeds, Round Rock, USA) hinzugegeben.

Nun erfolgte die eigentliche Transformation, indem die Pflanzen kopfüber mit ihren Blütenständen in die Agrobakterien-Suspension getaucht und für 2-3 sec darin geschwenkt wurden. Nachdem die Pflanzen abgetrocknet waren (ca. 1 h), wurden sie wieder zurück in die Klimakammer gestellt, und zwar zunächst für einen Tag unter einer Schutzhaube. 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. Um die Transformationsrate zu erhöhen, konnte ggf. nach einer Woche ein zweiter „floral dip“ durchgeführt werden.

Das Screening auf Transgenizität der Pflanzen erfolgte durch Besprühen von ca. drei Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen mit einer 10 mM BASTA[®]-Lösung (Glufosinat; Fa. Agrevo, Düsseldorf). Nach 3-4 Tagen verfärbten sich die untransformierten Pflanzen gelblich und starben ab, wohingegen sich transgene *Arabidopsis* unbeeinflusst weiterentwickelten.

2.11.7 Restriktionsanalyse

Um festzustellen, ob ein Insert der richtigen Größe in ein Plasmid eingebaut wurde, mußte der Vektor mit Restriktionsenzymen verdaut werden. Da z.B. der pGEM-T Easy-Vektor auf beiden Seiten der Insertionsstelle eine *EcoRI*-Schnittstelle besitzt, konnte bei diesem Plasmid ein Restriktionsverdau mit diesem Enzym durchgeführt werden:

7.5 µl Plasmid-Lösung (z.B. Mini-Prep-Eluat)
10 µl H₂O
2 µl 10x Reaktions-Puffer
0.5 µl *EcoRI* (= 5 U)

Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 1 µl davon auf ein TEA-Agarose-Gel aufgetragen (2.12.1), um die Größe des Inserts festzustellen. War ein Insert (z.B. PCR-Produkt) der gewünschten Größe in einem Vektor eingebaut, so wurde bei einer geplanten Sequenzierung die b-Probe des Klons, der dieses Plasmid enthält, mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Fa. Qiagen) präpariert, da nur dies eine genügend hohe Reinheit der Plasmid-DNA garantierte.

2.11.8 Bakteriendauerkultur

Zur Anlage von Bakteriendauerkulturen positiver Klone wurden 0.2 ml Glycerin in 2 ml Schraubdeckel-Eppendorfgefäße gefüllt und autoklaviert. Von einer gut gewachsenen Übernachtskultur mit Antibiotikum wurden 0.8 ml zugegeben und gut gemischt. Die Glycerinkulturen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.12 Gelelektrophoretische Trennmethode

2.12.1 TEA-Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg einer PCR zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte durch eine TEA-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurden 1%ige (w/v) TEA-Agarosegele gegossen und zur Sichtbarmachung unter UV-Licht 0.25 µg/ml Gel Ethidiumbromid zugefügt. Vor dem Probenauftrag wurde den Proben jeweils 1/5 Vol. „loading dye“ zugesetzt. Als Größenstandard diente λ -*PstI*-Marker. Die Gele wurden bei 70 Volt mit 1x TEA-Puffer laufen gelassen. Die DNA-Banden konnten dann durch UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert werden (FLX-20M; Fa. Vilber Lourmat, Marne La-Vallet, Frankreich).

50 x TEA-Puffer: 2 M Tris/Acetat pH 8.3
100 mM EDTA

„loading dye“: 50% Glycerin (v/v)
 10 mM NaPO₄ pH 7.0
 0.4% Orange G (w/v)

2.12.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in Anlehnung an LAEMMLI (1970) durchgeführt. Zunächst wurden die zu untersuchenden Proben mit Probenpuffer mindestens im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die Solubilisierung und Denaturierung der Proteine erfolgte während einer Inkubation bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde. Danach wurden die Proben für 3 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile 5 min bei 13000 U_{pm} zentrifugiert.

Probenpuffer:	Tris/HCl pH 6.8	15 mM
	SDS	5 % (w/v)
	2-Mercaptoethanol	2 % (v/v)
	Glycerin	20 % (v/v)
	Bromphenolblau	0.01 % (v/v)

2.12.2.1 Zusammensetzung der Gele und Elektrophorese

Es wurden in der Regel Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 12.5 % (w/v) im Trenngel verwendet. Die Dicke des Gels war 1 mm, die Länge des Sammelgels ca. 0.8 cm und die Länge des Trenngels 7 cm. Die Gele setzten sich folgendermaßen zusammen:

Sammelgel:	Tris/HCl pH 6.8	0.13 M
	SDS	0.1 % (w/v)
	Acrylamid	4.6 % (w/v)
	N,N-Methylenbisacrylamid	0.12 % (w/v)
	APS	0.06 % (w/v)

Trenngel:	Tris/HCl pH 8.8	0.38 M
	SDS	0.1 % (w/v)
	Acrylamid	12.5 % (w/v)
	N,N-Methylenbisacrylamid	0.33 % (w/v)
	APS	0.05 % (w/v)

Zusammensetzung der Stammlösungen:

Lower Gel Stock:	Tris/HCl pH 8.8	1.5 M
	SDS	0.4 % (w/v)
Upper Gel Stock:	Tris/HCl pH 6.8	0.5 M
	SDS	0.4 % (w/v)
Acrylamid Stock:	Acrylamid	30 % (w/v)
	N,N-Methylenbisacrylamid	0.8 % (w/v)
Ammoniumperoxodisulfat (APS):		10 % (w/v)

N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)

Für ein Gel wurden folgende Komponenten gemischt:

	Trenngel	Sammelgel
Lower Gel Stock	1.5 ml	-
Upper Gel Stock	-	0.65 ml
Acrylamid Stock	2.5 ml	0.39 ml
H ₂ O	2 ml	1.5 ml
APS	30 µl	15 µl
TEMED (Start der Polymerisation)	10 µl	5 µl

Die Polymerisation des Trenn- bzw. Sammelgels benötigte jeweils ca. eine halbe Stunde. Im Anschluß daran wurde das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und diese mit Laufpuffer befüllt. Nun konnten bis zu 20 µl Probe pro Geltasche auf das Gel geladen werden. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 25 mA (500 V, 100 W) pro Gel, bis der Bromphenolblau-Marker nach ca. 1.5 h das Ende des Trenngels erreichte. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine wurden gleichzeitig Markerproteine eines Molekulargewichts von 14-97 kDa aufgetragen

(„Low Molecular Weight Calibration Kit“; Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg). Das Gel stand nun für einen Western-Blot zur Verfügung (2.15.2), oder konnte je nach aufgetragener Proteinmenge durch Coomassie- oder Silverstain-Färbung angefärbt werden.

Laufpuffer:	Tris/HCl (pH nicht eingestellt)	50 mM
	Glycin	380 mM
	SDS	0.1 % (w/v)

Markerproteine (Größenstandard):	Phosphorylase b	97 kDa
	BSA	66 kDa
	Ovalbumin	45 kDa
	Carboanhydrase	30 kDa
	Trypsin Inhibitor	20 kDa
	α -Lactalbumin	14 kDa

2.12.2.2 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung dient zum Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen, bei denen die aufgetragene Proteinmenge ca. 2-20 μ g beträgt. Hierzu wurde das Gel nach dem Lauf für mindestens 30 min in Färbelösung fixiert und angefärbt. Anschließend wurde das Gel mehrmals für 15 min in Entfärber entfärbt, bis der Gelhintergrund nahezu farblos war. Das entfärbte Gel konnte dann für lange Zeit in H₂O 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

2.12.2.3 Silverstain-Färbung

Die Silverstain-Färbung (BLUM et al. 1987) von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen zeichnet sich durch ihre im Vergleich zur Coomassie-Färbung 10-100fach höhere Sensitivität aus. Proteinmengen bis 10 ng sind daher detektierbar.

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; Fa. Heidolph, Schwabach) durchgeführt und gliederte sich in folgende Arbeitsschritte:

Arbeitsschritt	Dauer	verwendete Lösung	
1. Fixierung	90 min	50 % (v/v)	Ethanol
		12 % (v/v)	Essigsäure
		0.05 % (v/v)	37%iges Formaldehyd
2. Waschen	3x15 min	50 % (v/v)	Ethanol
3. Imprägnierung	1 min	0.01 % (w/v)	Na ₂ S ₂ O ₃
4. Waschen	3x20 sec		H ₂ O
5. Färbung	20 min	0.1 % (w/v)	AgNO ₃
		0.075 % (v/v)	37%iges Formaldehyd
6. Waschen	2x20 sec		H ₂ O
7. Entwicklung	2-10 min	3 % (w/v)	Na ₂ CO ₃
		0.05 % (v/v)	37%iges Formaldehyd
		2*10 ⁻⁴ % (w/v)	Na ₂ S ₂ O ₃
8. Stop	10 min	10 mM	Na ₂ EDTA
9. Lagerung			H ₂ O

2.13 Hybridisierungsmethoden

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

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten als Sonden für das Kolonie-Screening (2.13.2) erfolgte mit dem „Hexalabel DNA Labeling Kit“ (Fa. MBI). Dazu wurden zunächst 100 ng DNA-Fragment mit 10 µl Hexanukleotiden gemischt und auf 40 µl mit H₂O aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 100°C denaturiert und dann auf Eis gestellt. Nun wurden 3 µl Mix A (dNTPs ohne dATP), 50 µCi (6 µl) α³²P-dATP und 1 µl (5 U) Klenow-Fragment zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl dNTP-Mix wurde für weitere 5 min 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 ein

„CONCERT Rapid PCR Purification System“ (Fa. Gibco BRL). Nach der Reinigung wurde ein Aliquot des Eluats im Szintillationszähler gemessen. Die Gesamtaktivität der Sonde sollte nicht geringer als 5000000 cpm sein. Bis zur Hybridisierung wurde die Sonde bei 4°C gelagert.

2.13.2 Kolonie-Screening

Falls bei einer Klonierung die Transformationsrate sehr gering und keine blau/weiß-Selektion möglich war, wurde das Kolonie-Screening angewandt. Diese Methode ist zwar aufwendiger als die Kolonie-PCR oder Mini-Plasmid-Präparation (2.10.5 bzw. 2.8.3.1), doch besteht bei ihr die Möglichkeit, in einem Ansatz mehrere hundert Kolonien auf einmal auf das gewünschte Insert zu überprüfen.

Zunächst wurde die Transformation durchgeführt und die gewachsenen Kolonien auf zweimal fünf LB-Amp-Agarplatten nach einem festen Schema angeimpft. Die erste Platte wurde für das Screening verwendet, die zweite Platte war ein Duplikat der ersten, von der man später die positiven Kolonien für eine weitere Verwendung picken konnte. In der Regel wurden jeweils hundert Kolonien pro Platte angeimpft, d.h. das gesamte Screening umfaßte 500 Kolonien. Nach dem Animpfen wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend für 30 min bei 4°C gelagert. Hierdurch verfestigte sich der Agar, so daß er später nicht an der Nylonmembran haften blieb. Auf jede der fünf Agarplatten wurde eine solche Membran (Hybond N, Fa. Amersham) gelegt und die Orientierung markiert. Nach 30 sec wurde der Filter wieder abgezogen und die Membran mit den Kolonien nach oben auf Fließpapier gelegt und in dieser Orientierung weiterbehandelt.

Es erfolgte nun die Lyse der Bakterien, indem die Membranen für 2 min auf mit 10% (w/v) SDS getränktes Fließpapier gelegt wurden. Im Anschluß folgte die Denaturierung durch Inkubation der Membranen für 4 min auf mit Denaturierungspuffer getränktem Fließpapier. Als nächster Schritt folgte zweimal eine Neutralisierung durch Auflegen der Membranen auf Fließpapier, das mit Neutralisierungspuffer getränkt war. Nun wurden die Nylonmembranen in 2x SSC gewaschen, auf Fließpapier getrocknet und für zwei Stunden bei 80°C gebacken. Hierdurch wurde die DNA kovalent an die Membranen gebunden.

Schließlich wurden die Membranfilter für 15 min in einer Plastikdose bei 42°C in "rubbing solution" im Schüttelwasserbad gewaschen, danach Bakterienreste mit einem von "rubbing solution" getränkten Haushaltspapier abgerieben, und für weitere 20 min gewaschen. Nach dem Trocknen konnten die Membranen dann mit einer spezifischen ³²P-markierten Sonde hybridisiert werden (2.13.3).

LB-Agarplatten: siehe 2.8.3.1

Denaturierungspuffer:	NaCl	1.5 M
	NaOH	0.5 M

Neutralisierungspuffer:	NaCl	1.5 M
	Tris/HCl pH 7.5	0.5 M
20x SSC:	NaCl	3 M
	Na-Citrat pH 7.0	0.3 M
"rubbing solution":	Tris/HCl pH 8.0	0.2 M
	NaCl	1 M
	SDS	0.1 % (w/v)

2.13.3 Hybridisierung

Die Nylonmembranen, an die im Rahmen eines Kolonie-Screenings (2.13.2) DNA gebunden war, wurden in 25 ml Hybridisierungspuffer für mindestens 1 h bei 65°C im Schüttelwasserbad prähybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde (2.13.1) wurde währenddessen für 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend zu den prähybridisierten Filtern gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im Schüttelwasserbad bei 65°C. Im Anschluß wurden die Filter bei 65°C zweimal 20 min mit 2x SSC mit 0.1% SDS und einmal mit 0.1x SSC mit 0.1% SDS gewaschen. Die Filter wurden kurz getrocknet und in Frischhaltefolie luftblasenfrei verpackt. Die Hybridisierungssignale wurden durch Exposition der Filter mit einem Phospho-Imager (Fuji BAS-1000; Fa. Raytest, Sprockhövel) sichtbar gemacht. Die Expositionsdauer betrug zwischen 2 Stunden und 3 Tagen.

Hybridisierungspuffer:	SSC	5x
	Denhardt's	5x
Denhardt's (100x):	Ficoll 400	2 % (w/v)
	PVP	2 % (w/v)
	BSA (entfettet)	2 % (w/v)
	SDS	0.5 % (w/v)
20x SSC:	NaCl	3 M
	Na-Citrat pH 7.0	0.3 M

2.14 Semi-Quantitative RT-PCR

Um die Expression eines Gens auf RNA-Ebene zu untersuchen gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten: Den RNA-Gel-Blot und die Semi-Quantitative RT-PCR. Im Gegensatz zum RNA-Gel-Blot werden für eine Semi-Quantitative RT-PCR nur geringe Mengen der zu untersuchenden RNA-Population benötigt, da die Zielsequenz durch PCR enorm amplifiziert wird. Dies kann sich z.B. bei schwach exprimierten Genen als Vorteil erweisen oder auch bei sehr geringen Mengen an Ausgangsmaterial. Beides ist bei der Untersuchung von Phloemsaft der Fall. Normalerweise steht für ein Experiment weniger als 1 µl Phloemsaft, der mit Hilfe von Apheriden gewonnen wurde (2.4.1), zur Verfügung. Dementsprechend ist der Gehalt an RNA äußerst gering.

Um die Expressionsstärke eines Gens in verschiedenen Proben zu bestimmen, benötigt man einen Abgleich der aufgetragenen RNA-Menge, der bei RNA-Gel-Blots durch Hybridisierung mit einem konstitutiv exprimierten Gen (z.B. Ubiquitin, Actin) erfolgt. Dies ist für die Semi-Quantitative RT-PCR ebenfalls möglich. Allerdings sollte bei diesem Abgleich nicht nur sichergestellt sein, daß die RT-PCR jeweils mit der gleichen Menge RNA durchgeführt wird, sondern auch, daß die cDNA-Synthese (RT) und die anschließende PCR mit gleicher Effektivität in allen Proben ablaufen. Diese kann zum Teil unterschiedlich sein, wenn wie im Fall des Phloemsafts keine aufgereinigte RNA vorliegt. Im Phloemsaft befinden sich Metabolite und Ionen in hohen Konzentrationen, die inhibitorisch auf die Enzyme Reverse Transcriptase und *Taq*-Polymerase wirken können.

Daher wurden sogenannte interne RNA-Standards hergestellt, die die gleichen Primerbindungsstellen für die cDNA-Synthese und die anschließende PCR besaßen wie die zu untersuchenden Gene *AbSUT1* und *AmSUT1*. Dieser interne RNA-Standard wurde direkt zum RNA-Ausgangsmaterial gegeben und durchlief daher alle Versuchsschritte genau wie die zu untersuchende mRNA. Es wurde eine Semi-Quantitative RT-PCR durchgeführt, d.h. es wurden die quantitativen Unterschiede zwischen den einzelnen Proben untersucht. Im Gegensatz dazu kann bei der Quantitativen RT-PCR auch die Anzahl der Moleküle, z.B. durch radioaktive Hybridisierung, angegeben werden.

2.14.1 Herstellung interner RNA-Standards

Die internen RNA-Standards für *AbSUT1* und *AmSUT1* mußten folgende Merkmale haben:

- Bindungsstellen für die jeweiligen Primer (Ab-for/-rev; Am-for/-rev)
- das Amplifikationsprodukt des internen Standards muß sich in der Größe vom zu untersuchenden Amplifikationsprodukt unterscheiden

Da die mit den Primern *Ab-for* und *Ab-rev* bzw. *Am-for* und *Am-rev* (2.1.4) erwarteten Amplifikationsprodukte von *AbSUTI* und *AmSUTI* jeweils ein Länge von 294 bp ergaben, sollte der interne RNA-Standard um ca. 300-400 bp größer sein, um bei gleicher Elongationszeit in der PCR trotzdem noch eine gute Auftrennung bei der Analyse im Agarose-Gel zu ermöglichen. Als einfachster Weg erwies sich die Klonierung eines fremden DNA-Fragments in das cDNA-Fragment des jeweiligen Transporters.

Für die Konstruktion des internen Standards *AbIS* zur Untersuchung von *AbSUTI* wurde durch PCR (2.10.2) ein modifiziertes *AbSUTI*-Fragment amplifiziert. Dies geschah mit einem 5'-Primer, der durch einen Basenaustausch (T→C) an Position 174 des ORF von *AbSUTI* eine *Bam*HI-Schnittstelle besaß (5'-TCCCTGTTGACACCATACGTTTCAGTTGCTGGGGATCCCGC-3'). Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in pGEM-T Easy kloniert und mit *Bam*HI verdaut. In die nun entstandene Lücke wurde ein 331 bp *Bam*HI-Fragment des Plasmids pRSA13 (PAWLOWSKI et al. 1987) kloniert. Dies ergab einen *AbIS* von 625 bp Länge.

Der interne Standard für *AmSUTI*, *AmIS*, wurde sehr ähnlich hergestellt. Hierbei wurde das in pGEM-T Easy vorliegende 294 bp *AmSUTI*-Fragment direkt mit *Nar*I verdaut. In die Lücke wurde in diesem Fall ein 373 bp *Nar*I-Fragment des Plasmids pRSA13 kloniert, was einen *AmIS* von 667 bp Länge ergab. Durch *in vitro*-Transkription konnten nun auf der Basis der neu konstruierten Plasmide die RNAs von *AbIS* und *AmIS* synthetisiert werden.

2.14.2 *in vitro*-Transkription

Um eine *in vitro*-Transkription durchzuführen mußte als erstes das Plasmid linearisiert werden, das die zu transkribierende Region enthielt. Das Plasmid wurde mit einem Restriktionsenzym verdaut, das auf der 3'-Seite des Inserts schnitt. Im Fall von pGEM-T Easy war dies *Sal*I.

Zu 2.5 µg des linearisierten Plasmids wurden 4 µl 5x T7-RNA-Polymerase-Puffer, 1 µl 25 mM NTPs, 1 µl T7-RNA-Polymerase (Fa. Gibco BRL), 1 µl DTT und 0.5 µl RNase-Inhibitor gegeben. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Es erfolgte nun eine Inkubation bei 37°C für 4 h. Im Anschluß daran wurde die Menge an synthetisierter RNA durch Analyse von 1 µl des Ansatzes in einer Agarose-Gelelektrophorese bestimmt (2.12.1). War eine genügend große Menge RNA gebildet worden, wurde dem Ansatz 1 µl RNase-freie DNase (RQ1; Fa. Promega) zugesetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Dadurch wurde das linearisierte Plasmid abgebaut. Um die RNA zu reinigen, wurden 2.5 µl 4 M LiCl und 75 µl abs. Ethanol zugegeben. Es folgte eine Fällung über Nacht bei -20°C. Nach einer Zentrifugation für 15 min wurde das Pellet mit 150 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet kurz getrocknet und im gewünschten Vol. H₂O gelöst.

2.14.3 RT-PCR

Um die organ- oder gewebespezifischen Amplifikationsraten vergleichen zu können, wurden verschiedene Konzentrationen an internem RNA-Standard *AbIS* oder *AmIS* zu jeweils 1 µg Gesamt-RNA der zu untersuchenden Gewebe gegeben. Es sollte soviel RNA-Standard in der Probe sein, daß nach cDNA-Synthese und PCR die Intensität der Standard-Bande in etwa der stärksten untersuchten Bande von *AbSUT1* oder *AmSUT1* entsprach. Zudem sollte die Zyklenzahl der PCR so gewählt sein, daß die Amplifikation im exponentiellen Bereich lag.

Als Primer für die cDNA-Synthese dienten die gen- und RNA-Standard-spezifischen Primer *Ab-rev* bzw. *Am-rev*. Die cDNA-Synthese verlief wie folgt: 1 µg Pflanzen-RNA, 1-100 pg interner RNA-Standard und 1 µl *Ab-rev* oder *Am-rev*-Primer (50 µM, 2.1.4) wurden mit H₂O auf 12.8 µl aufgefüllt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Die Probe wurde wieder auf Eis gestellt und 4 µl 5x RT-Puffer (Fa. MBI), 2 µl 10 mM dNTP, 0.5 µl RNase-Inhibitor (Fa. MBI) und 0.7 µl M-MuLV-Reverse Transcriptase (Fa. MBI) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C. Um die Reverse Transcriptase zu inaktivieren, erfolgte ein fünfminütiges Erhitzen auf 95°C. 2 µl des Ansatzes wurden für jeweils einen PCR-Ansatz verwendet.

Die PCR (2.10.2) lief unter folgenden Bedingungen ab:

94°C 5 min (Denaturierung)

94°C 1 min (Denaturierung)

65°C 1 min (Annealing)

72°C 1.5 min (Elongation)

Dieser Zyklus wurde 35x wiederholt.

72°C 10 min (terminale Elongation)

Um eine Kontamination der RNA durch DNA auszuschließen, wurden die PCRs auch ohne vorherige cDNA-Synthese durchgeführt. Falls DNA vorhanden gewesen wäre, wären Amplifikationsprodukte gebildet worden. Um die Möglichkeit von unspezifischer Amplifikation auszuschließen, wurden einige der Amplifikate sequenziert.

2.14.4 Semi-Quantitative RT-PCR von Phloemsaft

Die Untersuchung von Phloemsaft auf das Vorhandensein von mRNAs mittels Semi-Quantitativer RT-PCR verlief im Prinzip wie die Untersuchung von Pflanzenorganen. Nur galt hier als Bezugsgröße

das eingesetzte Volumen. Da die Proben vermutlich äußerst geringe mRNA-Mengen enthielten, wurden dementsprechend nur 10-100 fg interner RNA-Standard bei der cDNA-Synthese zugesetzt. Um die Degradation der mRNA während der Phloemsaftgewinnung (2.4.1) zu minimieren, wurden sterile Mikrokapillaren für das Sammeln der Proben verwendet. Die Möglichkeit einer Kontamination des Phloemsafts mit Zellinhalt von Mesophyllzellen wurde durch RT-PCR mit einem mesophyll-spezifischen Marker, der eigens dafür isoliert wurde (3.3.3), ausgeschlossen.

2.15 Immunologische Untersuchungen

Mit immunologischen Methoden werden Proteine charakterisiert und lokalisiert. Dies sollte in dieser Arbeit für das AmSUT1-Protein erfolgen. Dazu wurde zunächst ein Antikörper gegen AmSUT1 hergestellt. Mit diesem konnte dann im Western-Blot bzw. durch Immunlokalisation das gewebespezifische Vorkommen des Transporters charakterisiert werden.

2.15.1 Herstellung eines Antikörpers

Für die immunologischen Untersuchungen wurde ein polyklonaler anti-AmSUT1-Peptid-Antikörper hergestellt. Dazu wurden zunächst kurze Peptidabschnitte von AmSUT1 ausgesucht, die vermutlich nicht zu einem Transmembranbereich gehören und eine hohe Antigenizität besitzen. Dies wurde mit Hilfe von Computerprogrammen (2.19.2) analysiert. Besonders der N- bzw. C-Terminus schienen geeignet, um als Antigen zu dienen. Diese beiden Regionen führen in den meisten Fällen zu Antikörpern hoher Affinität und Spezifität (N. SAUER, pers. Mitteilung). Daher wurden zwei Oligopeptide synthetisiert, die Sequenzen des N- bzw. C-Terminus entsprachen:

Peptid des N-Terminus: MEVGNEAKSTALPPAQA

Peptid des C-Terminus: SPPSDVKILATGGH

Das Peptid des N-Terminus von AmSUT1 wurde C-terminal an das Carrier-Protein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gekoppelt, das Peptid des C-Terminus wurde entsprechend N-terminal an KLH gekoppelt, um die Ausrichtung des Antigens möglichst natürlich zu gestalten. Die Antigene wurden jeweils drei Kaninchen injiziert und jeweils nach 30 Tagen geboostet bzw. Antiseren gewonnen. Sowohl die Peptid-Synthese als auch die Immunisierung der Tiere wurde von der Fa. Pineda Antikörper-Service (Berlin) durchgeführt.

Zeitpunkt	Vorgang	Art	Serum [ml]
Tag 1	Blutabnahme		1.5
Tag 1	Immunisierung	subcutan	
Tag 30	Immunisierung	subcutan	
Tag 60	Immunisierung	subcutan	
Tag 60	Blutabnahme		1.5
Tag 90	Immunisierung	subcutan	
Tag 90	Blutabnahme		1.5
Tag 110	Blutabnahme		75 (C-AK)
Tag 120	Immunisierung	subcutan (N-AK)	
Tag 120	Blutabnahme		1.5 (N-AK)
Tag 135	Blutabnahme		75 (N-AK)

2.15.2 Western-Blot

2.15.2.1 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen

Nachdem die zu untersuchenden Proben durch eine SDS-PAGE (2.12.2) aufgetrennt worden waren, wurde das Gel in eine Western-Blot-Kammer eingespannt. Der Aufbau war entsprechend der Flußrichtung von – zu + folgendermaßen:

Auf 3 Lagen mit Blotpuffer angefeuchtetes Fließpapier wurde das Gel gelegt. Hierauf kam die vorher zurechtgeschittene Nitrocellulosemembran (Fa. Schleicher & Schüll), gefolgt von 3 weiteren Lagen Fließpapier. Der Transfer erfolgte in der mit Blotpuffer gefüllten Kammer für 3 h bei 4°C und einer limitierenden Stromstärke von 90 mA.

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

2.15.2.2 Färbung des Blots

Die Nitrocellulosemembran wurde unter Blotpuffer aus der Halterung entfernt und anschließend für 2 min in Färbelösung gefärbt. Diese fixiert die Proteine, die Färbung ist reversibel und dient als Kontrolle für die Übertragung. Anschließend wurde die Färbung mit H₂O abgewaschen. Zur

Dokumentation wurden die Markerbanden mit Bleistift markiert. Der Blot wurde nun auf die passende Größe zurechtgeschnitten und auf der Proteinseite mit Bleistift gekennzeichnet.

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

2.15.2.3 Antikörperreaktion

Die Nitrocellulosemembran wurde zur Absättigung überschüssiger Bindungskapazitäten für 2 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer auf einem Kippschüttler (Polymax 1040; Fa. Heidolph) inkubiert. Gleichzeitig erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper in der gewünschten Verdünnung (zwischen 1:300 und 1:1000). Das simultane Blocken und Antikörperbinden verringerte die Anzahl unspezifischer Banden.

Anschließend wurde der Blot einmal kurz und dreimal für 15 min in TBS-T gewaschen, um nicht oder unspezifisch gebundene IgG-Moleküle zu entfernen. In einer anschließenden Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Protein („Anti Rabbit-Protein A Horseradish Peroxidase Conjugate“; Fa. Bio-Rad, München, 1:10000 in TBS-T) für 1 h wurde der Sekundär-Antikörper an die auf dem Blot haftenden Primär-Antikörper gebunden. Es folgten wieder Waschschrte, einmal kurz und dreimal für 15 min in TBS-T. Zum Schluß erfolgte noch ein Waschschrte mit TBS.

TBS:	Tris/HCl pH 7.5	50 mM
	NaCl	150 mM

TBS-T:	Triton-X-100	0.1 % (v/v)
	in TBS	

Blockpuffer:	Trockenmilchpulver	1 % (w/v)
	in TBS-T	

2.15.2.4 Peroxidase-Nachweis über „Enhanced Chemiluminescence“

Die Methode der „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL) dient als empfindlicher Nachweis der Reaktion der an Protein A gekoppelten Peroxidase. Unter alkalischen Bedingungen katalysiert die Peroxidase die Oxidation von Luminol durch H_2O_2 , wodurch Luminol zur Lichtemission angeregt wird. Verstärkt wird diese Reaktion durch Phenole. Die Halbwertszeit der Reaktion beträgt ca. 1 h.

Die Nitrocellulosemembran wurde mit der Proteinseite nach oben auf eine mit Haushaltsfolie belegte Platte gelegt. Es mußte darauf geachtet werden, daß die Membran völlig plan lag. Es wurden nun 2 ml ECL-Lösung 1 und 2 ml ECL-Lösung 2 (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) gemischt, auf die Membran gegeben und für 1 min unter Schwenken inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt und die Membran luftblasenfrei mit Haushaltsfolie bedeckt. Es wurde nun sofort für 1 min ein Film (Hyperfilm ECL; Fa. Amersham Pharmacia) aufgelegt, anschließend ein zweiter für 10 min und ggf. noch ein dritter für eine angepasste Zeit (20 sec oder 1 h). Nach dem Abnehmen des Films wurde er entwickelt (Entwickler und Fixierer Fa. Kodak).

2.15.3 Immunohistochemischer Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten

Die Immunolokalisation von AmSUT1 wurde mit geringen Modifikationen nach STADLER durchgeführt (STADLER et al. 1995, STADLER und SAUER 1996).

2.15.3.1 Einbettung von Pflanzengewebe in Methacrylat

Es wurden ca. 1x5 mm große Stücke aus verschiedenen Geweben von *Alonsoa meridionalis* geerntet und in 10 ml Schnapdeckel-Gläschen überführt, die 3 ml Fixierungslösung (Ethanol:Essigsäure im Verhältnis 3:1, v/v) enthielten. Die Gewebe wurden in einem Exsikkator entlüftet, 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 70% techn. Ethanol, 1 mM DTT gewaschen. Anschließend wurde über eine Ethanolreihe auf Eis entwässert. Hierzu wurden die Gewebe jeweils 20 min mit 80, 85, 90, 95 % techn. Ethanol, 1 mM DTT und anschließend zweimal 20 min mit 99.8% Ethanol p.a., 10 mM DTT behandelt. Die Infiltration mit Methacrylat erfolgte bei 4°C in folgender Weise:

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)
6 h	Methacrylat-Mix	
über Nacht	Methacrylat-Mix	
über Nacht	Methacrylat-Mix	

Zur Polymerisation wurden die Proben in ultradünne 0.2 ml PCR Cups überführt und diese vollständig mit Methacrylat-Mix aufgefüllt. Der von den Cups zuvor entfernte Deckel wurde verkehrt herum aufgelegt. Das Auspolymerisieren erfolgte für ca. 15 h bei 4°C durch Bestrahlung der Proben von unten mit UV-Licht (310 nm, ca. 15 cm Abstand).

Methacrylat-Mix:	75 % (v/v)	Butyl-Methacrylat
	25 % (v/v)	Methyl-Methacrylat
	0.5 %	Benzoinethylether
	10 mM	DTT

vor jedem Gebrauch 15 min mit N₂ entgasen

2.15.3.2 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.

2.15.3.3 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 nun der primäre Antikörper in der gewünschten Verdünnung (für anti-AmSUT1-Antikörper 1:500 bis 1:5000 in Blockpuffer) pipettiert und die Proben über Nacht bei 4°C gelagert.

Am folgenden Tag wurden die Deckgläschen entfernt und die Objektträger in Bechergläsern für 3x10 min mit Blockpuffer gewaschen. Es folgte nun eine Inkubation für 1 h mit dem sekundären Antikörper. Dies war Anti-Rabbit IgG-Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-Isomer 1-Konjugat (Fa. Sigma, 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 5x5 min in Blockpuffer entfernt. Um alle Reste des Trockenmilchpulvers von

den Objektträgern zu beseitigen, folgten noch drei weitere Waschschr tte in H₂O. Zum schnelleren Trocknen der Proben wurden die Objektträger zum Abschluß kurz in abs. Ethanol getaucht. Nun wurden auf die Schnitte ca. 10 µl Anti-Fading Kit (Fa. Molecular Probes, Leiden, Niederlande) gegeben und das Ganze mit Deckgläschen bedeckt. In diesem Zustand war die FITC-Fluoreszenz für ca. eine Woche nachweisbar. Hierzu wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop; Fa. Zeiss, Göttingen) mit Videokamera genutzt. Die grünliche FITC-Fluoreszenz wurde durch ein Anregungslicht von 450-490 nm hervorgerufen.

Um die FITC-Markierung bestimmten Zelltypen (Intermediärzellen bzw. Siebelementen) zuweisen zu können, wurden die Schnitte zum Teil auch mit anderen Farbstoffen behandelt. Um Siebelemente erkennen zu können, wurden die Schnitte nach dem letzten Waschschr tt in H₂O für 5 min in Anilinblau (0.5% (w/v) in 200 mM NaPO₄-Puffer pH 7.2) angefärbt. Anilinblau färbt spezifisch die Callose-Ablagerungen an den Siebplatten an. Um Intermediär- oder Geleitzellen von den Siebelementen unterscheiden zu können, wurde der Farbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, 0.2 µg/ml) eingesetzt. Dieser färbt die Zellkerne an, die zwar in Intermediärzellen, aber nicht in Siebelementen vorhanden sind. Die Dauer der DAPI-Färbung war 1 h. Beide Färbungen wurden im Dunkeln durchgeführt, um die FITC-Antikörper nicht zu schädigen. Nachdem die Färbelösungen abgewaschen waren, wurden die Proben wie oben beschrieben weiterbehandelt. Die bläuliche Anilinblau- und DAPI-Fluoreszenz wurde bei einem Anregungslicht von 365 nm beobachtet.

TBS:	Tris/HCl pH 7.5	50 mM
	NaCl	150 mM

Blockpuffer:	Trockenmilchpulver	1 % (w/v)
	in TBS (ohne Triton-X-100)	

2.16 Histochemischer GUS-Test

Das Reportergen β -Glucuronidase (GUS) ermöglicht es, die Aktivität und Gewebespezifität von Promotoren innerhalb eines Pflanzensystems zu untersuchen. Dazu wird zunächst eine Pflanze mit einem Konstrukt, bei dem GUS unter Kontrolle des zu untersuchenden Promotors steht, transformiert. Nach Regeneration transgener Pflanzen kann dann in Teilen oder auch ganzen Pflanzen die Lokalisation der Promotoraktivität bestimmt werden. Dies beruht zum einen auf der Tatsache, daß GUS nicht endogen in Pflanzen vorkommt, und zum anderen darauf, daß GUS von dem synthetischen Substrat x-Gluc einen Glucurons urerest abspaltet. Durch oxidative Dimerisierung von zwei Resten entsteht ein unlöslicher indigoblauer Farbstoff. Pflanzenteile, in denen der Promotor aktiv ist, färben sich daher blau.

Zur Färbung wurde eine modifizierte Methode von JEFFERSON et al. (1987) verwendet. Dazu wurde die x-Gluc Stammlösung 1:50 in GUS-Waschpuffer verdünnt. In diese Lösung wurde das zu untersuchende Pflanzenmaterial gegeben und mittels eines Wasserstrahlvakuum mehrmals infiltriert. Nach vollständiger Infiltration wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß oder Falcon-Tube mit Aluminiumfolie umwickelt, um das lichtempfindliche x-Gluc zu schützen. Die Probe wurde nun bei 37°C inkubiert. Je nach Promotoraktivität wurde die Reaktion nach mehreren Stunden oder nach ein oder zwei Tagen gestoppt. Dies geschah durch Überführung der Probe in GUS-Fixativ, worin sie für 1 h inkubiert wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation in 70% Ethanol, gefolgt von einer Inkubation über Nacht in 99.6% Ethanol. Hierdurch wurden die pflanzlichen Farbstoffe (v.a. Chlorophyll) aus dem Gewebe entfernt. Am nächsten Tag wurde die Probe wieder in 70% Ethanol überführt. In diesem Zustand konnte sie für lange Zeit gelagert werden.

GUS-Waschpuffer: 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6.8
1 mM EDTA
0.1% Tween 20 (v/v)

x-Gluc Stammlösung: 100 mM x-Gluc (in DMF)

GUS-Fixativ: 50% Ethanol
10% Essigsäure
5% Formaldehyd

2.17 Nachweis von GFP-Fluoreszenz

Neben der β -Glucuronidase gibt es ein weiteres gebräuchliches Reporterogen, das „green fluorescent protein“ (GFP, TSIEN 1998). Dieses Protein stammt aus der Quallenart *Aequorea victoria* und besitzt die Eigenschaft, bei Einstrahlung von Licht einer gewissen Wellenlänge grün zu fluoreszieren. Das in dieser Arbeit verwendete GFP besitzt ein Anregungsmaximum bei 479 nm Wellenlänge, woraus eine starke Fluoreszenz bei 510 nm resultiert (REICHEL et al. 1996).

Transformiert man nun eine Pflanze mit einem Konstrukt, in dem GFP unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors steht, so zeigt sich bei Beobachtung der Pflanze unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 35; Fa. Zeiss) eine grüne Färbung. Zur Anregung dient Licht der Wellenlänge 450-490 nm. Zusätzlich zu GUS wurde GFP als Reporterogen eingesetzt, da GFP aufgrund seines geringeren Molekulargewichts (26 kDa) in der Lage ist, durch bestimmte Typen von Plasmodesmata hindurchzuwandern (IMLAU et al. 1999). Dies wurde insbesondere für die Plasmodesmata zwischen Siebelementen und Geleitzellen gezeigt.

GUS zeigt also die Zelltypen an, in denen der Promotor aktiv ist, wohingegen GFP zusätzlich auch in Zellen zu finden ist, die symplastisch mit den aktiven Zellen verbunden sind. Ein Nachteil von GFP besteht allerdings darin, daß die Nachweisgrenze für die Aktivität eines Promotors sehr viel höher ist als bei GUS.

2.18 Messung von *in vivo*-Transportaktivitäten

2.18.1 Vorbereitung der Hefekulturen

Die mit cDNAs für vermutliche Saccharose-Transporter transformierten Hefen (2.11.6.3) wurden über Nacht in 100 ml CAAG-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 1-2 angezogen. Die Kultur wurde auf zwei Falcon-Tubes aufgeteilt und für 5 min bei 4500 Upm pelletiert (Megafuge 1.0). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in jeweils 50 ml 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer des gewünschten pH-Werts (normalerweise pH 5.5) durch Vortexen resuspendiert. Es wurde wiederum für 5 min bei 4500 Upm zentrifugiert und die Pellets mit 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer auf 10 OD/ml verdünnt. Auf Eis gelagert konnten die Hefezellen ca. einen Tag für ¹⁴C-Saccharose-Aufnahmetests benutzt werden.

CAAG-Medium:	Casaminoacids	1 %
	Yeast Nitrogen Base	0.67 %
	Glucose	2 %
	ggf. 1.5 % Agar	

2.18.2 ¹⁴C-Saccharose-Aufnahmetest

1 ml der zu untersuchenden Hefekultur (2.18.1) wurde in einen 25 ml Erlenmeyer-Kolben pipettiert und für 2-3 min bei 29°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nun wurden 10 µl 1 M Glucose zugegeben. Dies führte zur stärkeren Energetisierung der Hefemembran und damit zu einer gesteigerten Aufnahmerate (SAUER und STOLZ 2000). Nach 1 min wurde der Aufnahmetest durch Zugabe von 11 µl ¹⁴C-Saccharose-Lösung gestartet. Die ¹⁴C-Saccharose-Lösung setzte sich aus 1 µl ¹⁴C-Saccharose (400000 cpm) und 10 µl 100 mM "kalter" Saccharose zusammen. Dies ergab eine 1 mM Endkonzentration in der Hefe-Suspension.

Direkt nach Zugabe der Saccharose wurde die erste 100 µl Probe entnommen. Diese wurde in eine mit H₂O gefüllte Absaugvorrichtung pipettiert, in der sich eine Nitrocellulosemembran (Porengröße 0.8 µm; Fa. Schleicher & Schüll) befand. Auf der Membran waren nun die Hefezellen, die unterschiedliche Mengen Saccharose inkorporiert hatten. Anschließend wurde noch einmal mit H₂O

nachgespült. Es folgten fünf weitere Probeentnahmen nach 2, 4, 6, 8 und 10 min.

Nach Beendigung des Aufnahmetests wurden die sechs Nitrocellulosefilter in kleine Szintillationsgefäße mit 4 ml Szintillationscocktail überführt und die Radioaktivität gemessen. Zum Abgleich verschiedener Messungen wurde zusätzlich jeweils die Radioaktivität in 100 µl der Kultur zur Berechnung der Gesamtaktivität gemessen.

Für Wettbewerbsversuche wurden die zu testenden Zucker (z.B. Maltose, Raffinose) in 10-fachem Überschuß (10 mM Endkonzentration) vor dem Start zur Hefesuspension gegeben. Auch in den Inhibitionsstudien mit CCCP und PCMBS (jeweils 50 µM Endkonzentration) wurden die Substanzen vor dem Start der Reaktion zugegeben.

2.19 Computergestützte Analyseverfahren

2.19.1 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 GenBank 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 gehörten Programme, mit denen Nukleotid- in Aminosäure-Sequenzen übersetzt werden konnten; Programme, die Restriktionsschnittstellen und ORFs finden konnten, oder auch Programme, mit denen sogenannte Alignments erstellt werden konnten. Nähere Beschreibungen der einzelnen Funktionen sind unter der Internet-Adresse <http://gcg.gwdg.de> abrufbar.

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>)

2.19.2 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 waren die Analyse von putativen transmembranen α -Helices und die Untersuchung der

Antigenizität besonders wichtig, da durch diese Informationen zum einen die Verwandtschaft zu anderen Transportproteinen definiert und zum anderen mögliche Bereiche zur Herstellung von Antikörpern (2.15.1) gefunden werden konnten. Als Online-Ressource wurde das Programm PredictProtein (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein>) genutzt. Desweiteren wurden diverse Proteinanalyse-Programme des Wisconsin Package der Genetics Computer Group (GCG) verwendet.

2.20 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 (SD) aufgeführt. 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 Metabolitgehalte in den untersuchten Scrophulariaceen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Phloembeladung von zwei Pflanzenarten mit offener Phloemanatomie, *Alonsoa meridionalis* und *Asarina barclaiana*, untersucht. *Alonsoa* ist in den westlichen Ländern Südamerikas beheimatet, wohingegen *Asarina* aus dem mittelamerikanischen Raum stammt. Diese beiden Pflanzenarten boten sich als Untersuchungsobjekte an, da aus ihnen Phloemsaft mit der Laser-Aphiden-Technik gewonnen werden kann.

Es wurden zunächst die im Blatt vorhandenen Zucker-, Zuckeralkohol- sowie Aminosäuregehalte bestimmt. Diese Metabolite werden potentiell aus den Source-Blättern durch das Phloem zu den Sink-Geweben transportiert. Neben Blattextrakten wurden ebenfalls einzelne Blattgewebe auf ihre Metabolit-Konzentrationen hin untersucht. Dies war zum einen als wichtigstes Gewebe für die Charakterisierung des Phloemtransports das Phloem selbst. Zum anderen wurden auch die Metabolite im Apoplasten analysiert, da es sich um ein essentielles Kompartiment für die apoplastische Phloembeladung handelt und bisher nicht geklärt ist, ob es auch in vermutlich symplastischen Phloembeladern eine Funktion bei der Beladung besitzt.

3.1.1 Metabolitgehalte in *Alonsoa meridionalis*

Lösliche Metabolite wurden durch Chloroform-Methanol-Extraktion (2.2.1) aus den Blättern extrahiert. Apoplastensaft wurde mittels der Infiltrations-Zentrifugationsmethode (2.3.1) gewonnen. Die Metabolit-Konzentrationen im Phloem wurden in Phloemsaft analysiert, der durch die Laser-Aphiden-Technik (2.4.1) gewonnen wurde.

Die Analyse der Reinheit des Apoplastensafts durch Messung der Aktivität der Malat-Dehydrogenase zeigte eine Aktivität im Blattextrakt von $52 \mu\text{mol g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$ im Gegensatz zur apoplastischen Aktivität von $0.001 \mu\text{mol g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$. Dies entsprach einer Kontamination von weniger als 0.1%.

3.1.1.1 Zucker

Die Gehalte bzw. Konzentrationen von Zuckern und Zuckeralkoholen wurden durch HPLC (2.5.1) bestimmt. In *Alonsoa* und *Asarina* konnten die Monosaccharide Glucose, Fructose, Galactose, das Disaccharid Saccharose, die Oligosaccharide Raffinose, Stachyose und Verbascose, sowie deren

Vorstufen Galactinol und *myo*-Inositol und als weiterer Zuckeralkohol Mannitol nachgewiesen werden.

In Tabelle 1 sind die Zuckergehalte im Blatt und die Zuckerkonzentrationen im Apoplast von *Alonsoa meridionalis* dargestellt. Saccharose und deren Monomere Glucose und Fructose sind sowohl im Blatt als auch im Apoplasten mit 75-80% die vorherrschenden Zucker. Raffinose-Oligosaccharide sind hingegen nur in geringen Konzentrationen vorhanden. Dagegen wurden im Blatt substantielle Mengen der Vorstufe *myo*-Inositol gefunden. Im Apoplast war die Konzentration der Vorstufe Galactinol mit 1.4 mM recht hoch.

Tab. 1: Zucker-Konzentrationen im Source-Blatt (n = 6) und Apoplast (n = 8) von *Alonsoa meridionalis* während der Lichtperiode (n.d. = nicht nachweisbar).

	Source-Blatt $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW	Apoplast mM
<i>myo</i> -Inositol	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.2
Galactinol	0.4 ± 0.1	1.4 ± 0.3
Mannitol	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1
Galactose	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Glucose	2.3 ± 0.3	3.5 ± 0.6
Fructose	2.8 ± 0.3	3.6 ± 0.8
Saccharose	5.5 ± 0.4	2.1 ± 0.8
Raffinose	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Stachyose	0.6 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Verbascose	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Σ Zucker und Zuckeralkohole	13.6	12.3
Stärke ($\mu\text{mol Glucose g}^{-1}$ FW)	55 ± 10	n.d
Σ C in den Verbindungen	465	103

Im Vergleich mit den Konzentrationen in Blatt und Apoplast ist die Zucker-Zusammensetzung und deren Konzentration im Phloemsaft vollkommen anders (Tab. 2). Die Raffinose-Oligosaccharide Raffinose und Stachyose machen ca. 80% der transportierten Zucker aus. Die übrigen 20% setzen sich hauptsächlich aus Saccharose und zu einem wesentlich geringeren Anteil aus *myo*-Inositol zusammen. Dieses Verhältnis verschiebt sich noch weiter zu Gunsten der Raffinose-Oligosaccharide, wenn berücksichtigt wird, daß bei diesen mehr Kohlenstoff pro Molekül transportiert wird als bei Saccharose. Die Gesamt-Konzentration der Zucker ist mit ca. 0.8 M fast so hoch wie in apoplastischen

Phloembeladern (LOHAUS und FISCHER 2001) und ändert sich zwischen Licht- und Dunkelperiode kaum (Tab. 2).

Tab. 2: Zucker-Konzentrationen im Phloensaft von *Alonsoa meridionalis* während der Licht- und Dunkelperiode (n = 8, n.d. = nicht nachweisbar).

	Licht	Dunkel
	mM	
<i>myo</i> -Inositol	10 ± 2.5	13 ± 1.6
Galactinol	2 ± 0.1	1 ± 0.5
Mannitol	0.2	0.1
Galactose	1 ± 0.3	1 ± 0.4
Glucose	≤ 0.1	≤ 0.1
Fructose	≤ 0.1	≤ 0.1
Saccharose	132 ± 33	161 ± 14
Raffinose	252 ± 58	247 ± 7
Stachyose	356 ± 3.3	413 ± 40
Verbascose	≤ 0.1	≤ 0.1
Σ Zucker und Zuckeralkohole	753	836
Stärke (μmol Glucose g ⁻¹ FW)	n.d.	n.d.
Σ C in den Verbindungen	14755	16383

3.1.1.2 Aminosäuren

Aminosäuregehalte und -Konzentrationen wurden ebenfalls durch HPLC (2.5.2) bestimmt. Mit dieser Methode konnten alle proteinogenen Aminosäuren außer Prolin und Cystein detektiert werden. Zudem wurden einige verwandte Substanzen, wie Phosphoserin und γ -Aminobuttersäure (GABA) bestimmt.

In Tabelle 3 sind die Aminosäuregehalte im Blatt sowie die Aminosäure-Konzentrationen im Phloem und Apoplast von *Alonsoa meridionalis* dargestellt. Die Pflanzen wurden hydroponisch in 10 mM Nitrat-Nährlösung angezogen, um eine konstante Stickstoff-Versorgung zu gewährleisten. Die größten Anteile an den Gesamt-Aminosäuren im Blatt, Apoplast und Phloem hatten Glutamin, Glutamat und Serin. Dies ist nicht verwunderlich, da Glutamin und Glutamat die Hauptprodukte der Nitrat-Assimilation darstellen. Zusätzlich war lediglich Aspartat in Blatt und Phloensaft in größerem Umfang zu finden. Alle anderen Aminosäuren waren nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Der Gesamt-Aminosäure-Gehalt von 10.7 μmol g⁻¹ FW im Blatt lag in einer ähnlichen Größenordnung

wie er von MITCHELL et al. (1992) für *Cucumis melo* bestimmt wurde ($15 \mu\text{mol g}^{-1}$ FW). Die Gesamt-Konzentration der Aminosäuren im Apoplast liegt im unteren millimolaren Bereich, wie dies auch von anderen Pflanzenarten bekannt ist (KNOP 1998, LOHAUS und FISCHER 2001). Im Phloemsaft betrug die Aminosäure-Konzentration insgesamt 111 mM. Vergleichswerte für andere vermutliche symplastische Phloembelader existieren nicht. Verschiedene Nutzpflanzen, die zu den apoplastischen Phloembeladern zählen (Mais, Spinat, Zuckerrübe), zeigen ähnliche Konzentrationen von 100-200 mM (RIENS et al. 1991, LOHAUS et al. 1995, 1998, WINZER et al. 1996).

Tab. 3: Aminosäure-Konzentrationen im Source-Blatt (n = 3), Apoplast (n = 8) und Phloemsaft (n = 8) von *Alonsoa meridionalis* während der Lichtperiode (n.d. = nicht nachweisbar).

	Source-Blatt $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW	Apoplast mM	Phloem mM
Glutamin	1.9 ± 0.3	0.6 ± 0.2	29.5 ± 17.5
Glutamat	3.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	34.5 ± 10.1
Asparagin	0.3 ± 0.1	≤ 0.1	1.1 ± 0.5
Aspartat	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.1	9.9 ± 3.6
Glycin	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	4.6 ± 2.1
Serin	2.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2	16.2 ± 0.4
Phosphoserin	n.d.	0.1 ± 0.1	7.0 ± 1.6
Alanin	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	3.4 ± 1.5
Threonin	0.5 ± 0.1	≤ 0.1	3.0 ± 1.2
Valin	0.2 ± 0.1	≤ 0.1	0.4 ± 0.2
Arginin	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	≤ 0.1
Lysin	≤ 0.1	≤ 0.1	0.7 ± 0.4
Tryptophan	≤ 0.1	≤ 0.1	0.4 ± 0.5
Methionin	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1
andere Aminosäuren	0.6	0.7	0.5
Σ Aminosäuren	10.7	3.7	111

3.1.2 Metabolitgehalte in *Asarina barclaiana*

Die Isolierung der zu untersuchenden Metabolite erfolgte für *Asarina* genau wie bei *Alonsoa*. Die Analyse der Reinheit des Apoplastensafts durch Messung der Aktivität der Malat-Dehydrogenase ergab hier eine Aktivität im Blattextrakt von $39 \mu\text{mol g}^{-1}$ FW min^{-1} im Gegensatz zur apoplastischen

Aktivität von $0.05 \mu\text{mol g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$. Dies entsprach ebenfalls einer Kontamination von weniger als 0.1%.

3.1.2.1 Zucker

Die Zucker-Gehalte im Blatt von *Asarina* waren denen von *Alonsoa* sehr ähnlich. Tabelle 4 zeigt die Zuckergehalte im Blatt und die Zuckerkonzentrationen in Apoplast und Phloem von *Asarina barclaiana*. Glucose, Fructose und Saccharose machen zusammen knapp 60% des Gesamtgehaltes aus. Die Raffinose-Oligosaccharide und deren Vorstufen sind in relativ geringem Umfang vorhanden. Im Gegensatz zu *Alonsoa* besitzt *Asarina* jedoch sehr viel Mannitol.

Tab. 4: Zucker-Konzentrationen im Source-Blatt (n = 6) und Apoplast (n = 8) von *Asarina barclaiana* während der Lichtperiode (n.d. = nicht nachweisbar).

	Source-Blatt $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$	Apoplast mM
<i>myo</i> -Inositol	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Galactinol	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Mannitol	7.2 ± 0.4	2.9 ± 0.5
Galactose	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Glucose	3.2 ± 0.5	4.7 ± 1.3
Fructose	3.2 ± 0.7	1.7 ± 0.6
Saccharose	5.8 ± 0.3	2.4 ± 0.6
Raffinose	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Stachyose	1.1 ± 0.2	1.6 ± 0.4
Verbascose	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Σ Zucker und Zuckeralkohole	22.5	15.1
Stärke ($\mu\text{mol Glucose g}^{-1} \text{FW}$)	95 ± 19	n.d
Σ C in den Verbindungen	774	141

Die Zucker-Konzentrationen und deren relative Anteile im Phloemsaft von *Asarina* unterschieden sich sehr stark von den Konzentrationen im Apoplasten und im Gesamt-Blatt. Im Phloemsaft ist der bei weitem häufigste Zucker Saccharose (Tab. 5). Diese repräsentiert mit etwa 1.2 M über 90% der Gesamt-Zucker-Konzentration. Außerdem sind noch Raffinose und Stachyose mit ca. 10-30 mM und

Mannitol mit ca. 50 mM im Phloemsaft zu finden. Die Unterschiede zwischen der Licht- und Dunkelperiode sind gering. Insgesamt unterscheidet sich die Zuckerzusammensetzung des Phloemsafts von *Asarina* sehr stark von der in *Alonsoa*. Die Betrachtung des Kohlenstoffs in den transportierten Verbindungen zeigt jedoch, daß der Phloemsaft von *Alonsoa* mit ca. 15000 matom C (Tab. 2) genauso viel Kohlenstoff enthält wie *Asarina* (Tab. 5).

Tab. 5: Zucker-Konzentrationen im Phloemsaft von *Asarina barclaiana* während der Licht- und Dunkelperiode (n = 8, n.d. = nicht nachweisbar).

	Licht	Dunkel
	mM	
<i>myo</i> -Inositol	5 ± 2	5 ± 3
Galactinol	≤ 0.1	≤ 0.1
Mannitol	56 ± 12	42 ± 12
Galactose	2 ± 1	3 ± 2
Glucose	1 ± 1	42 ± 9
Fructose	≤ 0.1	≤ 0.1
Saccharose	1190 ± 230	987 ± 273
Raffinose	28 ± 9	17 ± 9
Stachyose	30 ± 10	13 ± 3
Verbascose	≤ 0.1	≤ 0.1
Σ Zucker und Zuckeralkohole	1312	1109
Stärke (µmol Glucose g ⁻¹ FW)	n.d.	n.d.
Σ C in den Verbindungen	15888	12993

3.1.2.2 Aminosäuren

Ebenso wie in *Alonsoa* waren auch in *Asarina* Glutamin und Glutamat die beiden dominierenden Aminosäuren in Blatt, Apoplast und Phloemsaft (Tab. 6). Die dritthäufigste Aminosäure ist jedoch zumindest im Phloem Aspartat und nicht Serin, das bezüglich seines Anteils an den Gesamt-Aminosäuren an vierter Stelle steht. Alle anderen Aminosäuren kommen nur in relativ geringen Mengen vor. Die Summe der Aminosäuren in Blatt und Apoplast liegt im selben Bereich wie in einer Vielzahl anderer Pflanzenarten (KNOP 1998, LOHAUS und FISCHER 2001).

Die Aminosäure-Konzentration im Phloem ist mit 253 mM relativ hoch. Nur in *Pisum sativum* und verschiedenen *Brassica*-Arten konnten noch höhere Konzentrationen bis zu 500 mM nachgewiesen

werden (LOHAUS und MOELLERS 2000). Neben der Abhängigkeit von der Pflanzenart ist die Aminosäure-Konzentration im Phloem auch stark von der Stickstoff-Versorgung der Pflanzen abhängig (KNOP 1998).

Tab. 6: Aminosäure-Konzentrationen im Source-Blatt (n = 3), Apoplast (n = 8) und Phloemsaft (n = 8) von *Asarina barclaiana* während der Lichtperiode (n.d. = nicht nachweisbar).

	Source-Blatt $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW	Apoplast mM	Phloem mM
Glutamin	1.0 ± 0.3	4.9 ± 0.5	154.8 ± 110.3
Glutamat	1.7 ± 0.5	0.7 ± 0.3	43.4 ± 13.2
Asparagin	≤ 0.1	≤ 0.1	0.7 ± 0.2
Aspartat	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2	18.6 ± 3.5
Glycin	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.2	3.6 ± 1.9
Serin	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	5.4 ± 3.0
Phosphoserin	n.d.	≤ 0.1	≤ 0.1
Alanin	0.3 ± 0.1	1.8 ± 0.8	3.3 ± 1.7
Threonin	0.1 ± 0.1	≤ 0.1	4.2 ± 3.0
Valin	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	3.5 ± 1.7
Arginin	≤ 0.1	0.2 ± 0.1	9.9 ± 5.3
Lysin	≤ 0.1	≤ 0.1	0.3 ± 0.4
Tryptophan	0.1 ± 0.1	≤ 0.1	1.2 ± 0.5
Methionin	≤ 0.1	≤ 0.1	1.5 ± 1.0
andere Aminosäuren	0.5	2.4	2.9
Σ Aminosäuren	5.3	11.8	253

3.2 Isolierung und Charakterisierung von Saccharose-Transportern

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aus *Alonsoa meridionalis* und *Asarina barclaiana* cDNAs von Saccharose-Transportern zu isolieren. Diese Klasse von Transportproteinen ist bisher nicht in vermutlich symplastischen Phloembeladern identifiziert worden. Für die Beantwortung der Frage, ob Saccharose-Transporter auch in Pflanzen mit offener Phloemanatomie für die Beladung des Phloems verantwortlich sind, war die Isolierung der entsprechenden Transporter der erste Schritt.

Da von beiden Pflanzenarten keine cDNA-Banken existieren, wurde versucht, die gesuchten cDNAs durch RT-PCR mit degenerierten Primern zu amplifizieren (2.10). Hierzu wurden die schon bekannten

Aminosäure-Sequenzen von SoSUT (RIESMEIER et al. 1992), StSUT (RIESMEIER et al. 1993), AtSUC1 und AtSUC2 (SAUER und STOLZ 1994) und PmSUC2 (GAHRTZ et al. 1994) verglichen. Es wurden zwei konservierte Regionen identifiziert, die sich für die Ableitung degenerierter Primer gut eignen. Diese Oligopeptide, AAGVQFGWA und GFWILDVA, lagen im ersten und vierten membrandurchspannenden Bereich. Mit Hilfe der beiden Primer sut-for (5'-GC(ACGT)GC(ACGT)GG(ACGT)(AG)T(ACGT)CA(AG)TT(CT)GG(ACGT)TGGGC-3') und sut-rev (5'-GC(ACGT)AC(AG)TC(ACGT)A(AG)(AGT)ATCCA(AG)AA(ACGT)CC-3') konnten aus beiden Pflanzenarten Saccharose-Transporter-Fragmente von ca. 0.3 kb Größe isoliert werden. Durch 3'- und 5'-RACE (2.10.4) konnten anschließend Vollängenklone von insgesamt drei Transportern (*AmSUT1*, *AbSUT1*, *AbSUT2*) identifiziert werden.

Nach der Klonierung der Saccharose-Transporter erfolgte die funktionelle Charakterisierung durch Expression im *Saccharomyces cerevisiae* Stamm DBY 2617 (KAISER und BOTSTEIN 1986, SAUER und STOLZ 2000; 2.18). Dazu wurden *AmSUT1*, *AbSUT1* und *AbSUT2* jeweils in sense- bzw. antisense-Orientierung in den *E.coli/S.cerevisiae* Shuttle-Vektor pNEV-E kloniert und in Hefe transformiert. Die Sequenzen und Transport-Charakteristika der drei Transporter sind im folgenden genauer dargestellt.

3.2.1 *AmSUT1*

3.2.1.1 Isolierung

Durch RT-PCR mit anschließendem RACE konnte ein Vollängenklon eines Saccharose-Transporters aus *Alonsoa meridionalis* isoliert werden. Dieser wurde *AmSUT1* (*Alonsoa meridionalis* sucrose transporter 1) benannt. Die Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *AmSUT1* sind in Abbildung 5 dargestellt. Der Vollängenklon besitzt eine Gesamtlänge von 1695 Nukleotiden, von denen 1506 Nukleotide den codierenden Bereich darstellen. Die 5'-untranslatierte Region umfasst 50 Nukleotide, während die 3'-untranslatierte Region viel länger ist (139 Nukleotide).

Topologie-Voraussagen für die Aminosäure-Sequenz von *AmSUT1* zeigen, daß er vermutlich 12 membranspannende Domänen beinhaltet. Dies ist ein Kennzeichen aller bisher charakterisierten Saccharose-Transporter (WILLIAMS et al. 2000). Das aus der Sequenz berechnete Molekulargewicht liegt bei 52.3 kDa. Ein Vergleich mit den Aminosäure-Sequenzen anderer Saccharose-Transporter zeigte zudem eine sehr hohe prozentuale Identität von 65-80% (Tab. 7).

Es sei hier erwähnt, daß die in den Datenbanken hinterlegte Sequenz von *AmSUT1* (GenBank Acc.-No. AF191025, KNOP et al. 2001) keine Saccharose-Transportfähigkeit besaß. Daher wurde diese Sequenz auf Lesefehler durch die PCR-Amplifikation überprüft. Es stellte sich heraus, daß die in Abbildung 5 dargestellte Sequenz die vermutlich fehlerfreie Sequenz von *AmSUT1* ist, was durch

Saccharose-Transport-Experimente bestätigt wurde (3.2.1.2). Die neue Sequenz ist zu 96% mit der Sequenz in den Datenbanken identisch.

1	CATGTAAATACACATACACAAACACACATATACACACACTGAGCATCAATGGAGGTTGGCAATGAGGCCAAATCCACC	80
1		10
81	GCTCTGCCGCCGGCGCAGGCGCGCGGTGAAAAACATCATCGTCTGGCGCGCATCGCCCGGGGTGCAATTCGGGTG	160
11	A L P P A Q A A P V K N I I V V A A I A A G V Q F G W	37
161	GGCCCTTCAGCTGTCCCTGTTGACCCCATACGTTTACGCTGTTGGGGGTGCCCATGTTTGGGCGGCTTCATCTGGCTGT	240
38	A L Q L S L L T P Y V Q L L G V P H V W A A F I W L C	64
241	GTGGGCCCATCTCCGGTTTGTCTTCCAACCGATTGTGGGGTACTACAGTGATAACTGTACCTCCAGGTTCCGGTCGGCGC	320
65	G P I S G L L V Q P I V G Y Y S D N C T S R F G R R	90
321	CGCCCTTCATCGCCCGGAGCGGGCTGGTTCGGTGTGTTTTCTGATCGGGTTTGGCGGTGATTTGGGGCATAT	400
91	R P F I A A G A G L V A V A V F L I G F A A D L G H M	117
401	GGGGGTGATTCTCTGGGCAAGGCACCAAAACCGAGGGCTGTGCTGTTTTCTGTCGTCGGGTTTTGGATACTCGATGTTG	480
118	G G D S L G K G T K P R A V A V F V V G F W I L D V A	144
481	CGAATAACATGTTGCGAGGGCCTTGTTCGAGCATTATTAGCCGATATGTACGCCGGAATGCGAAAAAGATGAGTTCAGCA	560
145	N N M L Q G P C R A L L A D M S A G N A K K M S S A	170
561	AACTCGATGTTTTCTTTTTTCATGGCGGTGGGAATGTTTTAGGATACGCGCCGGTTCATACACCCGACTCTACAAAGT	640
171	N S M F S F F M A V G N V L G Y A A G S Y T R L Y K V	197
641	CTTCCCATCTCCAAAACCGAAGCCTGCGCGGTCTATTGTGCAAACTCTCAAGAGCTGTTTTTTCATCTCCGTAGCTCTGT	720
198	F P F S K T E A C A V Y C A N L K S C F F I S V A L L	224
721	TATTGACTGTGACCATAATTGCACTGTGCATTGTACGCGAAACTCCGTACACCCGCCCTCCGGAAGAGGCCGGAAGTGTG	800
225	L T V T I I A L C I V R E T P Y T A P P E E A G T V	250
801	AAAAAGCATACGGTTCCTGTGTTGGGGAGTTATTCGGTGGTGAAGGACTTGCCTAGGCCAATGTGGATGTTGCTATT	880
251	K K H T V P V F G E L F G A L K D L P R P M W M L L L	277
881	GGTAACAGCCCTTAACTGGGTTGCGTGGTTCCGTTTTTGTGTTTCGATACTGACTGGATGGGCAAGAGGTGTACGGTG	960
278	V T A L N W V A W F P F L L F D T D W M G K E V Y G G	304
961	GTAAGGTTGGCGAGGGGAGCTTGTACGATAAGGGTGTACGTGTCCGTGCACTGGGGCTGATGCTTAACTCTGTTGGTCTT	1040
305	K V G E G S L Y D K G V R V G A L G L M L N S V V L	330
1041	GGGTTAGCTTCTCTAGGAGTGCAGGTTACGGCTCGTGGGCTTGGTGGGGTTAAGAGGTTGTTGGGGCAGTGTGAACCTTCT	1120
331	G V A S L G V Q V T A R G L G G V K R L W G S V N L L	357
1121	GCTGGCTATTTGTTTGGCGATGACTGTTTGATTACAAAGATGGCGCAGCATCACAGGGAGTATGCCTCCGTTGGCGGTG	1200
358	L A I C L A M T V L I T K M A Q H H R E Y A S V G G A	384
1201	CTGCCCCAACACTTCAGCCCCGGTTCATGGCGTAAAGATCGGTGCTTTGGCTCTTTCTCTGTTCTCGGCATTCTCTTT	1280
385	A P T L Q P P V H G V K I G A L A L F S V L G I P L	410
1281	GCGGCAACTTTCAGTATTCATTTCGCTTTGGCATCCATATATTTCAGCAACTCTGGCGCAGGACAAGGTCTCTCCCTCGG	1360
411	A A T F S I P F A L A S I Y S S N S G A G Q G L S L G	437
1361	AGTTCTGAATCTTCTATCGTATCCACAGATGTTCTGTTTTCAGTTGCAAGTGGCCATGGGACGCTTGTTCGGAGGCG	1440
438	V L N L A I V I P Q M F V S V A S G P W D A L F G G G	464
1441	GCAACCTCCCGCATTTCGTCGTTGGCGCGGTTGCGGCCACCGTTAGTGGTATTATTGCCCTCACGGCGCTTCCATCTCCA	1520
465	N L P A F V V G A V A A T V S G I I A L T A L P S P	490
1521	CCGTCCGATGTCAAGATTCTGGCCACCGCGGACATTAATAATGTTTATGTAGTAATTTGAAGTTTTCGTTATAGGGCTT	1600
491	P S D V K I L A T G G H *	502
1601	GTAGTTCCGCTCTGTTGCCTGTTGGGGCCTAAGTATTTTTTTTTTGTGCCTCCCCACCGTAGTAGTCGTGTCGCAAAC	1680
1681	CACGAATCACTAGT	1695

Abb. 5: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *AmSUT1*. Vermutliche membranständige Regionen sind grau unterlegt.

Tab. 7: Prozentuale Ähnlichkeit auf Aminosäureebene von verschiedenen Saccharose-Transportern.

		% Identität						
		AbSUT1	AmSUT1	AtSUC1	AtSUC2	PmSUC2	SoSUT	StSUT
% Ähnlichkeit	AbSUT1	-	77.8	65.3	66.9	71.0	68.4	69.7
	AmSUT1	82.8	-	67.5	71.3	76.5	71.5	72.4
	AtSUC1	73.4	75.6	-	77.6	64.1	65.1	70.8
	AtSUC2	74.2	78.6	81.9	-	66.0	67.7	71.5
	PmSUC2	77.8	82.6	71.3	72.8	-	69.9	70.0
	SoSUT	76.9	78.9	73.9	74.8	77.7	-	69.0
	StSUT	77.4	79.6	76.8	78.2	78.5	77.1	-

3.2.1.2 Heterologe Expression in Hefe

Zur Untersuchung der Transportkapazität wurde *AmSUT1* in den *E.coli/S.cerevisiae* Shuttle-Vektor pNEV-E (SAUER und STOLZ 1994) kloniert. Dieser Vektor ermöglicht die Expression von Genen unter Kontrolle des starken Promotors der *S.cerevisiae* Plasmamembran H^+ -ATPase (*PMAI*, SERRANO et al. 1986). Von *AmSUT1* wurde zunächst die 5'-untranslatierte Region entfernt und durch die 5'-untranslatierte Region des Saccharose-Transporters *PmSUC2* ersetzt. Diese Sequenz, 5'-AAGCTTGATAAAAGAA-3', bewirkt eine besonders starke Expression und Lokalisation von Saccharose-Transportern in der Hefe-Plasmamembran (N. SAUER, pers. Mitteilung).

Die neue Sequenz wurde durch PCR mit speziellen Primern in *AmSUT1* eingeführt. Als forward-Primer diente AmPmSUC-f (5'-CCGGAATTCAAGCTTGATAAAAGAAATGGAGGTTGGCAATGAGGCCAAATCC-3'). Dieser Primer enthielt neben der *PmSUC2*-5'-UTR (kursiv) und dem Beginn des ORF (fett) auch eine *EcoRI*-Schnittstelle (unterstrichen). Als reverse-Primer wurde AmPmSUC-r (5'-CCGTGGTTGCGACACGACTACTACGGTGG-3') aus der 3'-untranslatierten Region von *AmSUT1* genutzt. Das PCR-Produkt wurde in den T/A-Klonierungsvektor pGEM-T Easy kloniert, zur Kontrolle auf Amplifikationsfehler sequenziert und abschließend mit *EcoRI* über die Schnittstellen in AmPmSUC-f und pGEM-T Easy aus dem Vektor ausgeschnitten. Der neu entstandene *PmSUC2*-5'-UTR-*AmSUT1* wurde nun in die *EcoRI*-Schnittstelle zwischen *PMAI*-Promotor und -Terminator ligiert. Das Plasmid mit *AmSUT1* in sense-Orientierung (Positivkontrolle) wurde pCK-Am1s benannt, das Plasmid mit *AmSUT1* in antisense-Orientierung (Negativkontrolle) bekam den Namen pCK-

Aml1s. In Abbildung 6 sind diese Plasmide dargestellt. Die entsprechenden Hefen wurden CKY-Aml1s und CKY-Aml1as benannt.

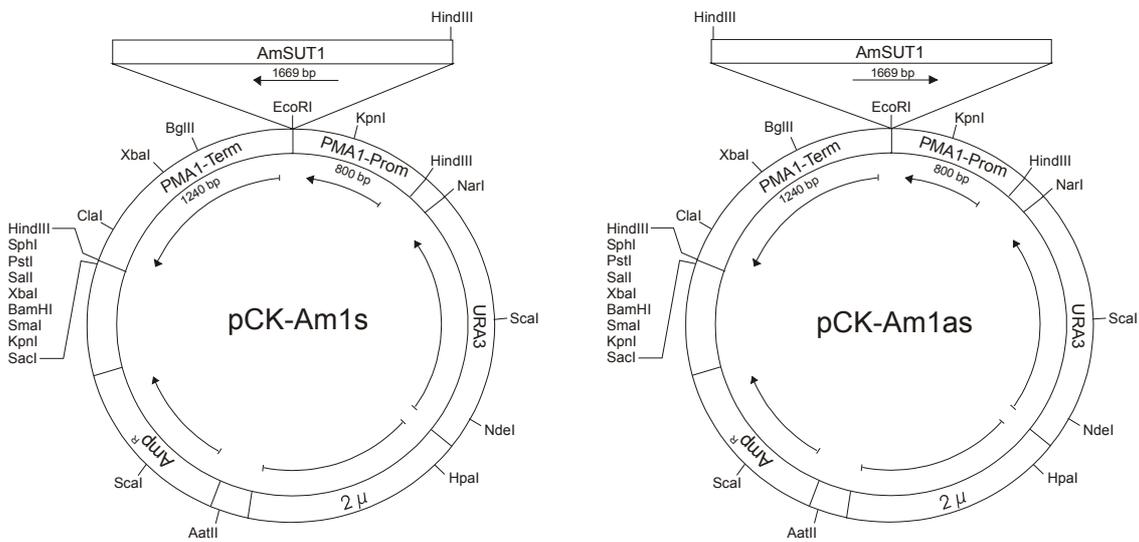


Abb. 6: *E.coli/S.cerevisiae* Shuttle-Plasmide, die *AmSUT1* in sense- (pCK-Am1s) oder antisense-Orientierung (pCK-Am1as) enthielten. Die Plasmide wurden zur Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* Stamm DBY 2617 eingesetzt. Sie leiten sich von pNEV-E (SAUER und STOLZ 1994) ab.

In Abbildung 7 ist die Aufnahme von Saccharose in AmSUT1-exprimierende Hefen dargestellt. Die Aufnahme war bei 1 mM Saccharose-Konzentration und pH 5.5 im Außenmedium mit $3.7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$ sehr hoch. Im Gegensatz dazu zeigte die Negativkontrolle nahezu keine Aufnahme. Der Saccharose-Transport war pH-abhängig (Abb. 7). Je saurer das Außenmedium, desto höher war die Aufnahme. Bei neutralem oder basischem pH-Wert war praktisch kein Transport mehr messbar. Dies bestätigte, daß AmSUT1 ein H^+ -Symporter ist.

Nach der pH-Abhängigkeit wurde der Einfluß verschiedener möglicher Kompetitoren auf die Saccharose-Aufnahme getestet. Dabei handelte es sich um die Zucker Maltose, Raffinose und Stachyose. Maltose ist ein bekannter Kompetitor von Saccharose-Transportern. Raffinose und Stachyose wurden getestet, da sie die Hauptkomponenten des Phloemsafts von *Alonsoa meridionalis* sind. Obwohl die Kompetitoren in zehnfachem Überschuß zugegeben wurden, zeigte nur Maltose einen Effekt, wohingegen Raffinose und Stachyose die Saccharose-Aufnahme nicht beeinflussten (Tab. 8).

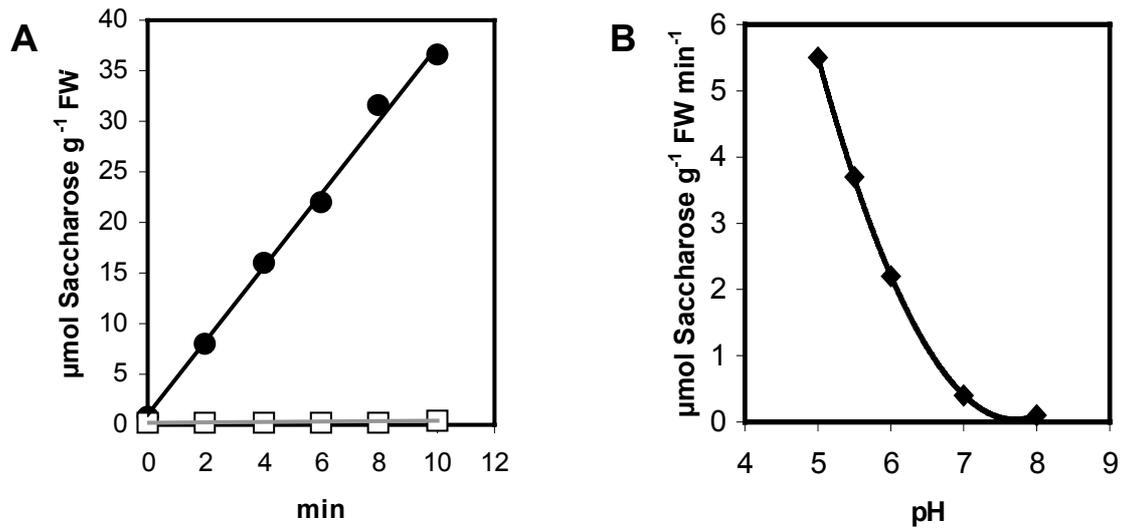


Abb. 7: Aufnahme rate von 1 mM ¹⁴C-markierter Saccharose in AmSUT1-exprimierende Hefen bei pH 5.5 (A) und pH-Abhängigkeit von AmSUT1 (B). Dargestellt sind die Ergebnisse von repräsentativen Experimenten. Schwarze Kreise = *AmSUT1*-sense; weiße Quadrate = *AmSUT1*-antisense (Negativkontrolle).

Desweiteren wurde der Saccharose-Transport in Anwesenheit von Inhibitoren untersucht. Dies war zum einen CCCP, ein Protonophor, und zum anderen PCMBs, ein Sulfhydrylgruppenblocker, der als Hemmer von Saccharose-Transportern bekannt ist. Bei Zugabe von CCCP ging die Saccharose-Aufnahme auf 4% des Ausgangswertes zurück (Tab. 8). Dies bestätigte ebenfalls, daß Saccharose nur zusammen mit Protonen aufgenommen wird. Im Gegensatz dazu war die Hemmung durch PCMBs gering (Tab. 8). Die verbleibende Aufnahme rate lag bei ca. 80%, wohingegen sie bei den bisher untersuchten Saccharose-Transportern bei 20-50% lag (RIESMEIER et al. 1992, 1993, GAHRTZ et al. 1994, SAUER und STOLZ 1994, LUDWIG et al. 2000, NOIRAUD et al. 2000, LEMOINE 2000, SCHULZE et al. 2000). Die geringere PCMBs-Sensitivität war der einzige Transportparameter, der sich signifikant von allen bisher charakterisierten Saccharose-Transportern unterschied.

Tab. 8: Aufnahme von 1 mM ¹⁴C-markierter Saccharose in AmSUT1-exprimierende Hefen in An- oder Abwesenheit verschiedener Substanzen. Dargestellt sind Ergebnisse von repräsentativen Experimenten.

zugegebene Substanz	verbleibende Aufnahme rate (%)
-	100
10 mM Maltose	38
10 mM Raffinose	95
10 mM Stachyose	103
50 μM CCCP	4
50 μM PCMBs	81

Weitere wichtige Parameter, die Transportproteine charakterisieren, sind der K_m -Wert und V_{max} . Abbildung 8 zeigt eine Auftragung der Aufnahmeraten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration nach Lineweaver-Burk. Der K_m -Wert von AmSUT1 lag bei 1.8 mM und V_{max} betrug $0.7 \text{ mmol g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ (Tab. 9).

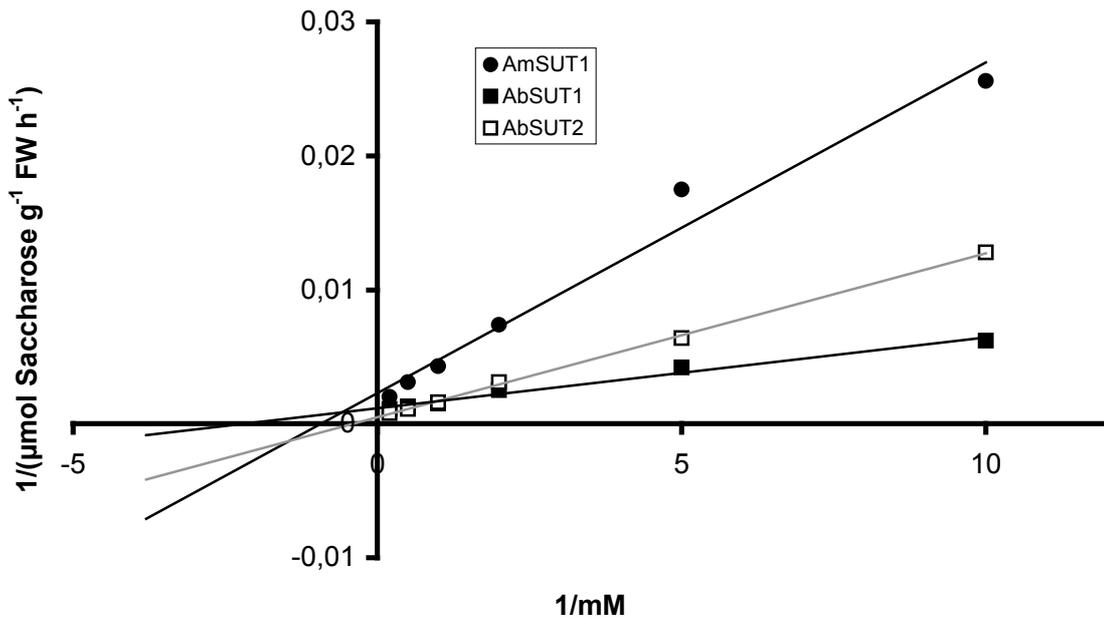


Abb. 8: Lineweaver-Burk Diagramm zur Ermittlung von K_m und V_{max} der Saccharose-Transporter AmSUT1, AbSUT1 und AbSUT2. Dargestellt sind Ergebnisse von repräsentativen Experimenten.

Tab. 9: K_m - und V_{max} -Werte der untersuchten Transporter. Dargestellt sind Ergebnisse von repräsentativen Experimenten.

Transporter	K_m (mM)	V_{max} ($\text{mmol g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$)
AmSUT1	1.8	0.7
AbSUT1	0.4	0.9
AbSUT2	2.0	2.0

3.2.2 *AbSUT1*

3.2.2.1 Isolierung

Auch aus *Asarina* wurden Saccharose-Transporter durch RT-PCR und anschließendes RACE isoliert. Die Transporter wurden *AbSUT1* (*Asarina barclaiana* sucrose transporter 1) und *AbSUT2* (siehe 3.2.3) benannt. Die Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *AbSUT1* ist in Abbildung 9 dargestellt. Der Vollängenklon hat eine Länge von 1764 Nukleotiden, wobei der ORF von 1530 Basen von einer 33 Basen umfassenden 5'-untranslatierten Region und einer 3'-untranslatierten Region von 201 Nukleotiden umgeben ist.

AbSUT1 hat eine Größe von 510 Aminosäuren, was ein berechnetes Molekulargewicht von 53.5 kDa ergibt. Das Protein besitzt vermutlich 12 membranständige Regionen. Wie auch AmSUT1 besitzt AbSUT1 eine große Homologie von 65-80% zu anderen bisher bekannten Saccharose-Transportern (Tab. 7). Ebenso ergab die Untersuchung der ursprünglichen Sequenz von *AbSUT1* (GenBank Acc.-No. AF191024, KNOP et al. 2001), daß sie Amplifikationsfehler durch die *Taq*-Polymerase enthielt, denn es konnte bei der Expression in Hefe keine Saccharose-Aufnahme nachgewiesen werden. Deshalb wurde auch diese Sequenz wie zuvor die von *AmSUT1* auf Lesefehler während der PCR-Amplifikation überprüft. Dabei zeigte sich, daß die in Abbildung 9 dargestellte Sequenz die vermutlich fehlerfreie *AbSUT1*-Sequenz ist, was durch die anschließenden Saccharose-Transport-Experimente bestätigt wurde (3.2.2.2). Diese Sequenz ist zu 99% mit der ursprünglichen Sequenz identisch.

```

1  GACATAGAAAAGAGGTAAAAGAGGAATATAAGTGTATGGAGAACGGTGACCATAGAACTGCTCCGGCCTTTCAGCTGCAACA  80
1  M E N G D H R T A P A F Q L Q Q  16
81  AGCTTCACCGCCGGAGGCGGGCCGGTGAGGAATATTATCTGGTTGCGGCGATAGCTGCGGGCGTGCAGTTCGGATGGG  160
17  A S P P E A A P V R N I I L V A A I A A G V Q F G W A  43
161  CACTACAGTTGTCCCTATTGACACCATACGTTTCAGTTGCTGGGCATACCACATACGTGGACCGCTTTCATTGGCTTTGT  240
44  L Q L S L L T P Y V Q L L G I P H T W T A F I W L C  69
241  GGGCCGGTTTCGGGTATGCTTGTGCAGCCCATTGTGGGGTACTACAGTGACAACGTACCTTACGATTTGGGCGGCGCAA  320
70  G P V S G M L V Q P I V G Y Y S D N C T L R F G R R K  96
321  ACCCTTCATCGCCGGTGGAGCGGGCTTGTGGTGGTGGCGGTGTTTCTTATTGGTTTCGCGCGGATATAGGGTACGCTG  400
97  P F I A G G A G L V V V A V F L I G F A A D I G Y A A  123
401  CGGGTGATACTTTGGGAAAGGGTACGAAGCCGAGGGCTACTGCTGTTTTCGTTGTTGGGTTTTGGATTCTTGATGTTGCT  480
124  G D T L G K G T K P R A T A V F V V G F W I L D V A  149
481  AATAACATGCTGCAGGGTCTTGTAGGGCACTGTGGCGGATTTATCAGCGGAAATGCTAGAAAATAGCAACGCGAA  560
150  N N M L Q G P C R A L L A D L S G G N A R K M S N A N  176
561  TGCTTTGTATTCTTTTTCATGGCGGTGGGGAATGTTTCAGGCTACGCCCGGTTTCATACCCACCTCTTCAAATCT  640
177  A L Y S F F M A V G N V S G Y A A G S Y T H L F K I F  203
641  TCCCGTTTCCTCAAACCAAGCCTGTGACGTTTACTGTGCTAACCTAAAGAGCTGCTTTTTCATCTCCGTAGCTCTTTTA  720
204  P F S K T K A C D V Y C A N L K S C F F I S V A L L  229
721  CTGTGTGTGAGCGCACTAGCATTGACCATTGTACGCGAAACTCCACCGCCGGAGACGGCGGGGCACCGGAGGCAACCAA  800
230  L C V S A L A L T I V R E T P P P E T A G A P E A T K  256

```

801	AAAGAAAAAAATCCCAGTTTTTCGGGGAGCTTTTCAGTGCCTTTGAAGAAGCTTGCCTAGACCCATGTGGTTCTTGCTCCTTG	880
257	K K K I P V F G E L F S A L K N L P R P M W F L L L V	283
881	TTACGTGTCTGAAGTGGATGCCTGGTTTCCTTTCTTGTGTTCGACACTGATTGGATGGGTAAGGAGGTTACGGCGGA	960
284	T C L N W I A W F P F L L F D T D W M G K E V Y G G	309
961	ACTGTTGCAGAGGGGAAGATGTACGATCGTGGCGTGGCGCCGGTGCACCTGGGACTGATGCTCAACTCCGTCGTTTTGGG	1040
310	T V A E G K M Y D R G V R A G A L G L M L N S V V L G	336
1041	GTTCTCTTCTCTGGGTATTCAAGCGATAGCGCGCGCTTGGTGGGCCGAAGAGTTGTGGGGTGGGGTGAAGTTTCTGC	1120
337	F S S L G I Q A I A R G V G G P K R L W G G V N F L L	363
1121	TGGCGGTTTGGTGGCCTTGACTGTCGTAATCACCAAACAGGCCGAGCACTCACGGCTGTACACCGTCGGCGCTGATGGC	1200
364	A V C L A L T V V I T K Q A E H S R L Y T V G A D G	389
1201	GTCCAGATTCTTCTGCCGCGGTTCTCTGGTGTAAAGATCAGCGCTTTGGCCCTTTTCGGTGTACTCGGCATTCTCTCGC	1280
390	V Q I L L P P V P G V K I S A L A L F G V L G I P L A	416
1281	GGTAACTTTCAGTATTCCTTTTGCTTTGGCATCCATATACTCCAGTAATTATGGGGCCGGACAAGGCCCTTTCAGTGGGAG	1360
417	V T F S I P F A L A S I Y S S N Y G A G Q G L S L G V	443
1361	TTCTAAATCTTGCAATAGTCATACCACAGATGGTTGTGTCTGTGGCAAGCGGGCCATTGGACGCGTTATTTCGGCGGTGGC	1440
444	L N L A I V I P Q M V V S V A S G P L D A L F G G G	469
1441	AATATACCCGCATTTGTTATGGGCGCGTGGCTGCAGCCGTGAGCGGTATCTTCGCGGTCACTATGCTCCCGCGCTGCC	1520
470	N I P A F V M G A V A A A V S G I F A V T M L P A L P	496
1521	GGCCGATGCGTCGACCAAGAAGTGTGAGTGTGGGAAGTTCCATTAAAAATGCTAGCTAACATAAAGTTTTTACTCTTTA	1600
497	A D A S T K N L S V G S F H *	510
1601	CTTGTGTCGTTTGGGACATCTTCGTTTCTCTTTTTCTTCCCACTCTTTTTCTGGGATCAACCTATGAAATATAGG	1680
1681	GTTCCCCACCTTGGATAAATTGTTGTGACATGTGTATAAAATTCTAGAAGAATCCTATAATTTTACTTATTTGCCTTTG	1760
1761	AAAG 1764	

Abb. 9: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *AbSUT1*. Vermutliche membranständige Regionen sind grau unterlegt.

3.2.2.2 Heterologe Expression in Hefe

Das Vorgehen zur heterologen Expression von *AbSUT1* in Hefe war das gleiche wie bei *AmSUT1* (3.2.1.2). Mit Hilfe der Primer *AbPmSUC-f* (5'-CCGGAATTCAAGCTTGTAAAAGAAATGGAGACGGTGACCATAGAACTGCTCCG-3') und *AbPmSUC-r* (5'-CTTTCAAAGCAAATAAGTAAAATTATAGG-3') wurde eine modifizierte *AbSUT1*-Sequenz erzeugt und in pNEV-E kloniert. Bei diesem Konstrukt war die eigene 5'-UTR von *AbSUT1* durch die von *PmSUC2* ersetzt worden (im Primer kursiv dargestellt). Das entstandene Plasmid mit *AbSUT1* in sense-Orientierung (Positivkontrolle) wurde pCK-Ab1s benannt, das Plasmid mit *AbSUT1* in antisense-Orientierung (Negativkontrolle) bekam den Namen pCK-Ab1as. In Abbildung 10 sind diese Plasmide dargestellt. Die entsprechenden Hefen bekamen die Namen CKY-Ab1s und CKY-Ab1as.

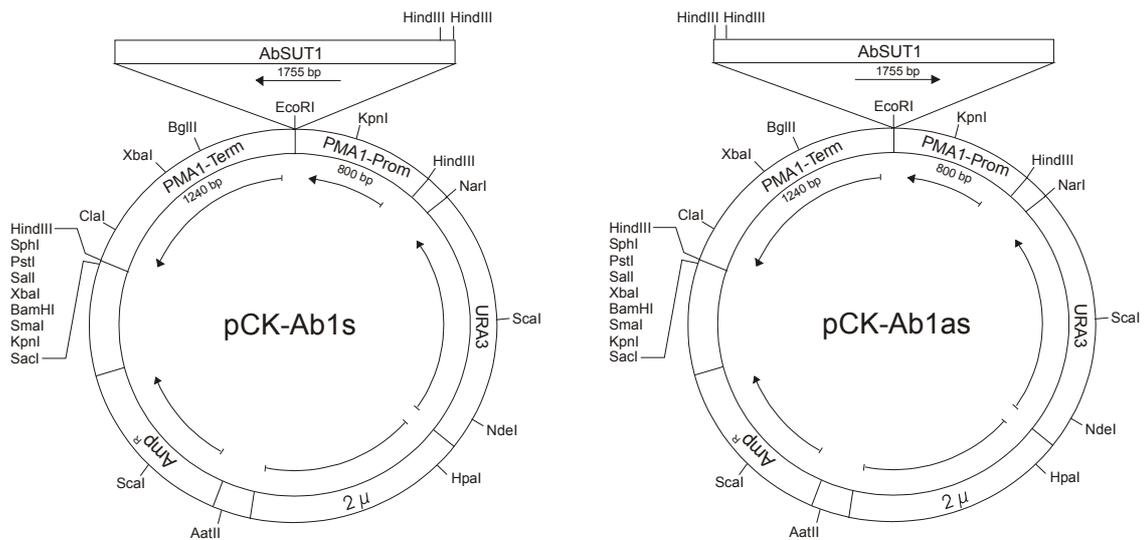


Abb. 10: *E.coli/S.cerevisiae* Shuttle-Plasmide, die *AbsSUT1* in sense- (pCK-Ab1s) oder antisense-Orientierung (pCK-Ab1as) enthielten. Die Plasmide wurden zur Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* Stamm DBY 2617 eingesetzt. Sie leiten sich von pNEV-E (SAUER und STOLZ 1994) ab.

AbSUT1 bewirkt eine sehr effiziente Aufnahme von Saccharose in Hefe-Zellen (Abb. 11). Die Aufnahmerate ist mit $6.3 \mu\text{mol g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$ bei 1 mM Saccharose-Konzentration und pH 5.5 im Außenmedium noch höher als bei AmSUT1. Die Negativkontrolle zeigte keine Saccharose-Aufnahme. Das Aufnahmeverhalten bei unterschiedlichen pH-Werten zeigte einen ähnlichen Verlauf wie bei AmSUT1. Bei basischem pH war keine Aufnahme nachweisbar, bei Ansäuerung des Außenmediums stieg die Transportrate stark an (Abb. 11).

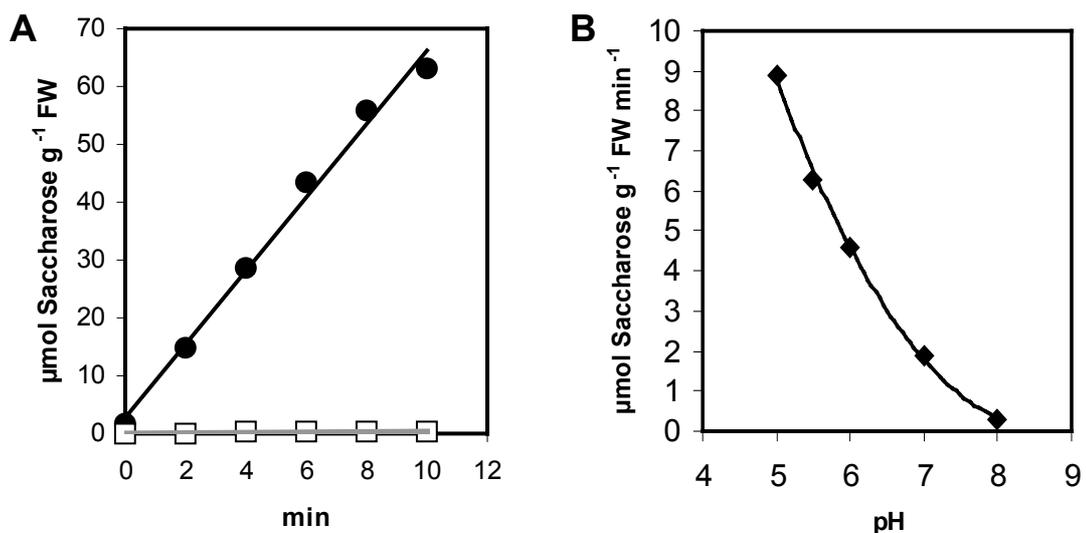


Abb. 11: Aufnahmerate von 1 mM ^{14}C -markierter Saccharose in AbsSUT1-exprimierende Hefen bei pH 5.5 (A) und pH-Abhängigkeit von AbsSUT1 (B). Dargestellt sind Daten von repräsentativen Experimenten. Schwarze Kreise = *AbsSUT1*-sense; weiße Quadrate = *AbsSUT1*-antisense (Negativkontrolle).

Das Verhalten von AbSUT1 gegenüber verschiedenen Kompetitoren und Inhibitoren war dem von AmSUT1 sehr ähnlich (Tab. 10). Maltose wirkte kompetitiv, wohingegen der Saccharose-Transport durch Raffinose und Stachyose nicht beeinflusst wurde. CCCP bringt den Transport nahezu zum Erliegen, was ebenso wie die pH-Abhängigkeit (Abb. 11) für einen Protonen-Symport-Mechanismus von AbSUT1 spricht. Auch auf AbSUT1 wirkt PCMBS nicht sehr stark. Die Restaktivität ist mit 64% höher als bei den schon bekannten Saccharose-Transportern aus apoplastischen Phloembeladern (Tab. 10). Der K_m -Wert (0.4 mM) und V_{max} ($0.9 \text{ mmol g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$) liegen in der gleichen Größenordnung wie die von AmSUT1 (Abb. 8, Tab. 9).

Tab. 10: Aufnahme von 1 mM ^{14}C -markierter Saccharose in AbSUT1-exprimierende Hefen in An- oder Abwesenheit verschiedener Substanzen. Dargestellt sind Ergebnisse von repräsentativen Experimenten.

zugegebene Substanz	verbleibende Aufnahme rate (%)
-	100
10 mM Maltose	37
10 mM Raffinose	91
10 mM Stachyose	94
50 μM CCCP	9
50 μM PCMBS	64

3.2.3 *AbSUT2*

3.2.3.1 Isolierung

Neben *AbSUT1* wurde noch ein zweiter Saccharose-Transporter durch RT-PCR und RACE in *Asarina barclaiana* identifiziert, der als *AbSUT2* bezeichnet wurde (Abb. 12). Er ist sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäureebene etwas länger als *AbSUT1* (1801 Nukleotide, 511 Aminosäuren). Mehrere unabhängige Sequenzierungen zeigten, daß es sich tatsächlich um ein eigenständiges Mitglied einer Genfamilie handelt und nicht um ein PCR-Artefakt. *AbSUT2* besitzt gegenüber *AbSUT1* eine zusätzliche Aminosäure (Valin) an Position 18 des ORF und hat zu *AbSUT1* eine 90%ige Identität auf Aminosäureebene. Desweiteren unterscheiden sich die beiden Transporter in der Länge ihrer 3'-untranslatierten Regionen: Die 3'-UTR von *AbSUT2* ist mit 235 Nukleotiden um 34 Nukleotide länger als die 3'-UTR von *AbSUT1*. Das berechnete Molekulargewicht von *AbSUT2* beträgt 53.7 kDa und das Protein besitzt 12 vermutlich membranspannende Regionen (Abb.12).

1	GACATAGAAAAGAGGTA AAAAGAGGAATATAAGTGATGGAGAACGGTGACCATAGAACTGCTCCGGCGTTTCAGCTGCAACA	80
1	M E N G D H R T A P A F Q L Q Q	16
81	AGCAGTACCGAAACCGGAGGCGGCGCCGCTGAGGAATATTATCCTGGTGGCGGCGATTGCTGCGGGGGTGCAGTTCCGGAT	160
17	A V P K P E A A P L R N I I L V A A I A A G V Q F G W	43
161	GGGCACTGCAGTTGTCCTGTTGACACCATACGTTTCAGTTGCTGGGGATTCCGCATACGTGGGCGGCTTTCATTTGGCTT	240
44	A L Q L S L L T P Y V Q L L G I P H T W A A F I W L	69
241	TGTGGGCGGATTTCTGGTATGTTTGTGCAGCCTATAGTGGGGTACTACAGTGACAACGTAACTACCGGTTTGGGCGGCG	320
70	C G P I S G M F V Q P I V G Y Y S D N C N S R F G R R	96
321	GAAACCCCTCATCGCCGTTGGAGCGGGGCTTGTGGCGGTGGCGGTGTTTCTTATTGGTTTCGCGGCGGATATAGGGCACT	400
97	K P F I A G G A G L V A V A V F L I G F A A D I G H S	123
401	CTGCGGGTATTCTTTGGGAAAGGGTGCGAAGCCGAGGGCCATTGCTGTTTTCGTGTGGTGGTGGTGGATTCTTGATGTT	480
124	A G D S L G K G A K P R A I A V F V V G F W I L D V	149
481	GCTAATAACATGTTGCAGGTCCTTGTAGGGCACTGTTGGCGGATTTATCAGCGGAAATGCTAGAAAAATGGGTAGCGC	560
150	A N N M L Q G P C R A L L A D L S G G N A R K M G S A	176
561	GAATGCTTCTTATCTTTTTCATGGCGGTGGGGAATGTTTTAGGCTACGCCCGGTTTCATACCCACCTCTTCAGAA	640
177	N A S Y S F F M A V G N V L G Y A A G S Y T H L F R I	203
641	TCTTCCCGTTCTCCAAAACCATAGCCTGTGACGTTTACTGTGCTAACCTAAAGAGCTGCTTTTTTCATCTCCATAGCTCTT	720
204	F P F S K T I A C D V Y C A N L K S C F F I S I A L	229
721	TTACTGTGTCTGACCGTACTAGCATTGACCATTGTACGCGAAGCTGCTCCGGAGGCGGTGGCGGCGGCACCGGAGACAAC	800
230	L L C L T V L A L T I V R E A A P E A V A A A P E T T	256
801	CAAAAAGAAACAAATCCAGTTTTTCGGGAGCTATTTCAGTGCTTTGAAGGACTTGCTTAGACCCATGTGGTTCTTGCTCC	880
257	K K K Q I P V F G E L F S A L K D L P R P M W F L L L	283
881	TGGTGACGTGTCTGAACCTGGATTGCCTGGTTTCTTCTTGTGGTTCGACACTGATTGGATGGTTAAAGAGGTGTACGGA	960
284	V T C L N W I A W F P F L L V D T D W M V K E V Y G	309
961	GGAAGTGTGCGAGAGGGCAAGCTGTACGATCGTGGCGTGGCGCGCGGTGCAATTGGGACTGATGCTCAACTCTGTCGCTTC	1040
310	G T V G E G K L Y D R G V R A G A L G L M L N S V A S	336
1041	GGGCTCACTTCTTTGGTGTTCAGGCGATCGCGCTTGGCTTGGTGGGCCGAAGAGATTGTGGGGTGGGTGAACTTTC	1120
337	G L T S L G V Q A I A R W L G G P K R L W G G V N F L	363
1121	TGCTGGCGATTTGTTGGCCATGACTGTGTAACCACCAACAGCCGAGCACTCACGGCGGTACACCGTTCGGCGCTGGT	1200
364	L A I C L A M T V V T T K Q A E H S R R Y T V G A G	389
1201	GGCGTCGAGATTCTTCGGCCCGGATTCTAGTGTAAAGATCGCGCTTTGGCCCTTTTCGCTGTACTCGGCATTCTCT	1280
390	G V E I L R P P I P S V K I G A L A L F A V L G I P L	416
1281	CGCGGTAACCTTTCAGTATTCCTTTTGCTTTGGCATCCATATACTCCAGTAATTCTGGGGCAGGACAAGGCCTGTCGTTGG	1360
417	A V T F S I P F A L A S I Y S S N S G A G Q G L S L G	443
1361	GAGTTCATAATCTTGAATAGTCATACCACAGATGGTGGTGTCTGTGGCAAGCGGCGCTGGGACGCGTTATTTGGTGGC	1440
444	V L N L A I V I P Q M V V S V A S G P W D A L F G G	469
1441	GGCAACATACCCGATTTGTTGGTGGGCGGCTGGCTGCGCCGCGAGTGGGATCTTTGCGTTCACTATGCTCCCTCCGCT	1520
470	G N I P A F V V G A V A A A A S G I F A F T M L P P L	496
1521	GCCTGCCGATGCTTCGACCAAGAAGCTTGGAGTGGAGGTTTCCATTGAGAAATGCTAGCTAGCGTAAAGTTTTTACTCT	1600
497	P A D A S T K N L S V G G F H *	511
1601	TTATTTGTGTCTGTTTAGGGGCGCTTTGTTTCTTTTTTCTTCCCGCTTTTTCTTTTAGGGTCAACGATATGGCAC	1680
1681	ACACTAAGCGTGTAGAGTGTAGTGTGTGGAATATAGGGTTCCCCACCTTGGATAAATTGTTGTGACATGTGTGTAAGAT	1760
1761	TCTAGAAGAACTCTATAATTTTACTTATTGCTTTGAAAG	1801

Abb. 12: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *AbSUT2*. Vermutliche membranständige Regionen sind grau unterlegt.

3.2.3.2 Heterologe Expression in Hefe

AbSUT2 wurde auf die gleiche Weise wie *AbSUT1* in Hefe exprimiert. Nach dem Austausch der eigenen 5'-untranslatierten Region gegen die von *PmSUC2* wurde *AbSUT2* in pNEV-E kloniert und im *Saccharomyces cerevisiae* Stamm DBY 2617 exprimiert. Die so erzeugten Plasmide wurden pCK-Ab2s (*AbSUT2* in sense-Orientierung) und pCK-Ab2as (*AbSUT2* in antisense-Orientierung) genannt (Abb. 13). Die entsprechenden Hefen hießen CKY-Ab2s und CKY-Ab2as.

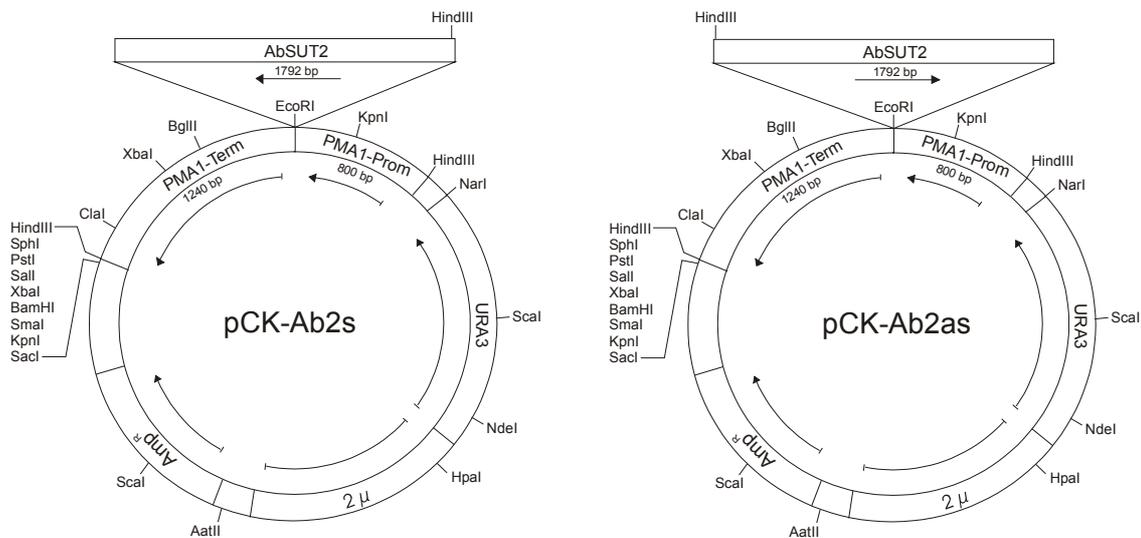


Abb. 13: *E.coli/S.cerevisiae* Shuttle-Plasmide, die *AbSUT2* in sense- (pCK-Ab2s) oder antisense-Orientierung (pCK-Ab2as) enthielten. Die Plasmide wurden zur Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* Stamm DBY 2617 eingesetzt. Sie leiten sich von pNEV-E (SAUER und STOLZ 1994) ab.

Von allen drei charakterisierten Saccharose-Transportern zeigte *AbSUT2* bei heterologer Expression in Hefe mit $9.9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$ die höchste Transportrate bei pH 5.5 und 1 mM Saccharose im Außenmedium (Abb. 14). Bezüglich der Abhängigkeit vom pH-Wert unterschied sich *AbSUT2* nicht von den anderen Transportern (Abb. 14).

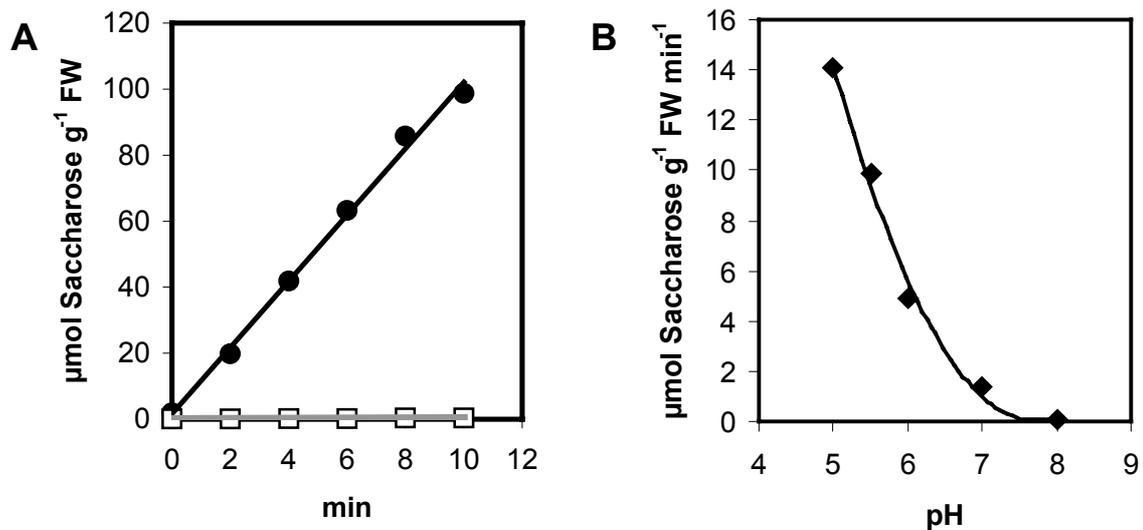


Abb. 14: Aufnahme rate von 1 mM ^{14}C -markierter Saccharose in AbsSUT2-exprimierende Hefen bei pH 5.5 (A) und pH-Abhängigkeit von AbsSUT2 (B). Dargestellt sind Daten von repräsentativen Experimenten. Schwarze Kreise = *AbSUT2*-sense; weiße Quadrate = *AbSUT2*-antisense (Negativkontrolle).

Auch im Verhalten gegenüber Kompetitoren und Inhibitoren gab es keine signifikanten Unterschiede zu AmSUT1 und AbsSUT1. Maltose hatte einen kompetitiven Effekt, während Raffinose und Stachyose von AbsSUT2 nicht transportiert wurden (Tab. 11). Die nahezu vollständige Hemmung der Saccharose-Aufnahme durch CCCP zeigte die Funktion von AbsSUT2 als Saccharose- H^+ -Symporter. Wie schon AmSUT1 und AbsSUT1 wurde AbsSUT2 durch PCMBS nur schwach gehemmt (74% Restaktivität, Tab. 11). Alle drei bisher untersuchten Saccharose-Transporter aus Pflanzen mit offener Phloemanatomie wurden durch PCMBS nur zu 20-40% gehemmt, wohingegen alle anderen zur Zeit charakterisierten Saccharose-Transporter aus apoplastischen Phloembeladern zu 50-80% gehemmt wurden.

Der K_m -Wert (2.0 mM) und V_{\max} (2.0 mmol $\text{g}^{-1} \text{FW h}^{-1}$) von AbsSUT2 lagen in der gleichen Größenordnung wie die von AmSUT1 und AbsSUT1 (Abb. 8, Tab. 9).

Tab. 11: Aufnahme von 1 mM ^{14}C -markierter Saccharose in AbsSUT2-exprimierende Hefen in An- oder Abwesenheit verschiedener Substanzen. Dargestellt sind Ergebnisse von repräsentativen Experimenten.

zugegebene Substanz	verbleibende Aufnahme rate (%)
-	100
10 mM Maltose	56
10 mM Raffinose	91
10 mM Stachyose	111
50 μM CCCP	4
50 μM PCMBS	74

3.3 Untersuchungen zur Expression von *AbSUT1* und *AmSUT1*

Die Expressionsanalyse von *AbSUT1* und *AmSUT1* wurde zunächst auf der Ebene von Organen durchgeführt. Hierfür wurde die Semi-Quantitative RT-PCR (2.14) genutzt, da sie sensitiver als die RNA-Gel-Blot Analyse ist. Desweiteren wurde diese Technik etabliert, um *AbSUT1* und *AmSUT1* im Phloemsaft nachweisen zu können (2.14.4). Hiervon liegen nur sehr geringe Mengen vor, die sich nicht für die Analyse durch RNA-Gel-Blot eignen.

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden erzielt, bevor die Sequenz von *AbSUT2* aus *Asarina* bekannt war. Da dieser Transporter einen sehr hohen Grad an Identität mit *AbSUT1* besitzt, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Daten zur Expression von *AbSUT1* zusätzlich auch von *AbSUT2* stammen können. Dies wäre aber auch durch Rückgriff auf die RNA-Gel-Blot Analyse unter stringenten Bedingungen nicht zu verhindern gewesen. Da es sich bei *AbSUT1* und *AbSUT2* um Gene mit gleicher Funktion handelt, war es für die Aussagekraft einer ersten Expressionsanalyse nicht entscheidend, daß sie möglicherweise nicht getrennt voneinander detektiert wurden.

3.3.1 Herstellung der internen Standards *AbIS* und *AmIS*

Zum Abgleich der durch Semi-Quantitative RT-PCR untersuchten Proben wurden verschiedene interne RNA-Standards erzeugt. Die Herstellung dieser internen Standards *AbIS* und *AmIS* erfolgte wie unter 2.14.1 beschrieben durch Einfügen von pRSA13-Fragmenten in die zu amplifizierenden SUT-Fragmente. pRSA13 ist ein Plasmid, das das *nifA*-Gen von *Azorhizobium caulinodans* ORS571 beinhaltet (PAWLOWSKI et al. 1987). Die Sequenzen von *AbIS* und *AmIS* sind in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt.

```

1  TCCCTGTTGACACCATACGTTTCAGTTGCTGGGGATCCGCCGGGAAGCTTCGAGGCGCTGG 60
61  ACTGGCAGGGACGCCCCGTGCGCTGCGAGGATTGCCCGCACGAGGACATTCAGGCCATCG 120
121  GCCGCTGCGATCTCGGCAAGGTCTGCGTGGCCGACCGGCGTACCCGTCGGATCGACCGCT 180
181  TCTTCGCCCCGAATCCGGAAGTGGCGGCGCCTTATCTGACCCATCCCTACTCCGAGGTAC 240
241  GGCTGCTCGCCGCAAGCATGCCAGCGTGTTCCTGCTGCCGCCGCGTGAAGGCGGACACG 300
301  GAACCGGACGTGCGGGTGATGGTGGCCTACCGCTGCCGCTCGCCCGCATCACCGACATG 360
361  CGCGACGATCCGGATCCCGCATACGTGGGCGGCTTTCATTTGGCTTTGTGGGCCGATTC 420
421  TGGTATGTTTGTGCAGCCTATAGTGGGGTACTACAGTGACAACCTGTAACCTCACGTTTGG 480
481  GCGGCGGAAACCCTTCATCGCCGGTGGAGCGGGGCTTGTGGCGGTGGCGGTGTTTCTTAT 540
541  TGGTTTCGCGCGGATATAGGGCACTCTGCGGGTGATTCTTTGGGAAAGGGTGCGAAGCC 600
601  GAGGGCTATTGCTGTTTTCGTTGTT 625

```

Abb. 15: Nukleotid-Sequenz des internen RNA-Standards *AbIS*. Die Primerbindungsstellen für die Semi-Quantitative RT-PCR sind unterstrichen. *Bam*HI-Schnittstellen sind fettgedruckt, kursiv und unterstrichen. Der Bereich zwischen den Schnittstellen entspricht dem 331 bp-Fragment von pRSA13 (siehe 2.14.1).

```

1  AGCTGTCCCTGTTGACCCCATACGTTTCAGCTGTTGGGGTGCCCCATGTTTGGGCGGCCT 60
61  TCATCTGGCTGTGTGGGCCATCTCCGGTTTGCTTGTCCAGCCGATTGTGGGGTACTACA 120
121  GTGATAACTGTACCTCCAGGTTTCGGGCGCCTTACCGGTGCGCTGAACATGCGCCAGGGC 180
181  CGCTTCGAGCTGGCGCACGGCGGCACGCTCTTCTTACGAGATCGGCGAGATCACCCCC 240
241  GCTTTCAGGCCAAGCTGCTGCGCGTGTGCAGGAAGGCGAGTTCGAGCGGGTCGGCGGC 300
301  AATCGCACGCTGAAGGTGGATGTGCGGCTCGTGTGCCACCAACAAGAATCTGGAAGAG 360
361  GCGGTCTCCAAGGGCGAGTTCGGGGCCGATCTCTACTACCGCATCCATGTGGTGCCGCTG 420
421  ATCCTGCCGCGCTGCGCGAACGGCCGGGCGACATTCCCAAGCTCGCGAAGAAGTTCCTC 480
481  GACCGCTTCAACAAGGAAAAACAAGCTCCACATGATGCTCTCGGCGCCGCCGCCCTTCAT 540
541  CGCGGCCGAGCGGGGCTGGTTCGCGGTGGCTGTTTTCTGATTGGATTTGCGGCTGATTT 600
601  GGGGCATATCGGGGGAGATAGTCTCGGCAAGGGCACAAAGCCGAGGGCTGTTACTGTTTT 660
661  CGTCGTC 667

```

Abb. 16: Nukleotid-Sequenz des internen RNA-Standards *AmIS*. Die Primerbindungsstellen für die Semi-Quantitative RT-PCR sind unterstrichen. *Nar*I-Schnittstellen sind fettgedruckt, kursiv und unterstrichen. Der Bereich zwischen den Schnittstellen entspricht dem 373 bp-Fragment von pRSA13 (siehe 2.14.1).

3.3.2 Organ-spezifische Expression von *AbSUT1* und *AmSUT1*

Die Semi-Quantitative RT-PCR von *AbSUT1* und *AmSUT1* wurde wie unter 2.14.3 beschrieben durchgeführt. Zur Amplifikation von *AbSUT1* und *AbIS* dienten die Primer Ab-for und Ab-rev (2.1.4); für die Amplifikation von *AmSUT1* und *AmIS* wurden die Primer Am-for und Am-rev genutzt (2.1.4). Abbildung 17 zeigt die Organ-spezifische Expression der beiden Transporter. In beiden Arten wurden die Saccharose-Transporter in allen Pflanzenteilen exprimiert, aber in unterschiedlicher Stärke. *AbSUT1* zeigte das höchste Expressionsniveau in Blüten und eine geringe Expressionstärke in Stengel, jungen und ausgewachsenen Blättern und Wurzeln (Abb. 17). *AmSUT1* ist dagegen sowohl in Stengeln als auch in Blüten stark exprimiert und zu geringeren Anteilen auch in ausgewachsenen Blättern und in Wurzeln. Da die Menge an internem Standard für die Quantifizierung von *AbSUT1* zehnmal so hoch war wie die für *AmSUT1* eingesetzte Menge (100 pg *AbIS*, 10 pg *AmIS*), sind die Expressionsniveaus der beiden Transporter insgesamt in einer ähnlichen Größenordnung (Abb. 17).

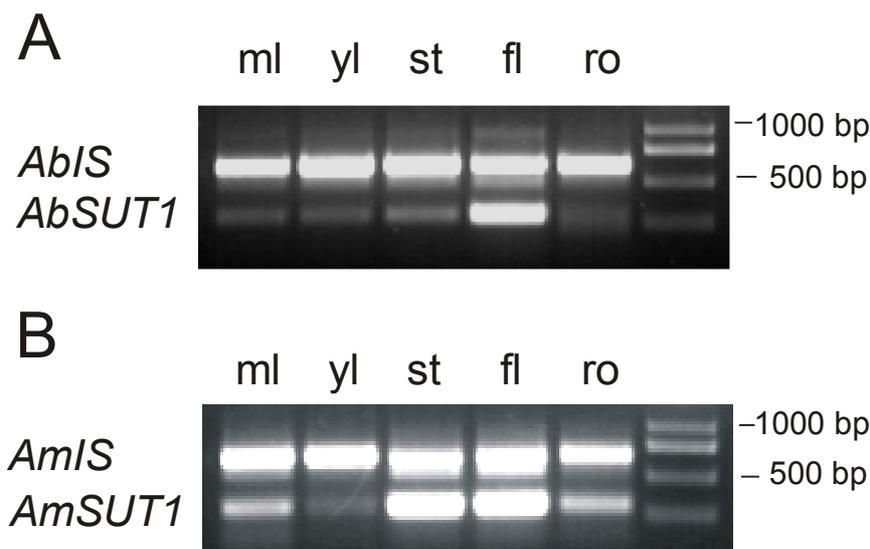


Abb. 17: Ermittlung der Organ-spezifischen Expression von *AbSUT1* (A) und *AmSUT1* (B) durch Semi-Quantitative RT-PCR. Zum Abgleich der Amplifikationsraten in den einzelnen Proben wurden interne RNA-Standards konstruiert (3.3.1). Bei der RT-PCR wurden bei **A** 100 pg interner Standard (*AbIS*) und bei **B** 10 pg interner Standard (*AmIS*) zugegeben. ml = ausgewachsenes Blatt; yl = junges Blatt; st = Stengel; fl = Blüte; ro = Wurzel.

3.3.3 Isolierung der Mesophyll-spezifischen Markergene *AbLhca1*1* und *AmLhca1*3*

Um eine Semi-Quantitative RT-PCR mit durch die Aphidentechnik gewonnenem Phloemsaft durchführen zu können, mußte ausgeschlossen werden, daß der Phloemsaft durch den Inhalt von Mesophyllzellen verunreinigt war. Zwar zeigten mikroskopische Untersuchungen, daß Blattläuse ihre Stechrüssel ohne andere Zellen zu penetrieren direkt in die Siebelemente einstecken (EVERT et al. 1972, BOTHA et al. 1975, 1977, BOTHA und EVERT 1978); ob dies jedoch jegliche Kontaminationsmöglichkeit ausschließt, ist nicht absolut sicher. Schließlich sind für die Amplifikation durch PCR nur sehr wenige Ausgangsmoleküle nötig.

Es wurden daher Mesophyll-spezifische Marker aus *Alonsoa* und *Asarina* isoliert. Dabei handelte es sich um cDNA-Fragmente von *Lhca1*-Genen. Sie sind kerncodierte Teile des Lichtsammel-Komplexes von Photosystem I und werden daher nur in photosynthetisch aktiven Zellen exprimiert. Es wurden zunächst degenerierte Primer zur Amplifikation der gewünschten cDNA-Fragmente abgeleitet. Diese waren CAB-for (5'-GGIGA(CT)TT(CT)GGITT(CT)GA(CT)CC-3') und CAB-rev (5'-TT(GA)TT(GA)TGCCAIGG(GA)TC(ACGT)GC-3'). Aus *Alonsoa* wurde mit diesen Primern ein 579 bp-Fragment von *AmLhca1*3* (*Alonsoa meridionalis* Chlorophyll a/b-bindendes Protein Typ III, GenBank Acc.-No. AF241525, KNOP et al. 2001) isoliert (Abb. 18). In *Asarina* wurde mit diesen Primern ein 507 bp-Fragment von *AbLhca1*1* (*Asarina barclaiana* Chlorophyll a/b-bindendes Protein Typ I, GenBank Acc.-No. AF241524, KNOP et al. 2001) amplifiziert (Abb. 19).

```

1  GGGGACTTTGGGTTTGACCCCTTGGGCTTATCCGACCCCGAAGGCACCGGAGGGTTCATCGAACCCAAATGGCTAGCCTA  80
1  G D F G F D P L G L S D P E G T G G F I E P K W L A Y  27

81  CGGAGAAATCATCAACGGGCGGTTTCGCTATGTTGGGCGCAGTCGGAGCCATTGCACCCGAAATCTTGGGAAAGGCCGGGT  160
28  G E I I N G R F A M L G A V G A I A P E I L G K A G L  54

161  TGATCCCAGCTGAAACAGCTCTGCCATGGTTCCAAACTGGAGTCATTCCCCCGCCGGGACATACAACACTACTGGGCCGAC  240
55  I P A E T A L P W F Q T G V I P P A G T Y N Y W A D  80

241  GGTTACACCCTATTTCGTCCTCGAAATGGCGCTCATGGGCTTCGCTGAGCACCGGAGGTTCCAGGACTGGGCTAAGCCAGG  320
81  G Y T L F V L E M A L M G F A E H R R F Q D W A K P G  107

321  GTCCATGGGCAAGCAATACTTCTTGGGCTTGGAGAAGGGTTTGGGAGGGTCCGGTGACCCGGCCCTACCCCGGTGGCCCGT  400
108  S M G K Q Y F L G L E K G L G G S G D P A Y P G G P F  134

401  TCTTCAACCCTTGGGGTTCGGGAAAGACGAGAAATCAATGAAGGAGTTGAAGTTGAAGGAGGTGAAGAATGGGAGATTG  480
135  F N P L G F G K D E K S M K E L K L K E V K N G R L  160

481  GCTATGTTGGCAATCTTGGGTTACTTTATTCAGGGTCTGGTCACCGGTGTCCGGCCCATTCCAAACCTGTTAGACCATT  560
161  A M L A I L G Y F I Q G L V T G V G P F Q N L L D H L  187

561  GGCTGATCCCTGGCATAAC  579
188  A D P W H N  193

```

Abb. 18: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des cDNA-Fragments von *AmLhca1*3* (*Alonsoa meridionalis* Chlorophyll a/b-bindendes Protein Typ III, GenBank Acc.-No. AF241525, KNOP et al. 2001).

```

1   GGGGATTTTGGGTTTGACCCACTCGGTCTTGGTGAAGTTCCGGAAAACCTAGAGAGATACAAAGAATCCGAGCTTATTCÄ   80
1   G D F G F D P L G L G E V P E N L E R Y K E S E L I H   27

81  CTGCAGATGGGCTATGCTTGTCTGCCGGGATCCTAGTCCCAGAGGCTTTGGGTTTGGCAATTGGGTAAAAGCCCGG   160
28  C R W A M L A V P G I L V P E A L G F G N W V K A Q E   54

161 AATGGGCAGCAGTTCCAGGAGGCCAAGCCACTTATTTGGGCAACCCGGTTCCATGGGGCACCCCTACCCACAATTTTGGTG   240
55  W A A V P G G Q A T Y L G N P V P W G T L P T I L V   80

241 ATTGAATTCTTGGCTATTGCCTTTGTGGAGCACCAGAGGAGCATGGAGAAAAGACCCGGAAAAGAGGAAGTACCCGGGTG   320
81  I E F L A I A F V E H Q R S M E K D P E K R K Y P G G   107

321 GGCTTCGACCCGTTGGGCTACTCCAAGGCCCGAAAAAGTTTGGAGAACTCAAAGTCAAGGAAATCAAAAATGGCCGTC   400
108 A F D P L G Y S K D P K K F E E L K V K E I K N G R L   134

401 TAGCGTTGTTAGCATTTGTGGGATTCTGCGTGCAACAATCGGCATAACCCGGGTACGGGTCCATTGGAGAÄCTTGGCAACT   480
135 A L L A F V G F C V Q Q S A Y P G T G P L E N L A T   160

481 CACTTGGCGGACCCCTGGCATAACAAA   507
161 H L A D P W H N K   169

```

Abb. 19: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des cDNA-Fragments von *AbLhcal*1* (*Asarina barclaiana* Chlorophyll a/b-bindendes Protein Typ I, GenBank Acc.-No. AF241524, KNOP et al. 2001).

3.3.4 Nachweis von *SUT*-mRNA im Phloemsaft

Neben der Expression in verschiedenen Pflanzenteilen sollte auch untersucht werden, ob die mRNA von *AbSUTI* und *AmSUTI* direkt im Phloemsaft nachgewiesen werden kann. KÜHN et al. (1997) konnten durch *in situ*-Hybridisierung zeigen, daß die mRNA von *StSUTI*, einem Saccharose-Transporter der apoplastisch phloembeladenden Kartoffel, in den Siebelementen vorhanden ist.

20-100 nl einzelner Phloemsaftproben wurden mit einer bestimmten Menge internen Standards (10-100 fg) versetzt. Es folgte nun die RT-PCR mit spezifischen Primern (2.14.3). Mit dieser Methode konnten cDNA-Fragmente von *AbSUTI* und *AmSUTI* im Phloemsaft der beiden Pflanzen nachgewiesen werden (Abb. 20). Leider war die Amplifikation nur in 50-60% aller untersuchten Phloemsaftproben (n = 20) möglich. Dies könnte dadurch verursacht worden sein, daß Substanzen im Phloemsaft vorhanden waren, die die Reverse Transcriptase oder *Taq*-Polymerase mehr oder weniger stark inhibierten, wie es schon von GIETL und ZIEGLER (1979) und SASAKI et al. (1998) vermutet wurde. Für diese Hypothese spricht, daß in den Fällen, wo keine Amplifikation erfolgte, weder die Saccharose-Transporter noch die internen Standards amplifiziert wurden.

Die Kontrolle der Phloemsaft-Kontamination erfolgte durch die Amplifikation von *AbLhcal*1* und *AmLhcal*3* mit spezifischen Primern (*AbCAB-f/r*, *AmCAB-f/r*; 2.1.4). Diese Gene konnten in keinem Fall im Phloemsaft, aber immer in der Blatt-RNA detektiert werden (n = 5; Abb. 20).

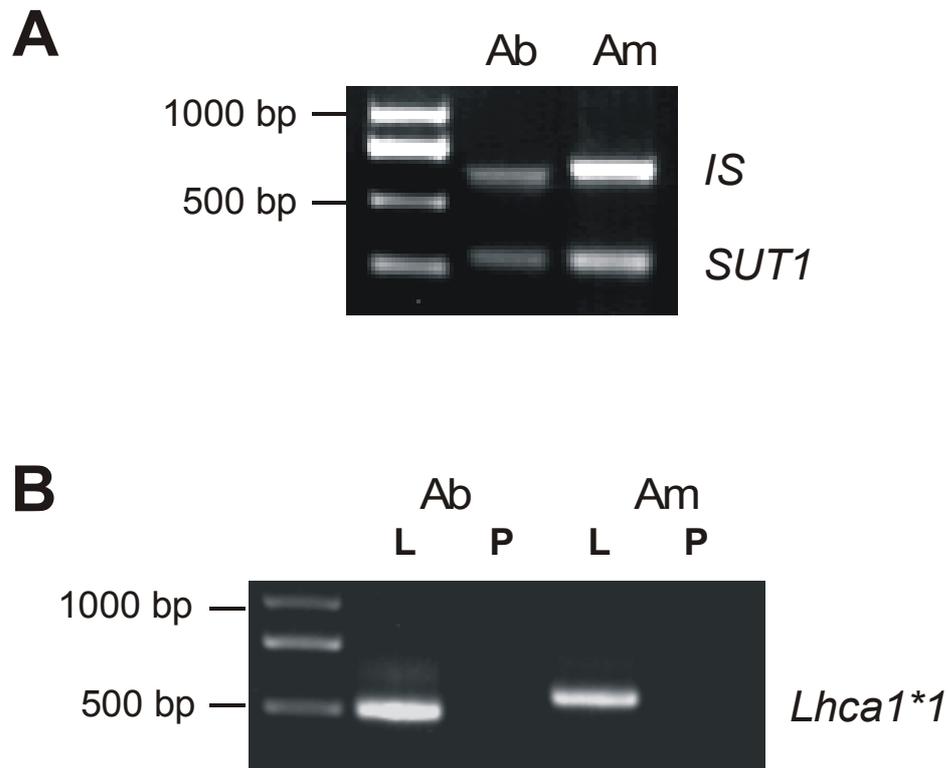


Abb. 20: **A:** Nachweis der Saccharose-Transporter-Expression im Phloemsaft von *Asarina barclaiana* (Ab) und *Alonsoa meridionalis* (Am) durch Semi-Quantitative RT-PCR. Zum Abgleich der Amplifikationsraten in den einzelnen Proben wurden jeweils 100 fg interner RNA-Standard (*AbIS* bzw. *AmIS*) zugegeben. **B:** Nachweis der Reinheit des Phloemsafts durch Amplifikation der mRNA von *Lhca1* (eine mesophyllspezifische, kerncodierte Komponente des Lichtsammel-Komplexes von Photosystem I). Eine Amplifikation ist nur bei Blatt-RNA (L), aber nicht bei Phloemsaft (P) nachweisbar.

3.4 Charakterisierung des *AmSUT1*-Promotors

Aus der Analyse der Metabolitgehalte und der Organ-spezifischen Expression ergab sich, daß *AmSUT1* derjenige Transporter war, der in Hinblick auf seine Lokalisation genauer untersucht werden sollte. Schließlich entspricht *Alonsoa* mit seiner offenen „minor vein“-Anatomie und vornehmlich Raffinose-Oligosacchariden als Transportzucker dem klassischen Typus eines symplastischen Phloembeladers. Die starke Expression von *AmSUT1* im Stengel, aber auch im ausgewachsenen Blatt, sprachen für eine Funktion dieses Transporters bei der Phloembeladung von Saccharose und/oder beim sog. Saccharose „retrieval“. Das „Herauslecken“ von Saccharose aus den Siebelementen während des Phloemtransports ist experimentell bisher kaum untersucht (GRIMM et al. 1990, 1997, ROTHE et al. 1999). Es erscheint aber aufgrund der hohen Konzentrationsdifferenzen wahrscheinlich, daß ein solches Phänomen existiert. Auch die Expression von verschiedenen Saccharose-Transportern

(z.B. AtSUC2, PmSUC2; STADLER et al. 1995, TRUERNIT und SAUER 1995, STADLER und SAUER 1996) im Phloem von großen Blattadern und Stengeln spricht für die Notwendigkeit einer Wiederaufnahme von Saccharose während des Ferntransports. Um die Expression von *AmSUT1* genauer lokalisieren zu können, sollte der *AmSUT1*-Promotor isoliert und Promotor-Markergenfusionen hergestellt werden.

3.4.1 Isolierung des *AmSUT1*-Promotors

Durch Herstellung einer „Genome Walker Library“ (2.10.3.1) war es möglich, mit der PCR-basierten Methode des „Genome Walking“ (2.10.3.2) ein ca. 1.5 kb langes Stück des *AmSUT1*-Promotors zu identifizieren. Die Sequenz des Promotors ist in Abbildung 21 dargestellt.

```

-1524  AAAACTCACAAAAACTCGTGTAATAAATAACTTTGAATTTTCTAATCAACAAGATTAGTGCTCAATATAATTTTATTTTAT  -1445
-1444  TTTATATTTTCTTTTGTGCACACTTAATGCTTGTCAAACCATTTTCAATTATAGTCTAAAAAATTCAACAAAATCAATTT  -1365
-1364  ACTTTCCTTTTTTCCAGAAAGTCAAAGCATCTGTGTCATGCTTGGCAGTACTAAAGACTTAAATAAGTAATTACAAAA  -1285
-1284  ATATGTAATCCTTTTCATTAATTTGTAGTAAATTTATTGCCTTTATGTAGATTTTCTCTAGCTCGAAAAATTCTTATAT  -1205
-1204  GCATCGGATTTTTCTCGCATAATACGGCTCGAATAATATCTCATCAACATAGTGAACAGTGATTGCACCATTACTGATAT  -1125
-1124  GATATTATCCAAACTGTATGGTGTTCGAACCCGATTTCATACAGTTTTTTCGATGTTTTTCTATTTTCTTTTTCGCTAGTA  -1045
      TATCCA (SRS)
-1044  ATAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA  -965
-964  TTCTTACCACAAAAAGCTGCAAAAAAAGATTGAATTTGTTGACCATTAGGTGACTTTAATTTCCAACCTTTTACACTTTT  -885
-884  TTACCCTAAAAGCCAATATGGATACGGAAAATCTGATTTTATCCAATCAAAGTTCCCTCAATAGATAAGTCAATAATAT  -805
      AATAGAAA (SURE 1)
-804  ATTTTCATGAGATTATGGCAATTAAGGGCAAAATTTATGTGATTTTATGAATAATATTAAGAACTAACCATAAATACT  -725
      AATACT
-724  ATAACATTAATCTCGTAATCGGTAATTGGATATAAAAAACCAATCAACTGAAAATCTTTTGTTATGAATAATACTTTCA  -645
      AAT (SURE 2)
-644  GAAAAATTACATATGAACCAGGTCTACATACACCATAACAAGGAGCGACATCGTGATTCCCTATAACCCCAATATACGGTT  -565
-564  GATAATAATTTGATTACTATTACGCTCATCTCATAATTAACAATTAGACACAATAAAATTGGGTCTATCCAAATCTATA  -485
-484  CTACGGATAACATTATATCAAAAAATTCCTACATAAATCAGATCTTCACACACCATATAATAAAGTCGCACCCTTCAAAC  -405
-404  CACGAGGTCGGGTCCATAAGACCTAACGTAAGATATTATTGTTCCCATCTTTACAAGTTGTAACCTCGATTTCTTACATA  -325
-324  AATACAATTAAGTTGAGCAGTTAAATGTCATTACACTTGTTTTATAATTGATAATCAGATAACAGATGTAGTCAAACCAA  -245
-244  AATCTCAGCTATGGATAATATCGGACAAGTGAAAATCTTGTCCAAACCGAGCCTGCACACAGCATGAGGTGGCATCGT  -165
-164  TACAGCCTCAGATTTCATTCGAAATCATTTGTTTCCCGCCAAAACCGTTATAAATACCCCCATGGCTTCACCATCTCA  -85
-84  CCACTCCTGTGCATGTAATAACACGTCACAAACACACACAGTTTTACACACACAAAATACACACACTCAAAGATC  -5
      CACGTG (G-Box)
-4  ATCAATG 3
      M

```

Abb. 21: Sequenz des *AmSUT1*-Promotors. Mögliche regulatorische *cis*-Elemente sind unterstrichen. Darunter sind jeweils die Sequenzen der schon beschriebenen Elemente angegeben. SRS = sugar response sequence (LU et al. 1998); SURE = sucrose responsive element (GRIERSON et al. 1994), G-Box (URWIN und JENKINS 1997).

Mit Hilfe diverser Computerprogramme (2.19.1) wurde der Promotor auf potentielle *cis*-Elemente untersucht, an die Transkriptionsfaktoren binden könnten. Dies geschah v.a. im Hinblick auf Elemente, die als Regulatoren des Zuckermetabolismus bekannt sind. Einige solcher Sequenzen konnten im *AmSUT1*-Promotor gefunden werden. Dabei handelte es sich an der Position -1119 bis -1114 um eine „sugar response sequence“ (SRS, Abb. 21). Dieses Element bewirkt im Promotor der α -Amylase aus Reis eine Induktion der Genexpression bei Glucosemangel (LU et al. 1998). Desweiteren konnten an Position -824 bis -816 und -730 bis -722 zwei potentielle „sucrose responsive elements“ (SURE1 und SURE2, Abb. 21) identifiziert werden. Diese *cis*-Elemente bewirken im Patatin-Promoter der Kartoffel eine Induktion der Genexpression bei hohen Saccharose-Konzentrationen (GRIERSON et al. 1994). Als letztes putativ regulatorisches Element wurde im *AmSUT1*-Promotor eine G-Box an Position -62 bis -57 gefunden (Abb. 21). URWIN und JENKINS (1997) zeigten, daß dieses Element wichtig für die starke Expression des *rbcS2*-Promotors aus *Phaseolus* ist und dessen Beeinflußbarkeit durch Saccharose bewirkt.

Inwieweit diese *cis*-Elemente tatsächlich die Expression von *AmSUT1* in *Alonsoa* beeinflussen, müßte zukünftig durch detaillierte Promotor-Deletionsanalysen geklärt werden.

3.4.2 Konstruktion von *AmSUT1*-Promotor-Reportergen-Fusionen zur Lokalisierung der Promotoraktivität

Um die Expression von *AmSUT1* genauer zu lokalisieren, wurden die Reportergene β -Glucuronidase (GUS) und das "green fluorescent protein" (GFP) unter Kontrolle des *AmSUT1*-Promotors heterolog in *Arabidopsis thaliana* exprimiert.

Die genauen Klonierungsstrategien zur Herstellung der *AmSUT1*-Promotor-GUS- und *AmSUT1*-Promotor-GFP-Konstrukte sind in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt. Zunächst wurden durch PCR mit spezifischen Primern (AmSpro5' und AmSpro3', 2.1.4) an *AmSUT1* Schnittstellen angefügt. Dabei handelte es sich am 5'-Ende um eine *EcoRI*-Schnittstelle, am 3'-Ende um Schnittstellen von *AatII*, *SphI* und *EcoRI* (von innen nach außen). Dieses PCR-Produkt wurde in den Vektor pBluescript II KS+ (2.1.3) kloniert.

GUS mit zugehörigem *nos*-Terminator wurde aus dem Plasmid pBI101.3 (JEFFERSON et al. 1987) durch PCR amplifiziert, um auch hier mit spezifischen Primern (GUS5' und GUS3', 2.1.4) Restriktionsschnittstellen für *AatII* am 5'-Ende und *SphI* am 3'-Ende einzuführen. Analog geschah dies für *GFP* mit zugehörigem *35S*-Terminator (REICHEL et al. 1996) mit den Primern GFP5' und GFP3' (2.1.4). Beide PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM-T Easy kloniert.

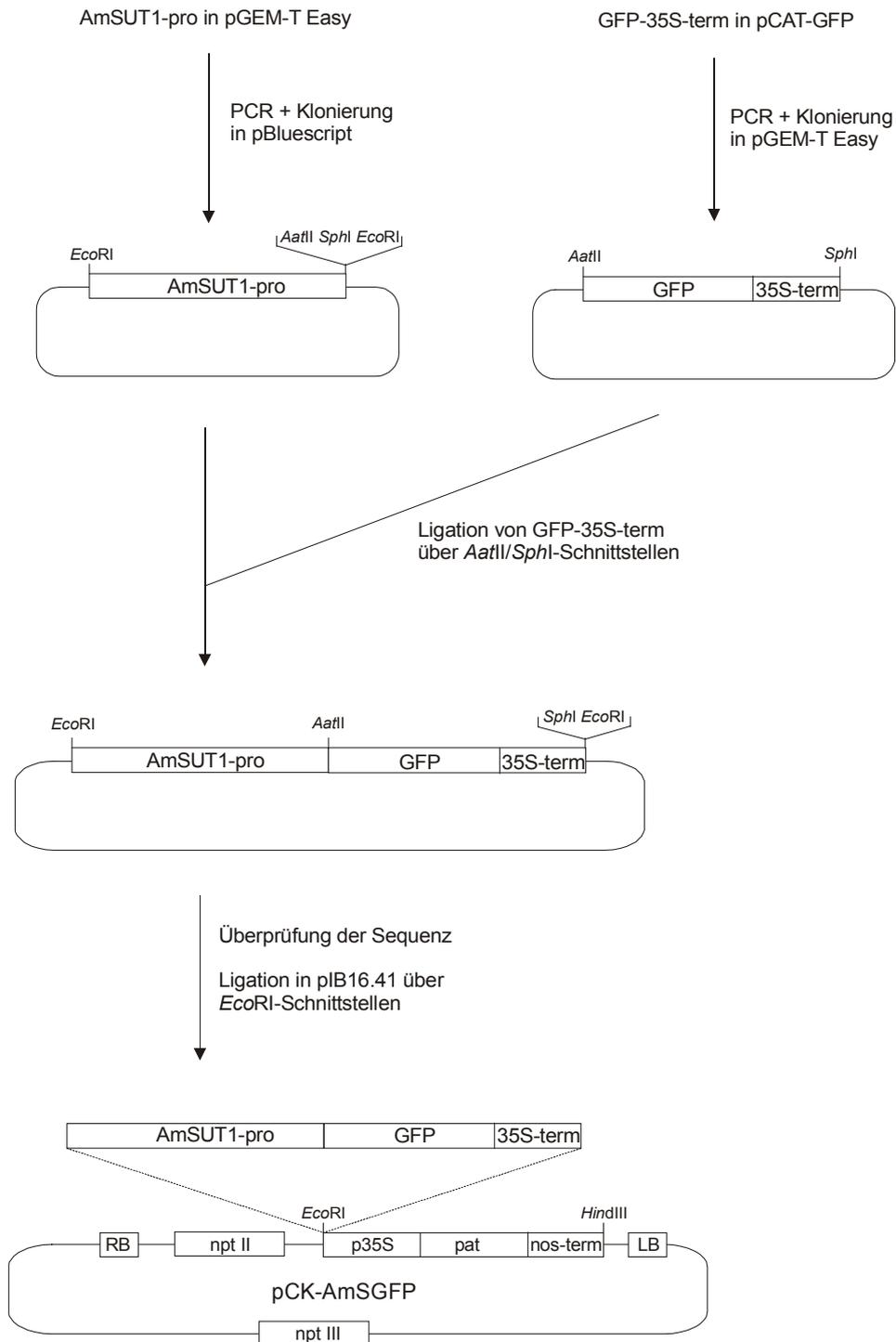


Abb. 22: Klonierungsstrategie zur Herstellung des *AmSUT1*-Promotor-*GUS*-Konstrukts. Zunächst wurden mittels PCR neue Schnittstellen an die 5'- und 3'-Enden des *AmSUT1*-Promotors und der β -Glucuronidase (*GUS*) mit zugehörigem *nos*-Terminator angefügt. Über die *AatII/SphI*-Schnittstelle wurde dann *GUS* hinter den *AmSUT1*-Promotor gesetzt. Nach einer Überprüfung der Sequenz auf Amplifikationsfehler durch die PCR wurde die Expressionskassette über die *EcoRI*-Schnittstellen an den Enden schließlich in den binären Vektor pIB16.41 eingesetzt. Das neu entstandene Plasmid wurde pCK-AmSGUS benannt.

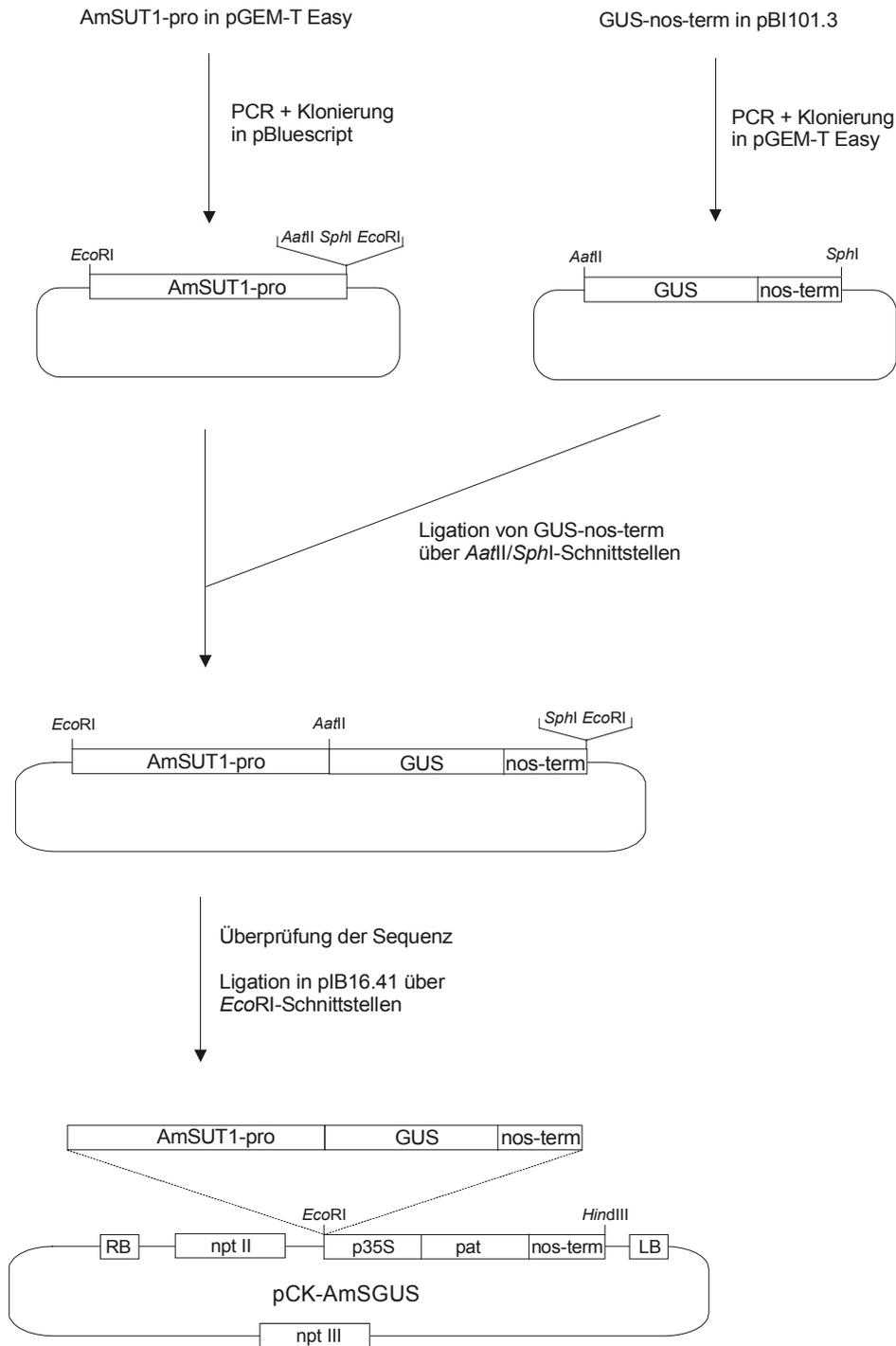


Abb. 23: Klonierungsstrategie zur Herstellung des *AmSUT1*-Promotor-*GFP*-Konstrukts. Zunächst wurden mittels PCR neue Schnittstellen an die 5'- und 3'-Enden des *AmSUT1*-Promotors und von *GFP* mit zugehörigem 35S-Terminator angefügt. Über die *AatII/SphI*-Schnittstelle wurde dann *GFP* hinter den *AmSUT1*-Promotor gesetzt. Nach einer Überprüfung der Sequenz auf Amplifikationsfehler durch die PCR wurde die Expressionskassette über die *EcoRI*-Schnittstellen an den Enden schließlich in den binären Vektor *pIB16.41* eingesetzt. Das neu entstandene Plasmid wurde *pCK-AmSGFP* benannt.

Über die *Aat*II- und *Sph*I-Schnittstellen wurden anschließend die Markergen-Terminator-DNAs hinter den *AmSUT1*-Promotor in pBluescript ligiert. Die so entstandene Expressionskassette wurde noch einmal durch Sequenzierung überprüft um auszuschließen, daß während der PCR-Schritte Amplifikationsfehler aufgetreten waren. Die Expressionskassette wurde im Anschluß an den außen liegenden *Eco*RI-Schnittstellen ausgeschnitten und in die T-DNA des binären Vektors pIB16.41 (DRÖGE et al. 1992) ligiert.

Die neu entstandenen Plasmide zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurden pCK-AmSGUS und pCK-AmSGFP genannt (Abb. 24). pIB16.41 wurde als binärer Vektor ausgewählt, da er als Selektionsmarker für transgene Pflanzen die BASTA[®]-Resistenz vermittelt. Dies ermöglicht ein einfacheres Screening im Gegensatz zu Pflanzen mit Kanamycin-Resistenz, die in Sterilkultur selektioniert werden müssen.

Zudem wurde der Versuch unternommen, nicht nur *Arabidopsis*, sondern auch *Alonsoa* durch "floral dip" zu transformieren, da diese Methode recht einfach und ohne Mehraufwand für mehrere Pflanzenarten durchzuführen ist. Bisher hatte noch niemand versucht, diese Pflanzenart zu transformieren. Da keine Untersuchungen zur Anzucht von *Alonsoa* in Sterilkultur vorlagen, schien es auch aus diesem Grund sinnvoll, das BASTA[®]-System anstatt des Kanamycin-Systems zu verwenden. Allerdings zeigte sich, daß *Alonsoa* mit dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll des "floral dip" (2.11.6.4) nicht transformiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

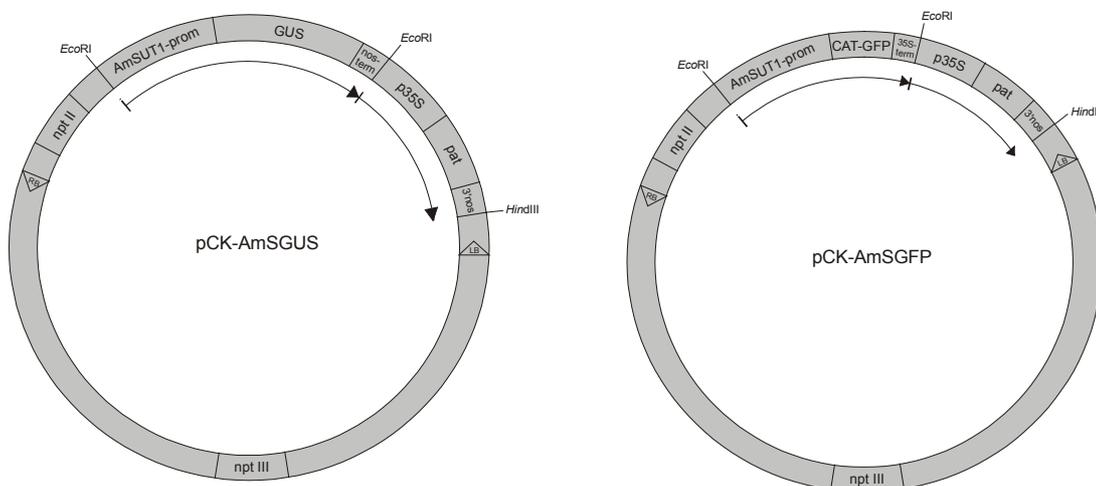


Abb. 24: Binäre Vektoren zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*. Beide Plasmide leiten sich vom Plasmid pIB16.41 (DRÖGE et al. 1992) ab. Der Vektor vermittelt der Pflanze eine Resistenz gegenüber dem Herbizid BASTA[®] (pat = Phosphinotricin-Acetyltransferase = BASTA[®]-Resistenz; npt = Neomycin-Phosphotransferase = Kanamycinresistenz).

3.4.3 Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit *AmSUTI*-Promotor-Reportergen-Fusionen

Zunächst wurde *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 (pMP90) (KONCZ und SCHELL 1986) mit den Plasmiden pCK-AmSGUS oder pCK-AmSGFP transformiert (2.11.6.2). Diese wurden anschließend dazu genutzt, *Arabidopsis thaliana* mit der "floral dip"-Methode zu transformieren (2.11.6.4, CLOUGH und BENT 1998, BENT 2000). Die Samen der so transformierten Pflanzen wurden auf Erde ausgesät und nach ca. drei Wochen mit dem Herbizid BASTA[®] besprüht, wodurch die untransformierten Pflanzen abstarben. Die auf der T-DNA enthaltene Phosphinotricin-Acetyltransferase (Abb. 24) ermöglicht die Entgiftung von BASTA[®] (= Glufosinat = L-Phosphinotricin) durch Acetylierung des Moleküls. Dadurch können die transformierten Pflanzen auch bei Herbizidbehandlung normal weiterwachsen. Nach einer Woche wurde die Behandlung wiederholt. Die transgenen Pflanzen wurden vereinzelt und nach ihrer Blüte die Samen geerntet. Diese Prozedur wurde mit den *AmSUTI*-Promotor-*GUS*-Pflanzen solange wiederholt, bis homozygote transgene Linien erhalten wurden (T4-Generation).

Die Transgenizität dieser Pflanzen wurde durch PCR nachgewiesen (Abb. 25). Hierzu wurde genomische DNA aus den Pflanzen isoliert (2.8.2.2) und in dieser ein Teil der T-DNA (*GUS-nos-term*, Abb. 22) amplifiziert, der in das Pflanzengenom übertragen worden war.

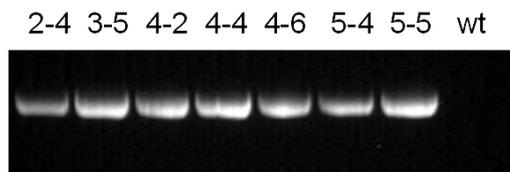


Abb. 25: Nachweis der Transgenizität der mit pCK-AmSGUS transformierten Pflanzen. In genomischer DNA der homozygoten T4-Linien #2-4, #3-5, #4-2, #4-4, #4-6, #5-4 und #5-5 wurde durch PCR ein Fragment der T-DNA amplifiziert (*GUS-nos-term*; 2.1 kb). Dieses war im Wildtyp (wt) nicht vorhanden.

Die homozygoten *AmSUTI*-Promotor-*GUS*-Pflanzen wurden in verschiedenen Altersstadien mittels des histochemischen *GUS*-Tests (2.16) angefärbt. Als einziges reproduzierbares Signal war in sehr großen, ausgewachsenen Blättern (≥ 4 cm Länge) nach 40 h eine Färbung in der Mittelrippe und den größeren Blattadern zu erkennen. Diese Beobachtung lies sich aber nicht auf die Expression von *GUS* unter Kontrolle des *AmSUTI*-Promotors zurückführen, da der Wildtyp die gleiche Färbung zeigte (Daten nicht gezeigt).

Die Vermehrung der *AmSUTI*-Promotor-*GFP*-Pflanzen wurde in der T2-Generation abgebrochen, da sich hier schon andeutete, daß, wenn überhaupt, nur eine sehr schwache Expression der Reportergene vorlag. Da die Nachweisgrenze von *GFP* weit über der von *GUS* liegt, war zu vermuten, daß bei

fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen kein *GFP*-Signal detektiert werden würde. Dies wurde durch Untersuchung der Pflanzen im Fluoreszenz-Mikroskop bestätigt (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, daß der 1.5 kb *AmSUT1*-Promotor in *Arabidopsis* nicht aktiv ist.

3.5 Immunochemische Untersuchungen von AmSUT1

Um die Beteiligung des Saccharose-Transporters AmSUT1 an der Phloembeladung und dem Saccharose „retrieval“ in *Alonsoa meridionalis* nachweisen zu können, wurden polyklonale anti-AmSUT1-Peptid-Antikörper hergestellt (2.15.1). Mit diesen Antikörpern erfolgte die subzelluläre und die histologische Lokalisation des Saccharose-Transporter-Proteins.

3.5.1 Herstellung eines Antikörpers gegen AmSUT1

Als antigene Peptide zur Herstellung von Peptid-Antikörpern wurden die N- und C-terminalen Regionen von AmSUT1 ausgewählt (2.15.1). Diese Peptide wurden an das Trägerprotein KLH gekoppelt und in insgesamt sechs Kaninchen injiziert. Drei Kaninchen wurden gegen den N-Terminus, drei gegen den C-Terminus von AmSUT1 immunisiert.

Die Kaninchen, die gegen den C-Terminus immunisiert worden waren, zeigten schon nach 90 Tagen eine gute Immunreaktion, wohingegen zu diesem Zeitpunkt noch keine Antikörper gegen den N-Terminus gebildet worden waren. Allerdings wurde vom Antiserum der gegen den C-Terminus immunisierten Kaninchen nicht nur AmSUT1, sondern auch eine große Anzahl weiterer *Alonsoa*-Blatt-Proteine erkannt (Daten nicht gezeigt). Dies hätte eine Aufreinigung des anti-AmSUT1-C-Antikörpers nötig gemacht. Hingegen erwies sich das Antiserum gegen den N-Terminus nach 135 Tagen Immunisierung als günstiger. Nach dieser langen Immunisierungszeit war der Titer der anti-AmSUT1-N-Antikörper sehr gut (Abb. 26). Nach nur 1 min Expositionszeit und einer Verdünnung des Antiserums von 1:1000 ergab der Antikörper ein starkes Signal in Plasmamembranen aus Hefen, die AmSUT1 exprimierten (CKY-Am1s, 3.2.1.2). Dies war bei allen drei immunisierten Kaninchen der Fall (Abb. 26). Zudem waren keine Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen aus *Alonsoa* erkennbar.

Der anti-AmSUT1-N-Antikörper erkannte eine einzelne Bande in AmSUT1-exprimierenden Hefen, die im SDS-Gel bei ca. 43 kDa erschien. Diese Bande war in *AmSUT1*-antisense-Hefen (CKY-Am1as, 3.2.1.2) nicht nachweisbar (Abb. 26). Das apparente Molekulargewicht lag ca. 9 kDa unter dem berechneten Gewicht von AmSUT1 (52.3 kDa). Dieses Laufverhalten von in Membranen lokalisierten Transportproteinen im SDS-Gel wurde schon häufig beobachtet. So zeigten SAUER und STADLER (1993), daß der Hexose-Transporter NtMST1 trotz seines Molekulargewichts von 57.7 kDa bei nur 42

kDa im SDS-Gel läuft. Auch der *Chlorella* H⁺/Glucose Cotransporter HUP1 (SAUER und TANNER 1984) und die Saccharose-Transporter PmSUC2 (STADLER et al. 1995) und RcSUT1 (BICK et al. 1998) zeigen dasselbe Verhalten. Möglicherweise laufen diese lipophilen Membranproteine in SDS-Gelen bei kleineren apparenten Molekulargewichten, da sie ein Übermaß an negativ geladenen Detergens-Molekülen binden können.

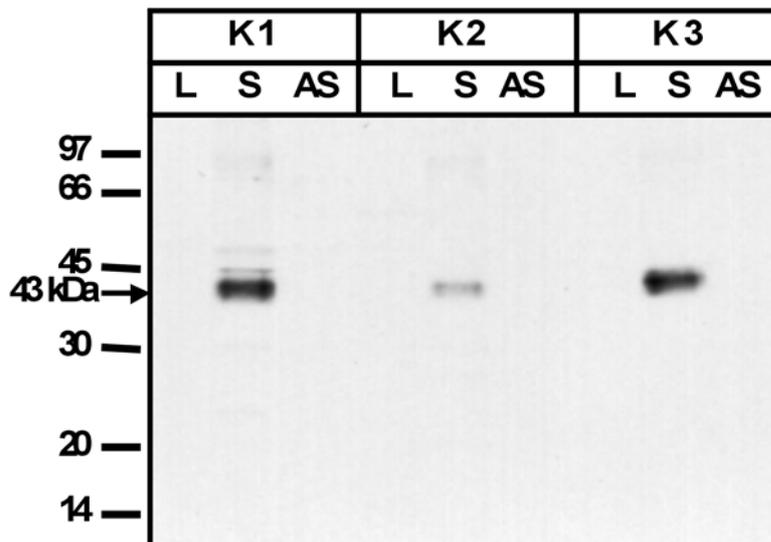


Abb. 26: Western Blot-Analyse der Antiseren von Kaninchen 1, 2 und 3 (K1, K2, K3) nach 135 Tagen Immunisierung gegen das N-terminale Peptid von AmSUT1. Es wurden jeweils 5 µg Protein aus *Alonsoa*-Blattextrakten (L), Plasmamembranen von AmSUT1-exprimierenden Hefen (S) und Plasmamembranen von Hefen mit *AmSUT1* in antisense-Orientierung (AS) aufgetragen. In den AmSUT1-exprimierenden Hefen wird ein einzelnes Protein bei 43 kDa detektiert, was in der Negativkontrolle (*AmSUT1* in antisense-Orientierung) nicht vorhanden ist. Zudem zeigten die Antiseren gegen das N-terminale Peptid keine Kreuzreaktivität mit verschiedenen Blattproteinen (Spur L). Aufgetragene Menge: 5 µg pro Spur. Links: Molekulargewichtsstandard.

Aufgrund der im Western-Blot erzielten Ergebnisse wurde das anti-AmSUT1-N-Peptid-Antiserum von Kaninchen 3 nach 135 Tagen Immunisierung ohne weitere Aufreinigung für alle weiteren Experimente genutzt. Es wird im folgenden aufgrund seiner hohen Spezifität als anti-AmSUT1-N3-Antikörper bezeichnet.

3.5.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AmSUT1

Es wird postuliert, daß die bisher bekannten Saccharose-Transporter in der Plasmamembran lokalisiert sind (LALONDE et al. 1999, WILLIAMS et al. 2000). Für einige dieser Transporter wurde dies entweder durch subzelluläre Fraktionierung der Membranproteine und anschließenden Western-Blot oder durch elektronenmikroskopisch-immunocytochemische Untersuchungen nachgewiesen.

Um zu bestätigen, daß AmSUT1 ebenfalls ein Protein der Plasmamembran ist, wurde durch ein Zwei-Phasen-System die Plasmamembranfraktion aus *Alonsoa*-Blättern von den anderen Membranfraktionen getrennt (2.6.2). Abbildung 27 zeigt die Western Blot-Analyse zum Nachweis der Spezifität des anti-AmSUT1-N3-Antikörpers und der Lokalisation von AmSUT1.

In Spur A ist das spezifische Signal bei 43 kDa in Plasmamembranen von AmSUT1-exprimierenden Hefen (CKY-Am1s, 3.2.1.2) zu sehen. Dieses Signal verschwindet, wenn der Antikörper mit seinem antigenen Peptid präinkubiert wurde (Spur C). Dies zeigt, daß der anti-AmSUT1-N3-Antikörper spezifisch die N-terminale Sequenz von AmSUT1 (NH₂-MEVGNEAKSTALPPAQA-COOH) erkennt. Ein Signal in *AmSUT1*-antisense-Hefen war nicht sichtbar (CKY-Am1as, Spur B).

AmSUT1 konnte ebenfalls in der Plasmamembranprotein-Fraktion aus *Alonsoa*-Blättern detektiert werden (Spur D), wohingegen die Menge des AmSUT1-Proteins zu gering war, um im Gesamtproteinextrakt von Blättern (E) und Stengel (F) nachgewiesen werden zu können. Dies läßt vermuten, daß AmSUT1 ein nur schwach exprimiertes Protein der Plasmamembran ist. In Spur G ist zu sehen, daß das Präimmunserum keinerlei Signal in AmSUT1-exprimierenden Hefen lieferte.

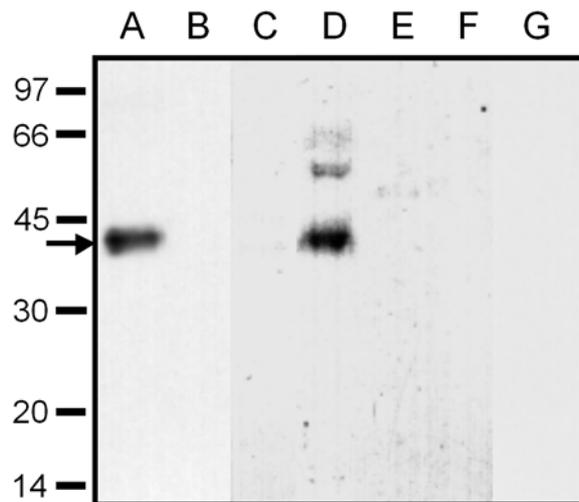


Abb. 27: Western-Blot Analyse des anti-AmSUT1-N3-Antikörpers. Das Antiserum detektiert ein einzelnes Protein von ca. 43 kDa (Pfeil) in Plasmamembranen von Hefen, die AmSUT1 exprimieren (A). Diese Bande ist bei Plasmamembran-Proteinen von Hefen, die *AmSUT1* in antisense-Orientierung enthielten, nicht zu sehen (B). Durch Vorinkubation des Antiserums mit dem für die Immunisierung genutzten N-terminalen Peptid von AmSUT1 wird der Antikörper spezifisch blockiert und bindet nicht mehr an das Protein aus AmSUT1-exprimierenden Hefen (C).

AmSUT1 ist in Pflanzen nur in Plasmamembran-Präparationen (D) nachweisbar, nicht jedoch in Gesamtprotein-Extrakten aus Blatt (E) und Stengel (F). Das Präimmunserum (G) zeigt keine Reaktionen mit Proteinen aus AmSUT1-exprimierenden Hefen. Aufgetragene Menge: 5 µg pro Spur. Links: Molekulargewichtsstandard.

3.5.3 Immunohistochemische Lokalisation von AmSUT1 in Gewebeschnitten

Verschiedene Gewebe von *Alonsoa meridionalis* wurden in Methacrylat eingebettet und entweder quer oder längs in 2 µm dünne Schnitte mit einem Ultramikrotom geschnitten (2.15). Diese Schnitte wurden mit dem anti-AmSUT1-N3-Antikörper oder ohne diesen (Negativkontrolle) inkubiert. Danach folgte der Nachweis des Primär-Antikörpers mit FITC-markiertem Sekundär-Antikörper (2.15.3.3). Die Lokalisation der grünlich fluoreszierenden FITC-Konjugate erfolgte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei einem Anregungslicht von 450-490 nm.

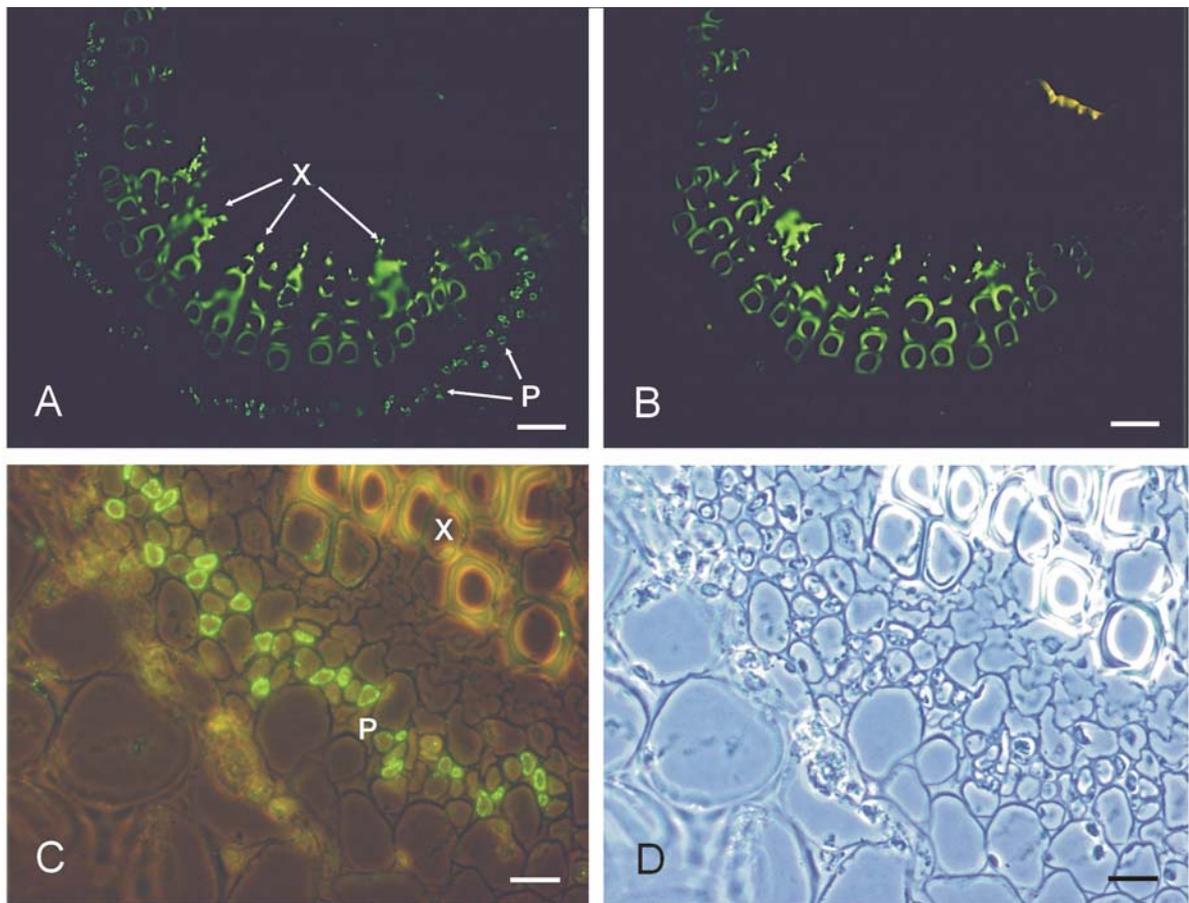


Abb. 28: Immunocytochemische Lokalisation von AmSUT1 im Phloem der Blatt-Mittelrippe von *Alonsoa meridionalis*. **A:** Querschnitt durch die Mittelrippe. Die abaxial gelegenen Zellen des Phloems sind markiert. **B:** Gleicher Schnitt wie in **A**, aber ohne Behandlung mit anti-AmSUT1-N3-Antikörper (Negativkontrolle). Es ist nur die gelblich-grüne Autofluoreszenz des Xylems zu erkennen. **C:** Querschnitt durch die Mittelrippe bei stärkerer Vergrößerung und simultaner Fluoreszenz- und Durchlicht-Beleuchtung. Bei den durch FITC grünlich markierten Zellen handelt es sich vermutlich um Geleitzellen, da sie ein dichtes Cytoplasma besitzen (**D**, lichtmikroskopisches Bild von **C**). P = Phloem; X = Xylem; Balken: **A, B** = 100 µm; **C, D** = 25 µm.

In Abbildung 28 ist die immunocytochemische Lokalisation von AmSUT1 im Phloem der Mittelrippe von ausgewachsenen *Alonsoa*-Blättern dargestellt. Im Querschnitt durch die Mittelrippe ist der Kranz aus Phloemzellen unterhalb der grünlich-gelb autofluoreszierenden Xylemstränge deutlich markiert (A). In der Negativkontrolle (B) fehlt diese Markierung. Abb. 28 C zeigt den gleichen Schnitt bei stärkerer Vergrößerung und in kombiniertem Fluoreszenz- und Durchlicht. Bei den stark grünlich leuchtenden Zellen handelt es sich vermutlich um Geleitzellen, da diese ein dichtes Cytoplasma besitzen (D). Ob dies Intermediärzellen oder gewöhnliche Geleitzellen sind, lässt sich lichtmikroskopisch nicht genauer klären.

Auch in den kleineren Blattadern ist AmSUT1 im Phloem lokalisiert. Abbildung 29 zeigt die immunocytochemische Lokalisation von AmSUT1 in einer Blattader 3. Ordnung (A, B) und in einer „minor vein“ (C, D). Die abaxial, unterhalb des Xylems liegenden Zellen des Phloems zeigen die typische FITC-Fluoreszenz (A, C). In der Negativkontrolle (B) ist nur die gelbliche Autofluoreszenz des Xylems zu erkennen.

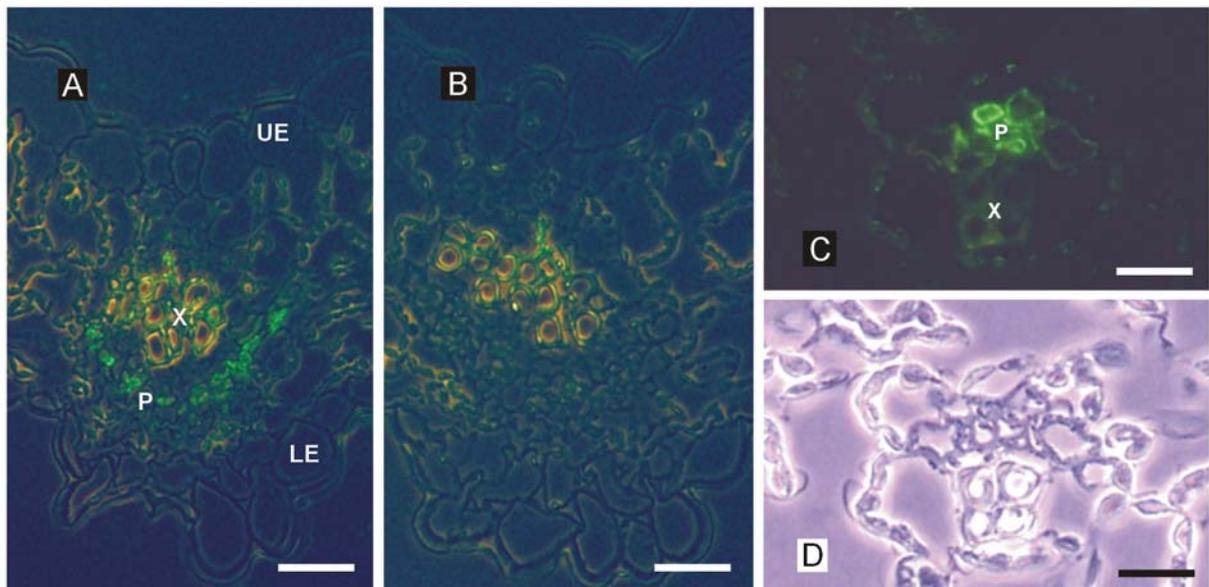


Abb. 29: Immunocytochemische Lokalisation von AmSUT1 im Phloem der Blattadern 3. Ordnung (A, B) und der „minor veins“ (C, D). A: Querschnitt durch eine Blattader 3. Ordnung. Die abaxial gelegenen Zellen des Phloems sind durch FITC grünlich markiert. B: Gleicher Schnitt wie in A, jedoch ohne Behandlung mit anti-AmSUT1-N3-Antikörper (Negativkontrolle). C: Querschnitt durch eine „minor vein“. Die Zellen des Phloems sind markiert. D: Lichtmikroskopische Aufnahme von C. P = Phloem, X = Xylem, LE = untere Epidermis; UE = obere Epidermis; Balken: A, B = 25 µm; C, D = 10 µm.

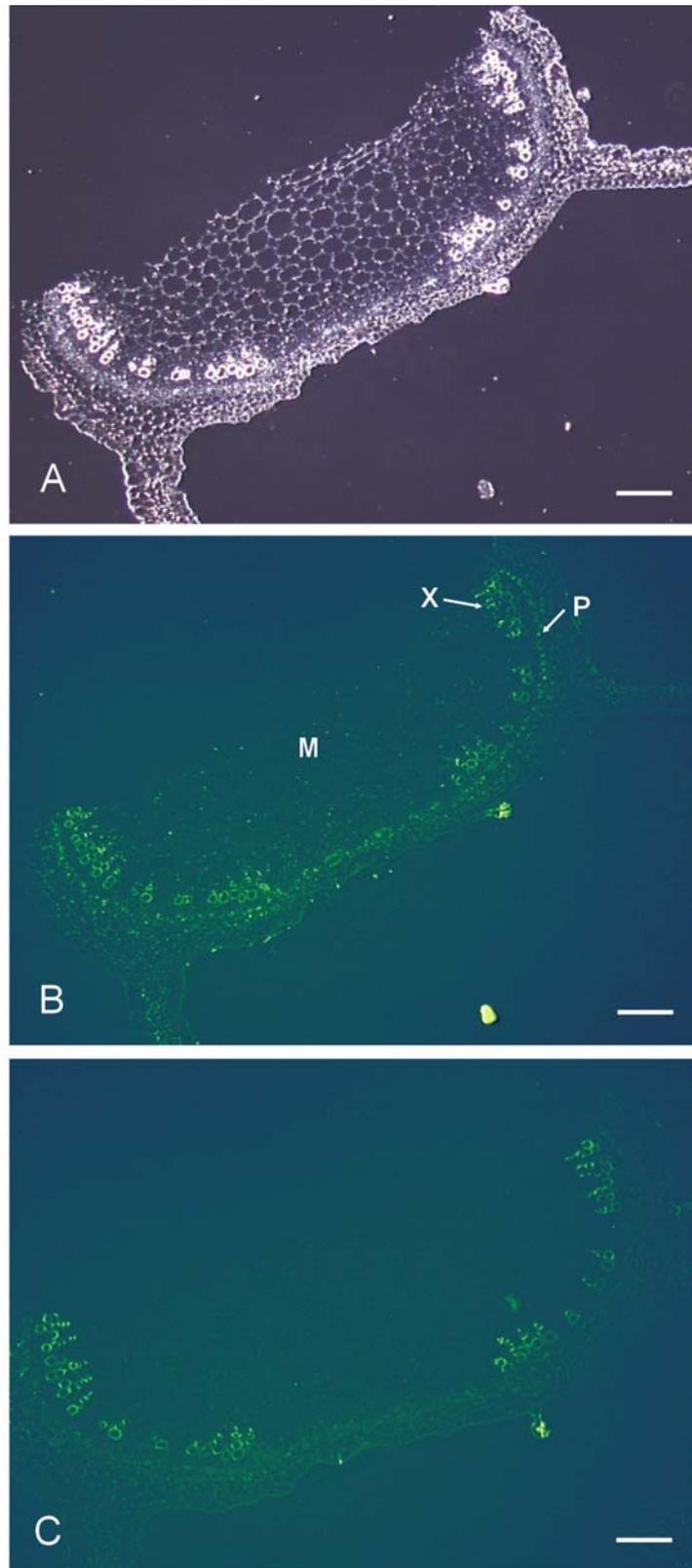


Abb. 30: Immunocytochemische Lokalisation von AmSUT1 im Phloem des Stengels von *Alonsoa meridionalis*. **A:** Querschnitt einer Stengelhälfte (Dunkelfeld-Aufnahme). **B:** Nachweis von AmSUT1 durch FITC-Fluoreszenz im Phloem (gleicher Schnitt wie in **A**). **C:** Stengelquerschnitt ohne Behandlung mit anti-AmSUT1-N3-Antikörper (Negativkontrolle). Die Phloemstränge sind hier nicht markiert. P = Phloem; X = Xylem; M = Markparenchym; Balken = 100 μ m.

Auch der Stengel wurde immunohistochemisch auf das Vorkommen von AmSUT1 untersucht, da dieses Organ die höchste AmSUT1-Expression zeigte (3.3.2). Auch im Stengel konnte AmSUT1 im Phloem lokalisiert werden (Abb. 30). Der zwischen Xylem und Epidermis liegende Kranz aus Phloemzellen wurde deutlich grün markiert (B). Diese Markierung trat in der Negativkontrolle nicht auf (C).

Bei stärkerer Vergrößerung fiel auf, daß im Stengel ganze SE-CC-Komplexe durch FITC markiert wurden (Abb. 31). In den Geleitzellen war die Markierung über die ganze Zelle verteilt, wohingegen sie im zugehörigen Siebelement v.a. am Rand zu finden war.

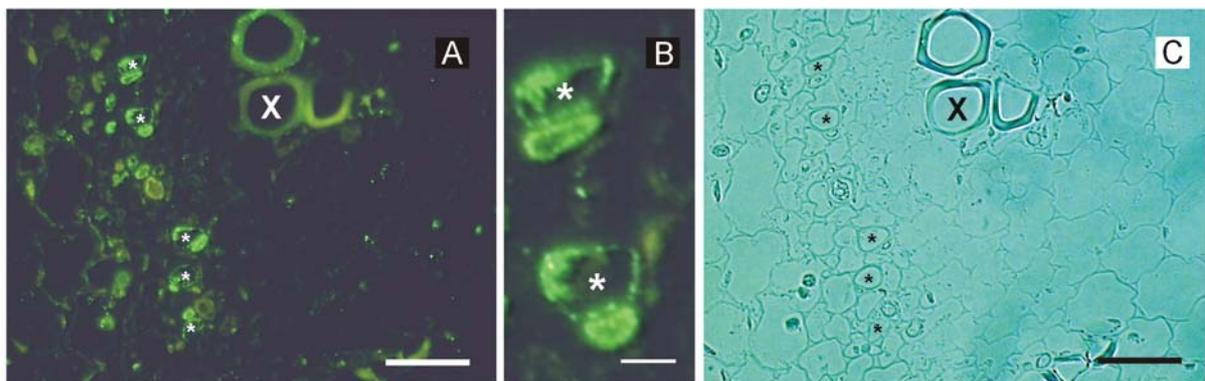


Abb. 31: Immunocytochemische Lokalisation von AmSUT1 in Siebelementen und Geleitzellen des Phloems. **A:** Ausschnitt aus dem Stengelquerschnitt von *Alonsoa meridionalis* (Abb. 30). **B:** Zwei Siebelement-Geleitzellen-Komplexe aus **A** bei stärkerer Vergrößerung. Die Siebelemente sind nur am Rand markiert, während die zugehörigen Geleitzellen mehr oder weniger vollständig markiert sind. **C:** Lichtmikroskopische Aufnahme von **A**. X = Xylem; * = Siebelement (mit zugehöriger Geleitzelle); Balken: **A, C** = 50 µm; **B** = 10 µm.

Diese Beobachtung wurde auch durch die Untersuchung von Stengel-Längsschnitten bestätigt. Diese wurden jeweils mit DAPI oder Anilinblau angefärbt. Da DAPI Zellkerne anfärbt, ist es ein Marker für Geleitzellen. Anilinblau färbt die Callose in den Siebplatten und markiert daher Siebelemente. Abbildung 32 zeigt die immunocytochemische Lokalisation von AmSUT1 in Stengel-Längsschnitten von *Alonsoa meridionalis*. AmSUT1 befindet sich sowohl in Siebelementen (A) als auch in Geleitzellen (C). Ob es sich hierbei um Intermediärzellen oder gewöhnliche Geleitzellen handelt, konnte auch hier nicht eindeutig entschieden werden. AmSUT1 ist damit der erste Saccharose-Transporter, der in beiden Zelltypen, Siebelement und Geleitzelle, gleichzeitig lokalisiert werden konnte. Alle bisher immunolokalisierten Saccharose-Transporter wurden entweder nur in Geleitzellen

des Phloems von Blatt und Stengel (STADLER et al. 1995, STADLER und SAUER 1996) oder Siebelementen von Blattadern (KÜHN et al. 1997, BARKER et al. 2000, WEISE et al. 2000) detektiert.

Die aufgeführten Versuche zeigen erstmals, daß Oligosaccharid-transportierende Pflanzenarten mit offener Phloemanatomie ebenfalls Saccharose- H^+ -Symporter im Phloem exprimieren. Die Lokalisation von AmSUT1 im Phloem von Blattadern jeglicher Ordnung und im Stengel zeigt, daß dieser Transporter sowohl für die Beladung des Phloems mit Saccharose, als auch für die Wiederaufnahme von Saccharose während des Transports („retrieval“, GRIMM et al. 1990, 1997) verantwortlich ist.

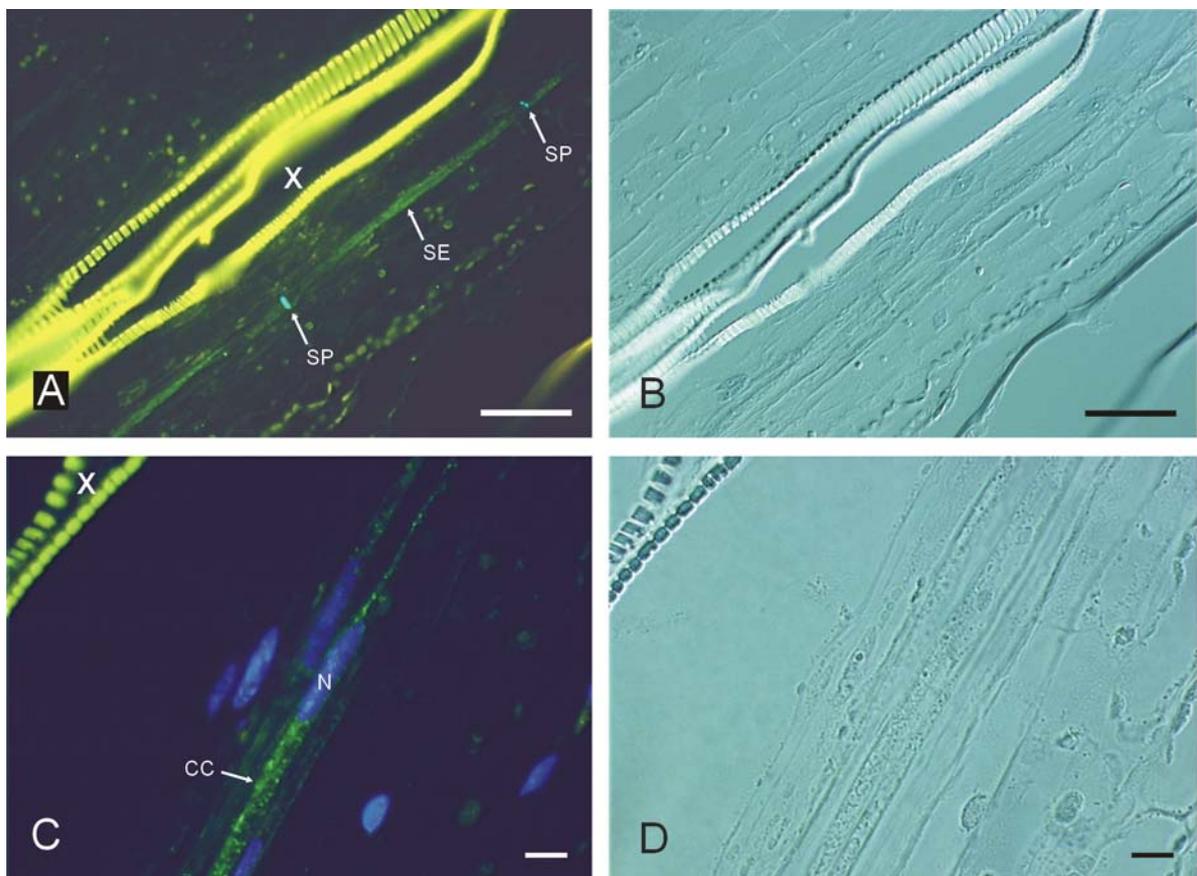


Abb. 32: Immunocytochemische Lokalisation von AmSUT1 in Siebelementen (A) und Geleitzellen (C) des Phloems in Stengel-Längsschnitten von *Alonsoa meridionalis*. Zur Identifizierung des Zelltyps wurden die Gewebeschnitte zusätzlich zur Antikörperbehandlung entweder mit Anilinblau oder DAPI blau angefärbt. Anilinblau färbt die Callose in den Siebplatten der Siebelemente (A), während DAPI Zellkerne, d.h. Geleitzellen markiert (C). Die grünliche FITC-Markierung ist in Zellen, die als Siebelemente (A) oder Geleitzellen (C) identifiziert wurden, zu erkennen. B, D: Lichtmikroskopische Aufnahmen von A und C. X = Xylem; SE = Siebelement; SP = Siebplatte; CC = Geleitzelle; N = Nucleus; Balken: A, B = 50 μ m; C, D = 10 μ m.

4. Diskussion

4.1 *Alonsoa meridionalis* transportiert im Phloem vor allem Raffinose und Stachyose, während *Asarina barclaiana* Saccharose transportiert

Im Phloem werden neben Aminosäuren und Ionen in erster Linie Zucker transportiert. Bei vielen Kulturpflanzen ist Saccharose der einzig transportierte Zucker mit Konzentrationen zwischen 0.8 und 1.5 M (OHSHIMA et al. 1990, RIENS et al. 1991, WINTER et al. 1992, LOHAUS et al. 1994, 1995, 1998, WINZER et al. 1996, LOHAUS und MOELLERS 2000). Für Pflanzen mit offener Phloemanatomie, die vermutlich neben Saccharose auch Raffinose-Oligosaccharide und Zuckeralkohole transportieren, wurden bisher nur sehr selten Zuckerkonzentrationen im Phloemsaft bestimmt. MOING et al. (1997) untersuchten, welche Zucker in Pfirsich transportiert werden. Mit Hilfe der Aphidenteknik bestimmten sie als Hauptbestandteile des Phloemsafts Sorbitol (560 mM) und Saccharose (140 mM). Berechnungen bei *Cucumis melo* L. ergaben Phloem-Konzentrationen von 330, 70 und 130 mM für Stachyose, Raffinose und Saccharose (HARITATOS et al. 1996). Neben diesen beiden Untersuchungen existieren bisher entweder nur qualitative Analysen von Phloemexudaten, die durch Abschneiden von Blättern oder Stengeln gewonnen wurden (ZIMMERMANN und ZIEGLER 1975) oder Messungen der Gesamt-Osmolarität im Phloem durch Plasmolyse-Experimente (TURGEON und HEPLER 1989). Mit beiden Methoden können allerdings keine Aussagen zur Konzentration einzelner Zucker gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Gesamt-Konzentrationen von Zuckern im Phloemsaft in *Alonsoa* mit ca. 0.8 M und in *Asarina* mit ca. 1.2 M in der gleichen Größenordnung wie in den schon gut charakterisierten apoplastischen Phloembeladern liegen (ca. 1 M; OHSHIMA et al. 1990, RIENS et al. 1991, LOHAUS et al. 1994, 1995, 1998, WINZER et al. 1996, LOHAUS und MOELLERS 2000). Während *Asarina* hauptsächlich Saccharose (1.1 M) und nur wenig Raffinose und Stachyose durch das Phloem transportiert (Tab. 5), sind in *Alonsoa* die Haupttransportzucker Stachyose (380 mM) und Raffinose (250 mM). Saccharose ist mit 150 mM nur der dritthäufigste Zucker (Tab. 2). Zwischen Tag und Nacht waren keine großen Unterschiede in den Phloemsaft-Konzentrationen erkennbar. Während die Zusammensetzung der verschiedenen Zucker sowohl in *Alonsoa* als auch *Asarina* in Blattextrakten und Apoplast sehr ähnlich war, war die Zuckerkomposition des Phloemsafts in beiden Pflanzen vollkommen verschieden (Abb. 33). Im Blatt und Apoplast sind die vorherrschenden Zucker Glucose, Fructose, Saccharose und im Fall von *Asarina* auch Mannitol. Im Phloemsaft von *Alonsoa* findet man dagegen Stachyose, Raffinose und Saccharose und in *Asarina* hauptsächlich Saccharose.

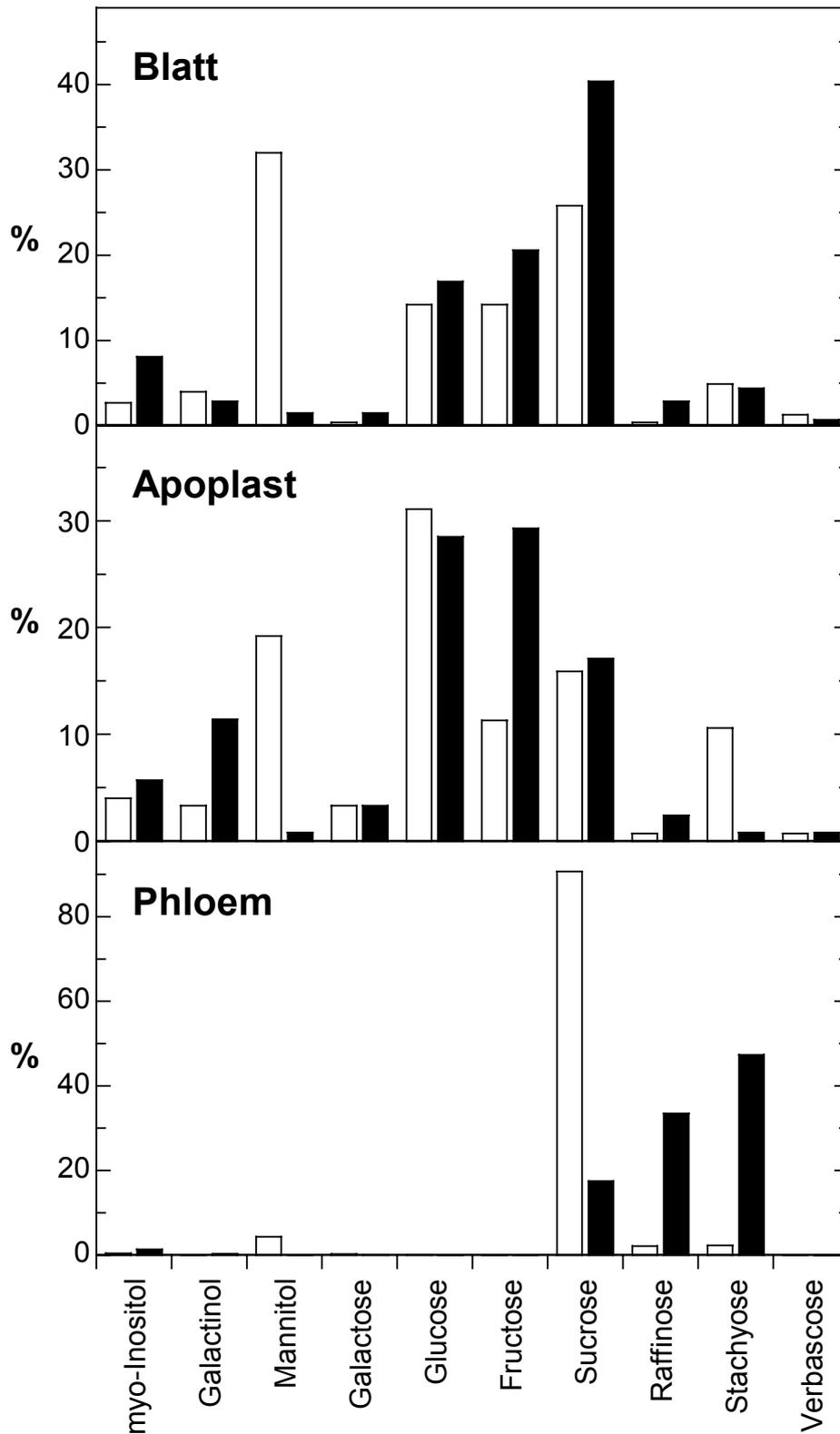


Abb. 33: Prozentualer Anteil von Zuckern und Zuckeralkoholen am Gesamtzuckeranteil während der Lichtperiode in Blatt, Apoplast und Phloemsaft von *Alonsoa meridionalis* (schwarze Balken) und *Asarina barclaiana* (weiße Balken). Die Daten sind den Tabellen 1, 2, 4 und 5 entnommen.

Dies bedeutet, daß zwischen dem Mesophyll und SE-CC-Komplex in beiden Pflanzenarten kein einfacher Diffusionsausgleich erfolgen kann. Aufgrund der unterschiedlichen Transportzucker scheint die Spezifität des Phloembeladungsmechanismus in beiden Pflanzen jedoch unterschiedlich zu sein. Zudem sprechen die Ergebnisse dafür, daß die Raffinose-Oligosaccharide in beiden Pflanzenarten in den Geleitzellen synthetisiert werden, da ihre Konzentrationen im Gesamt-Blatt sehr gering sind und die Enzyme der Oligosaccharid-Synthese in den Geleitzellen verschiedener Pflanzenarten nachgewiesen wurden (HOLTHAUS und SCHMITZ 1991, BEEBE und TURGEON 1992, MITCHELL et al. 1992, BACHMANN und KELLER 1995, HARITATOS et al. 2000a, SPRENGER und KELLER 2000). Mannitol hingegen könnte in *Asarina* zusätzlich auch als Kohlenstoffspeicher dienen, da die Mannitol-Konzentration im Blatt $7.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ FW beträgt.

Durch die Methode der nicht-wässrigen Fraktionierung konnten die Saccharose-Konzentrationen im Cytosol der Mesophyllzellen von *Alonsoa* und *Asarina* ermittelt werden (O. VOITSEKHOVSKAJA, pers. Mitteilung, KNOP et al. 2001). Die Konzentration in *Alonsoa* lag bei ca. 60 mM und in *Asarina* bei etwa 33 mM. Dies bedeutet, daß in *Asarina* die Saccharose-Konzentration im Phloemsaft 36fach höher als im Cytosol der Mesophyllzellen ist. Dieser Wert entspricht in etwa den in Spinat, Gerste, Mais und Zuckerrübe gemessenen (LOHAUS et al. 1995, 1998, WINZER et al. 1996) und ist typisch für apoplastische Phloembelader.

In *Alonsoa* ist dagegen die Saccharose-Konzentration im Phloemsaft nur etwa zweimal so hoch wie im Cytosol der Mesophyllzellen und damit deutlich niedriger als in *Asarina*. MOING et al. (1997) berechneten für Pfirsich ein Konzentrationsverhältnis von 1.7, und HARITATOS et al. (1996) kalkulierten für *Cucumis melo* ein Verhältnis von 0.7. Die Konzentrationsverhältnisse in *Cucumis melo* entsprechen in etwa denen, wenn Saccharose aus den Mesophyllzellen in die Geleitzellen diffundiert und dort zu Raffinose-Oligosacchariden umgewandelt wird. Da aber die Konzentration von Saccharose vom Cytosol der Mesophyllzellen zum Phloemsaft in *Alonsoa* zunimmt, wenn auch nur um einen Faktor von zwei, erscheint es als unwahrscheinlich, daß Saccharose einfach nur passiv in den SE-CC-Komplex diffundiert. Auch hier könnte ein aktiver Transportprozeß beteiligt sein. Daß der Konzentrationsgradient nicht so groß ist wie in *Asarina*, könnte daran liegen, daß ein Großteil der Saccharose zu Raffinose und Stachyose umgesetzt wird.

4.2 Es gibt keine spezielle Transportform für Amino-Stickstoff in *Alonsoa* und *Asarina*

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Aminosäure-Konzentrationen im Phloemsaft von Pflanzen mit offener Phloemanatomie beschrieben. Es zeigte sich, daß die Konzentrationen und prozentualen Anteile denen in apoplastischen Phloembeladern sehr ähnlich sind. In Spinat, Gerste, Zuckerrübe, Mais und Raps sind Glutamin und Glutamat die häufigsten Aminosäuren, gefolgt von Asparagin,

Aspartat, Alanin und Serin (RIENS et al. 1991, WINTER et al. 1992, LOHAUS et al. 1995, 1998, WINZER et al. 1996, LOHAUS und MOELLERS 2000).

Glutamin und Glutamat waren auch in *Alonsoa* und *Asarina* die vorherrschenden Aminosäuren im Phloemsaft, gefolgt von Serin und Aspartat, während die anderen Aminosäuren nur geringe Anteile an der Gesamtkonzentration hatten. Dieses Aminosäure-Muster wird sowohl in *Alonsoa* als auch *Asarina* im Apoplast und Gesamt-Blatt reflektiert. In besonderem Maße zeigte sich dies beim Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung von Gesamt-Blatt und Phloemsaft von *Alonsoa meridionalis* (Abb. 34).

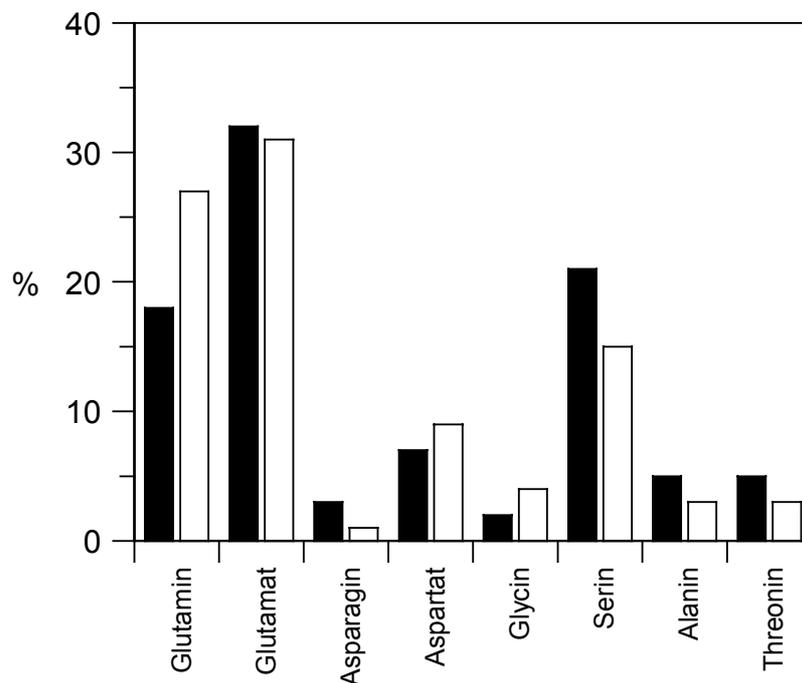


Abb. 34: Prozentualer Anteil einzelner Aminosäuren während der Lichtperiode in Blatt (schwarze Balken) und Phloemsaft (weiße Balken) von *Alonsoa meridionalis*. Die Daten sind den Tabellen 3 und 6 entnommen.

Über den Beladungsmechanismus des Phloems mit Aminosäuren bei Pflanzen mit offener Phloemanatomie ist bisher nichts bekannt. Die Ähnlichkeit der Aminosäure-Zusammensetzung von Gesamt-Blatt und Phloemsaft läßt sich zum einen durch eine Diffusion vom Mesophyll zum SE-CC-Komplex durch Plasmodesmata erklären. Andererseits unterscheidet sich die Aminosäure-Zusammensetzung von Gesamt-Blatt bzw. Cytosol von Mesophyllzellen und Phloemsaft auch nicht in vermutlich apoplastischen Phloembeladern, die keine symplastischen Verbindungen zwischen Mesophyll und SE-CC-Komplex haben (RIENS et al. 1991, WINTER et al. 1992, LOHAUS et al. 1995, 1998, WINZER et al. 1996, LOHAUS und MOELLERS 2000).

In apoplastischen Phloembeladern sollen die Aminosäuren u.a. durch Aminosäure-Transporter mit breiter Substratspezifität (AAPs) aus dem Apoplast in das Phloem aufgenommen werden (FISCHER et al. 1998). Aufgrund dieser breiten Substratspezifität kommt es nicht zur Anreicherung einer bestimmten Aminosäure im Phloem. Dies korreliert mit dem Ergebnis, daß es keine bevorzugte Transport-Aminosäure gibt, so wie dies Saccharose für die Zucker darstellt.

Die Gesamtaminosäure-Konzentration lag in *Alonsoa* bei 111 mM und in *Asarina* bei 253 mM. Diese Werte sind in der gleichen Größenordnung wie in Spinat, Gerste, Zuckerrübe und Mais (RIENS et al. 1991, WINTER et al. 1992, LOHAUS et al. 1995, 1998, WINZER et al. 1996). Lediglich in verschiedenen *Brassica*-Arten und *Pisum* wurden höhere Konzentrationen bis zu 400 mM nachgewiesen (LOHAUS und MOELLERS 2000). Wie hoch der Konzentrationsunterschied von Aminosäuren zwischen dem Cytosol der Mesophyllzellen und dem Phloensaft von *Alonsoa* und *Asarina* ist, wurde bisher nicht bestimmt. In apoplastischen Phloembeladern ist die Aminosäure-Konzentration im Phloensaft meist ein- bis dreimal so hoch wie im Cytosol der Source-Zellen (LOHAUS und FISCHER 2001).

4.3 Pflanzen mit offener Phloemanatomie besitzen Saccharose-Transporter

Für Pflanzenarten, die das Phloem mit Saccharose aus dem Apoplasten beladen, ist die Existenz von Saccharose-Transportern zwingend notwendig. Nachdem in den siebziger Jahren verschiedene Arbeitsgruppen eine aktive Beladung des Phloems durch Transportproteine postuliert hatten (SOVONICK et al. 1974, GIAQUINTA et al. 1976, 1977, FONDY und GEIGER 1977, KOMOR et al. 1977), wurde in den darauffolgenden Jahren mit verschiedenen Strategien versucht, die entsprechenden Proteine bzw. Gene zu isolieren. Immunopräzipitation, Markierung der vermutlichen Transporter durch radioaktives NEM, einem irreversiblen Inhibitor von Transportern, oder Photolabelling mit Saccharose-Analoga konnten jedoch nicht die genaue Natur der postulierten Saccharose-Transporter aufklären (GALLET et al. 1989, LI et al. 1992, RIPP et al. 1988, LEMOINE 2000). Erst die Nutzung der Hefe-Komplementation ermöglichte es RIESMEIER et al. (1992, 1993), die ersten cDNAs von Saccharose-Transportern aus Spinat (*SoSUT*) und Kartoffel (*StSUT1*) zu identifizieren.

Seitdem wurden aus einer Vielzahl unterschiedlicher Pflanzenarten Saccharose-Transporter isoliert, jedoch nur aus Arten mit apoplastischer Phloembeladung, die hauptsächlich Saccharose im Phloem transportieren (LALONDE et al. 1999, LEMOINE 2000, WILLIAMS et al. 2000). Für die meisten dieser Transporter konnte gezeigt werden, daß sie im Phloem exprimiert werden. So wurden Saccharose-Transporter entweder in Geleitzellen lokalisiert (*AtSUC2* und *PmSUC2*, STADLER et al. 1995, STADLER und SAUER 1996), oder in den Siebelementen (*AtSUT2*, *AtSUT4*, *LeSUT1*,

NtSUT1, PmSUC1 und StSUT1, KÜHN et al. 1997, BARKER et al. 2000, WEISE et al. 2000, STADLER et al., unveröffentlicht).

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Saccharose-Transporter aus vermutlich symplastischen Phloembeladern durch einen RT-PCR-Ansatz mit degenerierten Primern und anschließendes RACE isoliert. Bei den Transportern handelt es sich um *AmSUT1* aus der hauptsächlich Raffinose-Oligosaccharide transportierenden Pflanzenart *Alonsoa meridionalis* und *AbSUT1* und *AbSUT2* aus der vor allem Saccharose transportierenden Pflanzenart *Asarina barclaiana*. Im Anschluß an die Isolierung erfolgte die Charakterisierung und Lokalisation dieser Transporter.

4.3.1 Die Saccharose-Transporter *AmSUT1*, *AbSUT1* und *AbSUT2* sind den Saccharose-Transportern aus apoplastischen Phloembeladern sehr ähnlich

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Saccharose-Transporter zeigen ein hohes Maß an Homologie auf Aminosäureebene von 65-80% zu den bisher bekannten Saccharose-Transportern aus apoplastischen Phloembeladern (Tab. 7). Die phylogenetische Analyse der Sequenzen zeigte die nahe Verwandtschaft aller Saccharose-Transporter. Außerdem ist diese Genfamilie vermutlich erst sehr spät entstanden, da außerhalb des Pflanzenreichs keine Sequenzen bekannt sind, die eine Ähnlichkeit mit diesen Transportern besitzen (Abb. 35, WILLIAMS et al. 2000).

Hydrophathie-Analysen und Strukturberechnungen von *AmSUT1*, *AbSUT1* und *AbSUT2* ergaben, daß sie zwölf α -helicale Domänen besitzen, die vermutlich membranständig sind. Dies entspricht den Voraussagen, die bisher für alle bekannten Saccharose-Transporter gemacht wurden (LALONDE et al. 1999, LEMOINE 2000, WILLIAMS et al. 2000). STOLZ et al. (1999) untersuchten die Topologie von *PmSUC2* und fanden heraus, daß sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus dieses Saccharose-Transporters auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran liegen.

Auch die biochemische Charakterisierung von *AmSUT1*, *AbSUT1* und *AbSUT2* durch Hefe-Komplementation zeigte, daß diese neuen Saccharose-Transporter im wesentlichen die gleichen Eigenschaften wie die schon bekannten Saccharose-Transporter haben. So liegen ihre K_m -Werte für Saccharose mit 1.8, 0.4 und 2.0 mM im für Saccharose-Transporter typischen Bereich von 0.5-2 mM (LEMOINE 2000). Lediglich der Saccharose-Transporter *AtSUT4* hat einen weitaus höheren K_m -Wert von ca. 12 mM (WEISE et al. 2000). Durch die Untersuchung der pH-Abhängigkeit und die Hemmung durch das Protonophor CCCP wurde bestätigt, daß *AmSUT1*, *AbSUT1* und *AbSUT2* als H^+ -Symporter funktionieren (siehe 3.2). Allein Maltose wirkte als kompetitiver Inhibitor des Saccharose-Transports. Dieser Zucker konnte, im zehnfachen Überschuß zugegeben, die Saccharose-Aufnahme aller drei Transporter um mehr als 40% hemmen. Weder *AmSUT1*, noch *AbSUT1* und *AbSUT2* besitzen eine Affinität gegenüber Raffinose oder Stachyose. All dies sind Eigenschaften, die mit den bisher charakterisierten Transportern übereinstimmen (RIESMEIER et al. 1992, 1993,

GAHRTZ et al. 1994, SAUER und STOLZ 1994, WEIG und KOMOR 1996, LUDWIG et al. 2000, MEYER et al. 2000, NOIRAUD et al. 2000). Lediglich in ihrer Hemmbarkeit durch PCMBS unterschieden sich AmSUT1, AbsSUT1, AbsSUT2 von allen anderen bekannten Saccharose-Transportern (siehe 4.3.2).

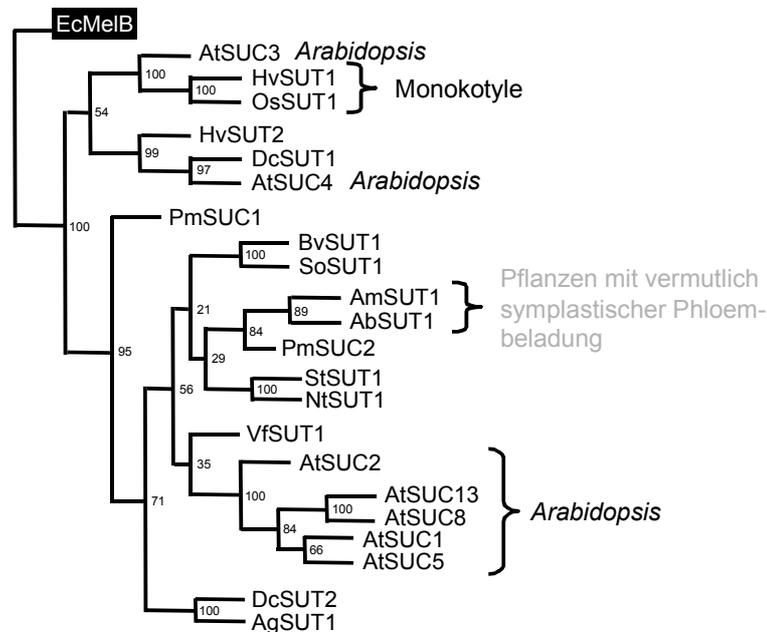


Abb. 35: Phylogenetischer Stammbaum von verschiedenen Saccharose-Transportern (aus WILLIAMS et al. 2000). Alle derzeit bekannten pflanzlichen Saccharose-Transporter sind sehr eng miteinander verwandt. AbsSUT1 und AmSUT1 gruppieren sich innerhalb der schon bekannten Transporter aus apoplastischen Phloembeladern. In *Arabidopsis* existieren Saccharose-Transporter, die sowohl Transportern aus Monokotylen wie Transportern aus vermutlich symplastischen Phloembeladern ähnlich sind. Unter den bisher beschriebenen Proteinen aus Bakterien, Pilzen und Säugetieren existieren keine nahen Verwandten zu dieser Transporter-Familie, was für deren späte Entstehung während der Evolution spricht.

4.3.2 AmSUT1, AbsSUT1 und AbsSUT2 unterscheiden sich gegenüber den bisher bekannten Saccharose-Transportern in der PCMBS-Sensitivität

Obwohl die Saccharose-Transporter AmSUT1, AbsSUT1 und AbsSUT2 den bisher bekannten Saccharose-Transportern aus apoplastischen Phloembeladern sehr stark ähneln, so unterscheiden sie sich doch in einem entscheidenden Kriterium: Sie sind in weit geringerem Ausmaß PCMBS-sensitiv. Während die Zugabe von PCMBS normalerweise die Aufnahmerate von Saccharose auf weit weniger als die Hälfte des Normalwerts reduziert, so werden die drei in dieser Arbeit neu charakterisierten Saccharose-Transporter AmSUT1, AbsSUT1 und AbsSUT2 nur zu 20 bis 40% gehemmt (Tab. 12). Der Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von AmSUT1, AbsSUT1 und AbsSUT2 mit denen von anderen

schon bekannten Saccharose-Transportern zeigte, daß keine Unterschiede in der Häufigkeit und Position der Cysteinreste, die vermutlich die Angriffspunkte für den Sulfhydrylgruppenblocker PCMBs darstellen, vorhanden waren (Daten nicht gezeigt).

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten sind sehr gut mit den für die anderen Saccharose-Transporter erhaltenen Ergebnissen vergleichbar, da sämtliche Experimente in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. Sauer (Universität Erlangen) durchgeführt wurden. Diese Arbeitsgruppe hat die meisten der in Tabelle 12 genannten Transporter charakterisiert. Durch die Verwendung der gleichen Chemikalien und Laborausrüstungen erscheint es ausgeschlossen, daß die Sensitivitätsunterschiede auf Unterschieden in der Versuchsdurchführung beruhen.

Tab. 12: Vergleich der PCMBs-Sensitivität verschiedener Saccharose-Transporter bei heterologer Expression in Hefe. Daten aus ^aNOIRAUD et al. 2000, ^bSAUER und STOLZ 1994, ^cMEYER et al. 2000, ^dLUDWIG et al. 2000, ^eGAHRTZ et al. 1994, ^fWEIG und KOMOR 1996, ^gRIESMEIER et al. 1992, ^hRIESMEIER et al. 1993.

Saccharose-Transporter	Restaktivität nach PCMBs-Zugabe (%)
AbSUT1	64
AbSUT2	74
AmSUT1	81
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>	
AgSUT1 ^a	29
AtSUC1 ^b	44
AtSUC2 ^b	49
AtSUC3 ^c	31
AtSUC5 ^d	≤ 30
PmSUC2 ^e	27
RcScr1 ^f	≤ 10
SoSUT ^g	21
StSUT1 ^h	20

Die Sensitivität der Phloembeladung gegenüber dem Hemmstoff PCMBs ist neben der Phloemanatomie ein wichtiges Kriterium für die Unterscheidung von apoplastischen und symplastischen Phloembeladern (VAN BEL 1993, TURGEON 1996). In makroautoradiographischen Untersuchungen, bei denen radioaktiv markiertes CO₂ oder Saccharose zu Blättern oder Blattscheiben gegeben werden, sammelt sich normalerweise nach kurzer Zeit die Radioaktivität im Phloem. Bei Zugabe von PCMBs zu den Blättern oder Blattscheiben reicherte sich in apoplastischen Phloembeladern keine Radioaktivität mehr im Phloem an, während bei vermutlich symplastischen Phloembeladern auch in Anwesenheit von PCMBs eine Anreicherung nachweisbar war (TURGEON

und GOWAN 1990, VAN BEL et al. 1992, 1994, FLORA und MADORE 1993, 1996). Dies wurde darauf zurückgeführt, daß in apoplastischen Phloembeladern die für die Phloembeladung verantwortlichen Saccharose-Transporter gehemmt sind. Da bei der symplastischen Phloembeladung keine Saccharose-Transporter beteiligt sein sollen, wurde hier die Phloembeladung nicht beeinflusst. Diese Untersuchungen haben allerdings den Nachteil, daß die PCMBS-Konzentration am Ort der Phloembeladung nicht genau einzustellen und zu messen ist. Zudem hat die Makroautoradiographie den Nachteil, daß die Natur der transportierten Substanz nicht genau bestimmt werden kann. Daher besteht die Möglichkeit, daß Pflanzen mit einer scheinbar PCMBS-insensitiven Phloembeladung trotzdem auch mit einem PCMBS-sensitiven Mechanismus Zucker aufnehmen, der bei PCMBS-Zugabe durch das Ansteigen des Phloemtransports eines anderen ebenfalls radioaktiv markierten Transportmetabolits kompensiert, bzw. der PCMBS-insensitive Weg gestärkt wird.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten noch auf eine andere Möglichkeit hin: Die Empfindlichkeit der Saccharose-Transporter AmSUT1, AbsUT1 und AbsUT2 gegenüber PCMBS ist so gering, daß zumindest in *Alonsoa* und *Asarina* bei einer Inkubation von Blattscheiben in einer PCMBS-haltigen Lösung radioaktiv markierte Saccharose trotzdem in das Phloem aufgenommen würde. Diese Eigenschaft könnte auch für andere symplastische Phloembelader vermutet werden.

Die Insensitivität der drei Saccharose-Transporter AmSUT1, AbsUT1 und AbsUT2 zeigt eindeutig, daß die Untersuchung der Hemmbarkeit des Phloemtransports durch PCMBS kein sicheres Kriterium zur Unterscheidung von Phloembeladungsmechanismen ist. Ob die geringere PCMBS-Sensitivität ein generelles Kennzeichen von Saccharose-Transportern aus vermutlich symplastischen Phloembeladern ist, ließe sich erst bei eingehender Untersuchung weiterer Saccharose-Transporter, z.B. aus *Cucurbita maxima* oder *Coleus blumei*, feststellen.

4.4 Der *AmSUT1*-Promotor ist in *Arabidopsis thaliana* nicht aktiv

Um die Expression des Saccharose-Transporters *AmSUT1* genauer lokalisieren zu können, wurde sein Promotor isoliert und *AmSUT1*-Promotor-*GUS*- bzw. -*GFP*-Konstrukte hergestellt (3.4.2). Nach Transformation dieser Konstrukte in *Arabidopsis thaliana* zeigte sich jedoch, daß der Promotor nicht aktiv war. Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils alle Teile der Pflanze untersucht, doch es konnte in keinem Fall eine eindeutige Expression eines Reportergens nachgewiesen werden.

Für die Inaktivität des *AmSUT1*-Promotors könnte es verschiedene Gründe geben. Zum einen könnte der *AmSUT1*-Promotor in *Alonsoa* für einen Zelltyp oder ein Transkriptionssignal spezifisch sein, was in *Arabidopsis* nicht existiert. Zum anderen könnte das isolierte Promotorfragment mit ca. 1.5 kb zu kurz sein, um alle essentiellen Bereiche für die Expression von *AmSUT1* bzw. *GUS* oder *GFP* zu beinhalten. Der Geleitzell-spezifische *AtSUC2*-Promotor aus *Arabidopsis* hingegen zeigt auch nach einer Promotordeletion auf ca. 600 bp noch das gleiche Expressionsmuster wie ein 2.3 kb Fragment

dieses Promotors (A. IMLAU, pers. Mitteilung). Ein Fehler in der Sequenz der Reportergene, der zur Inaktivierung hätte führen können, erscheint unwahrscheinlich, da einerseits zwei Reportergene verwendet wurden und andererseits beide Konstrukte vor der Transformation zur Kontrolle auf ihre Sequenz hin überprüft worden sind.

4.5 *AmSUT1*- und *AbSUT1*-mRNA sind in verschiedenen Pflanzenteilen, einschließlich des Phloems, nachweisbar

Die Untersuchung der Organ-spezifischen Expression mittels Semi-Quantitativer RT-PCR zeigte, daß *AbSUT1* am stärksten in Blüten und weitaus schwächer in Stengel, jungen und ausgewachsenen Blättern von *Asarina* exprimiert ist (Abb. 17). *AmSUT1* ist dagegen vor allem in Stengel und Blüte von *Alonsoa* zu finden. Die Expression in ausgewachsenen Blättern und Wurzeln ist weniger stark (Abb. 17). Von der Organspezifität und der Expressionsstärke der Saccharose-Transporter läßt sich jedoch nur in begrenztem Umfang auf die genaue Lokalisation und physiologische Funktion schließen. STADLER et al. (1995) zeigten, daß die mRNA des Saccharose-Transporters *PmSUC2* in Source-Blättern, Wurzeln, Stengeln und Blüten gleich stark exprimiert wird. Das *PmSUC2*-Protein wird aber nur in einem spezifischen Zelltyp, den Geleitzellen detektiert. Darüberhinaus zeigen sich Parallelen zwischen den Expressionsmustern von *AmSUT1* und *AtSUC2*. Die mRNA des Saccharose-Transporters *AtSUC2* ist in Blüten am stärksten exprimiert, gefolgt von Stengel, Blättern, Schoten und Wurzeln (STADLER et al. 1999). Das korrespondierende *AtSUC2*-Protein ist jedoch wiederum nur in den Geleitzellen des Phloems nachweisbar (STADLER und SAUER 1996).

Die mRNA von *AmSUT1* und *AbSUT1* konnte auch im Phloemsaft detektiert werden, der mit der Laser-Aphiden-Technik gewonnen wurde (3.3.4). Die neue Technik der Phloemsaft-RT-PCR wurde bisher nur von einer anderen Arbeitsgruppe erfolgreich angewendet. SASAKI et al. (1998) zeigten, daß in Phloemsaft aus Reis die mRNAs von Thioredoxin H, Oryzacystatin-I und Actin vorhanden sind. Sie konnten zudem nachweisen, daß durch Aphiden gewonnener Phloemsaft keine nachweisbare RNase-Aktivität aufweist. Dies trifft vermutlich auch auf den in dieser Arbeit isolierten Phloemsaft zu. Der für diese Untersuchungen verwendete Phloemsaft ist nicht mit Inhalt von Mesophyllzellen kontaminiert. Mesophyll-spezifische Transkripte konnten im Phloemsaft nicht detektiert werden (Abb. 20). Auch die Konzentrationen von Nitrat und Fructose von 0.2 mM bzw. 0.1 mM unterstützen diesen Befund. Beide Metabolite liegen im Blatt in hoher Konzentration vor.

Aphiden inserieren ihre Stechrüssel immer in die Siebelemente (EVERT et al. 1972, BOTHA et al. 1975, 1977, BOTHA und EVERT 1978). Es kann jedoch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, daß im Phloemsaft, der mit der Laser-Aphiden-Technik gewonnen wurde, auch Anteile von Geleitzellinhalt zu finden sind.

Bisher wird vermutet, daß die mRNA in den Geleitzellen synthetisiert wird und von dort entweder unspezifisch oder spezifisch mit Hilfe von sog. „Movement Proteinen“ (XOCONOSTLE-CÁZARES et al. 1999) durch die Plasmodesmata in die Siebelemente gelangt. KÜHN et al. (1997) konnten durch *in situ*-Hybridisierung nachweisen, daß *StSUT1* mRNA auf der Siebelementseite von Plasmodesmata, die Geleitzellen und Siebelemente verbinden, vorhanden ist. Wurde eine mRNA im Phloemsaft nachgewiesen, so war auch das jeweils korrespondierende Protein vorhanden (z.B. Thioredoxin H, Oryzacystatin-I, Actin und *StSUT1*; ISHIWATARI et al. 1995, KÜHN et al. 1997, SCHOBERT et al. 1998, HAYASHI et al., unveröffentlicht).

Ob die mRNAs im Phloemsaft eine Funktion erfüllen, ist derzeit noch unklar. Da Siebelemente mit großer Wahrscheinlichkeit keine Ribosomen besitzen (SJÖLUND 1997), kann die mRNA hier nicht translatiert werden. Stattdessen wird für die mRNAs im Phloem eine Rolle als Signalmoleküle postuliert (JORGENSEN et al. 1999). Kürzlich konnte diese Vermutung für eine spezifische mRNA bestätigt werden (KIM et al. 2001). Es wurden hierbei auf Tomatenpflanzen, die eine dominante Mutation (*Mouse ears*, CHEN et al. 1997) trugen, Wildtyp-Tomatenpflanzen aufgepropft. Die Autoren konnten zeigen, daß die mutierte mRNA nicht nur durch das Phloem in die aufgepropfte Wildtyp-Tomatenpflanze transportiert wurde, sondern dort auch den für die *Mouse ears*-Mutante typischen Phänotyp hervorrief. Auf der mRNA selbst, und nicht in ihrem Promotor, muß also ein Signal vorhanden sein, das für die spezifische Akkumulation in bestimmten Geweben auch außerhalb des Phloems verantwortlich ist.

Welche Funktion die *SUT*-mRNA im Phloemsaft von *Alonsoa* und *Asarina* spielt, kann noch nicht abschließend beantwortet werden. Das Vorhandensein der *AmSUT1*- bzw. *AbSUT1*-Transkripte im Phloemsaft läßt darauf schließen, daß auch die zugehörigen Saccharose-Transporter-Proteine im Phloem der Oligosaccharid-transportierenden Pflanze *Alonsoa meridionalis* und der Saccharose-transportierenden Pflanze *Asarina barclaiana* vorhanden sind und diese an der Phloembeladung und/oder dem „retrieval“ von Saccharose beteiligt sind. Über eine zusätzliche Signalfunktion der *SUT*-mRNAs läßt sich derzeit nur spekulieren.

4.6 Das AmSUT1-Protein ist im Phloem von *Alonsoa meridionalis* lokalisiert

Das Vorhandensein von *SUT*-mRNA im Phloemsaft ist noch kein eindeutiger Beweis für eine Beteiligung der Saccharose-Transporter *AmSUT1* bzw. *AbSUT1* an der Phloembeladung. Um diesen Nachweis für den Saccharose-Transporter *AmSUT1* zu erbringen, wurde er auf zellulärer und subzellulärer Ebene lokalisiert. Hierzu wurden polyklonale Peptid-Antikörper gegen sowohl den N-Terminus als auch den C-Terminus von *AmSUT1* hergestellt (2.15.1). Die Herstellung von Antikörpern und anschließende immunocytochemische Lokalisierung erfolgte für den Saccharose-Transporter aus *Alonsoa meridionalis*, da diese Pflanzenart mit ihrer offenen Phloemanatomie und

hauptsächlich Raffinose-Oligosacchariden als Transportzucker die typischen Merkmale eines vermutlich symplastischen Phloembeladers zeigt.

4.6.1 AmSUT1 ist für die Phloembeladung von Saccharose verantwortlich

Es wird vermutet, daß alle identifizierten Saccharose-Transporter in der Plasmamembran lokalisiert sind (WILLIAMS et al. 2000), obwohl dies bisher nur für einige Transporter nachgewiesen wurde. Durch ^{14}C -Saccharose-Aufnahmetests konnte gezeigt werden, daß die in dieser Arbeit charakterisierten Saccharose-Transporter AmSUT1, AbsUT1 und AbsUT2 bei heterologer Expression in Hefe in die Plasmamembran sortiert werden. Durch Western-Blot Analyse wurde zudem belegt, daß AmSUT1 auch in *Alonsoa* in der Plasmamembran zu finden ist (Abb. 27).

Um nun den genauen Zelltyp zu identifizieren, in dem sich AmSUT1 befindet, wurden unterschiedliche Gewebe in Methacrylat eingebettet, geschnitten, und anschließend AmSUT1 immunohistochemisch primär durch den anti-AmSUT1-N3-Antikörper bzw. sekundär durch einen FITC-markierten Antikörper nachgewiesen (2.15.3). Die Einbettung in Methacrylat führte im Gegensatz zur Cryo-Ultramikrotomie (WINZER 1999) zu einer sehr guten Erhaltung des Gewebes und der Antigenizität von AmSUT1.

Der Saccharose-Transporter AmSUT1 ist in „minor veins“ und Blattadern 3. Ordnung im Phloem, vermutlich in den Intermediärzellen, lokalisiert (Abb. 29). Die genaue Zuordnung des Zelltyps ist bei diesen kleinen Blattadern lichtmikroskopisch nicht möglich. Hierzu wäre eine elektronenmikroskopische Untersuchung mit Gold-konjugierten Antikörpern notwendig. In den Querschnitten von größeren Blattadern und speziell der Mittelrippe fällt die Bestimmung des Zelltyps jedoch leichter. So ist AmSUT1 in den Geleitzellen der Mittelrippe lokalisiert (Abb. 28). Diese Zellen zeichnen sich im Vergleich zu Siebelementen durch ein dichtes Cytoplasma aus. Es besteht lediglich die Frage, ob es sich beim markierten Geleitzelltyp um Intermediärzellen, gewöhnliche Geleitzellen oder beide Zelltypen handelt. Für die Beantwortung der Frage, ob in Pflanzen mit offener Phloemanatomie Saccharose-Transporter an der Phloembeladung beteiligt sind, ist dies aber von sekundärer Bedeutung. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß AmSUT1 das Phloem von *Alonsoa meridionalis* mit Saccharose belädt, da die „minor veins“ den Ort der Phloembeladung im Blatt darstellen.

Die Lokalisation von AmSUT1 in den Geleitzellen von Blattadern unterschiedlicher Größe deckt sich sehr gut mit den Ergebnissen, die für die Saccharose-Transporter AtSUC2 aus *Arabidopsis* und PmSUC2 aus *Plantago* (STADLER et al. 1995, STADLER und SAUER 1996) ermittelt wurden. Diese beiden Transporter waren ausschließlich in Geleitzellen nachweisbar.

4.6.2 Die Wiederaufnahme von Saccharose in das Phloem während des Ferntransports wird ebenfalls durch AmSUT1 bewirkt

Während die Beladung des Phloems in den Blattadern 4.-7. Ordnung erfolgen soll, findet in den Blattadern 2. und 3. Ordnung, der Mittelrippe und dem Stengel der eigentliche Phloemtransport statt (VAN BEL 1993). Der Saccharose-Transporter AmSUT1 ist auch in diesen Geweben im Phloem lokalisiert. Im Gegensatz zur Mittelrippe, wo er nur in den Geleitzellen zu finden ist (Abb. 28), befindet sich AmSUT1 im Phloem des Stengels sowohl in den Geleitzellen als auch in den Siebelementen (Abb. 31, 32). Hier erfüllt AmSUT1 vermutlich eine „retrieval“-Funktion für Saccharose, die während des Ferntransports aus dem Phloem austritt (GRIMM et al. 1990, 1997, ROTHE et al. 1999). Wie stark dieses Herauslecken tatsächlich ist, konnte bisher für keine Pflanzenart eindeutig bestimmt werden.

AmSUT1 ist der erste Saccharose-Transporter, der immunocytochemisch sowohl in Siebelementen als auch Geleitzellen lokalisiert werden konnte. Alle bisher im Phloem lokalisierten Saccharose-Transporter sind entweder Geleitzell-spezifisch (AtSUC2 und PmSUC2, STADLER et al. 1995, STADLER und SAUER 1996) oder Siebelement-spezifisch (LeSUT1, LeSUT2, LeSUT4, StSUT1 und StSUT4, KÜHN et al. 1997, BARKER et al. 2000, WEISE et al. 2000). Die Lokalisation des AmSUT1-Proteins in Siebelementen und Geleitzellen bestätigt zudem den Nachweis von *AmSUT1*-mRNA im Phloemsaft.

Einige Saccharose-Transporter konnten bisher auch in anderen Geweben als dem Phloem durch Immunolokalisation nachgewiesen werden. So befindet sich AtSUC3 (= AtSUT2) in einer Zellschicht zwischen Phloem und Mesophyll und in einer subepidermalen Zellschicht des Karpells (MEYER et al. 2000). Der Saccharose-Transporter AtSUC1 konnte von STADLER et al. (1999) im Funiculus und Konnektiv von Antheren und in wachsenden Pollen detektiert werden, während PmSUC1 und PsSUT1 sich vor allem im entwickelnden Samen befinden (TEGEDER et al. 1999, R. STADLER, pers. Mitteilung). Hier sind sie an der Pollen- bzw. Samenernährung beteiligt.

Kürzlich konnte eine weitere Funktion eines Saccharose-Transporters beschrieben werden, die eng mit der Regulation der Öffnungsweite von Plasmodesmata korreliert. RUAN et al. (2001) zeigten, daß das Streckungswachstum von Baumwollfasern durch den Eintransport von Saccharose und Kalium durch den Saccharose-Transporter GhSUT1 und den Kalium-Transporter GhKT1 bei gleichzeitigem Schließen der Plasmodesmata und Erweichung der Zellwand bewirkt wird. Zum Zeitpunkt der höchsten Saccharose-Transporter-Expression gingen die Plasmodesmata vom einfachen zum verzweigten Typ über, was eine drastische Verringerung der Durchlaßgröße zur Folge hatte. Der gleiche Übergang von einfachen zu verzweigten Plasmodesmata wurde auch beim Wechsel von Sink zu Source in Tabakblättern beobachtet (OPARKA et al. 1999). Während einfache Plasmodesmata

sogar den Transport von Proteinen, wie z.B. GFP zulassen, nimmt die Ausschlußgröße bei der Veränderung zu verzweigten Plasmodesmata rapide ab.

Da der erste Saccharose-Transporter erst Anfang der 90er Jahre isoliert wurde, steht die Funktionsanalyse für viele Mitglieder dieser Genfamilie noch aus. Daher werden in den nächsten Jahren vermutlich noch weitere Funktionen dieser Transporterfamilie aufgedeckt werden.

4.7 Gibt es eine symplastische Phloembeladung?

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, daß *Asarina barclaiana* mit sehr großer Sicherheit ein apoplastischer Phloembelader ist. Neben dem Nachweis von *AbSUT1*-mRNA im Phloem ist die äußerst hohe Saccharose-Konzentration im Phloem ein eindeutiges Indiz für diese Vermutung. Die Saccharose-Konzentration ist hier ca. 36fach höher als im Cytosol der Mesophyllzellen (O. VOITSEKHOVSKAJA, pers. Mitteilung, KNOP et al. 2001) und widerspricht damit klar dem von TURGEON (1991,1996) postulierten „polymer trap“ Modell, das gleiche Saccharose-Konzentrationen im Phloem und in den umgebenden Zellen vorschreibt.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse ergibt sich ebenso ein neues Bild der Phloembeladung in *Alonsoa meridionalis*. Diese Pflanzenart galt bisher als typisches Beispiel eines symplastischen Phloembeladers, da sie sowohl eine offene Phloemanatomie besitzt als auch vornehmlich Raffinose-Oligosaccharide im Phloem transportiert. Die im Phloem gegenüber dem Mesophyll erhöhte Saccharose-Konzentration, die sehr unterschiedliche Metabolit-Zusammensetzung von Mesophyll und Phloem, die Existenz des Saccharose-Transporters AmSUT1 mit geringer PCMB5-Sensitivität und seine Lokalisation im Phloem sowohl auf mRNA- wie auf Proteinebene führen zum in Abbildung 36 dargestellten Modell der Phloembeladung in *Alonsoa meridionalis*.

Die im Mesophyll synthetisierte Saccharose gelangt in den Apoplasten, wo sie durch den Saccharose- H^+ -Symporter AmSUT1 in die Geleitzellen aufgenommen wird. Hier sind die Enzyme der Raffinose-Oligosaccharidsynthese lokalisiert, und Saccharose wird zum großen Teil zu Raffinose und besonders Stachyose umgesetzt. Diese drei Transportzucker gelangen nun in die Siebelemente und werden anschließend zu den Sink-Organen transportiert. Die während dieses Ferntransports „auslaufende“ Saccharose wird ebenfalls durch den in Siebelementen und Geleitzellen lokalisierten AmSUT1 wiederaufgenommen. Der physiologische Status der Plasmodesmata zwischen dem SE-CC-Komplex und dem Mesophyll ist dagegen unklar. Möglicherweise sind sie geschlossen, oder es wird pro Zeiteinheit mehr Saccharose durch AmSUT1 aufgenommen, als durch die Plasmodesmata zurückdiffundieren kann. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß in einem sinnlosen Kreislauf alle Saccharose, die aktiv in die Geleitzellen aufgenommen wurde, wieder durch die Plasmodesmata in das Mesophyll zurückgelangt.

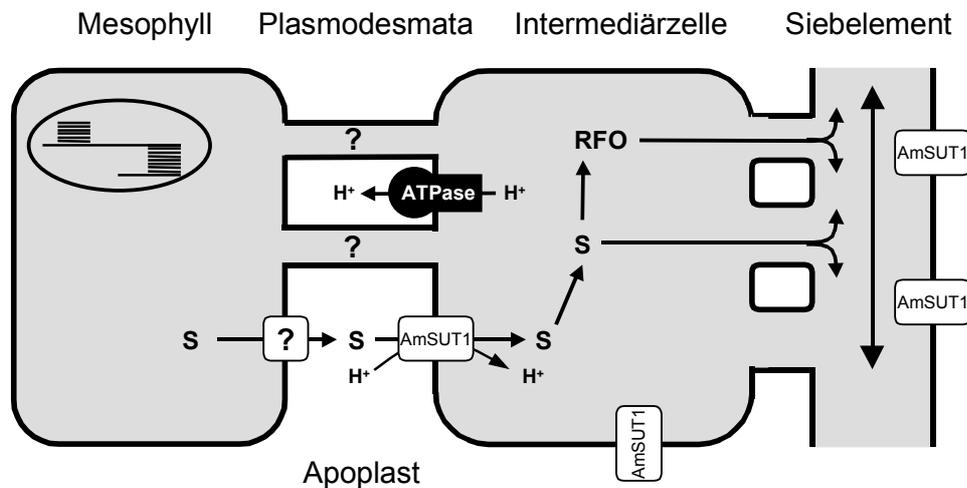


Abb. 36: Hypothetisches Schema der Phloembeladung in *Alonsoa meridionalis*. Die im Mesophyll synthetisierte Saccharose (S) gelangt auf noch ungeklärte Weise in den Apoplasten. Dort wird sie durch den Saccharose-Transporter AmSUT1 im Symport mit Protonen in die Intermediärzellen aufgenommen. Hier wird die Saccharose zum großen Teil zu Raffinose und Stachyose (RFO) umgesetzt. Die drei Transportzucker Saccharose, Raffinose und Stachyose werden dann im Phloem abtransportiert. Im Bereich des Transport-Phloems (große Blattadern und Stengel) befindet sich AmSUT1 sowohl in Siebelementen wie auch Geleitzellen und bewirkt eine Wiederaufnahme von „herausleckender“ Saccharose. Der Anteil der Plasmodesmata zwischen Mesophyll und SE-CC-Komplex an der Phloembeladung ist unklar. Um einen nutzlosen Kreislauf zu vermeiden, müßten sie entweder geschlossen sein oder zumindest eine so geringe Durchflußfläche bieten, daß die aktiv in die Intermediärzellen transportierte Saccharose nicht zurückdiffundieren kann.

Da Raffinose und Stachyose genau wie Saccharose während des Transports aus dem Phloem „herauslecken“, ist zu vermuten, daß es auch für diese Zucker Transporter zur Wiederaufnahme in das Phloem gibt. Für eine Beladung des Phloems in den „minor veins“ wären solche Transporter nicht erforderlich, da die Raffinose-Oligosaccharide erst im SE-CC-Komplex synthetisiert werden (HOLTHAUS und SCHMITZ 1991, BEEBE und TURGEON 1992, MITCHELL et al. 1992, BACHMANN und KELLER 1995, HARITATOS et al. 2000, SPRENGER und KELLER 2000). Bisher ist jedoch noch kein Transporter mit einer Affinität zu Raffinose-Oligosacchariden isoliert worden.

Es bleibt abschließend festzustellen, daß in *Alonsoa meridionalis* als Pflanzenart mit offener Phloemanatomie auf jeden Fall eine apoplastische Phloembeladung stattfindet. Ob es noch eine zusätzliche symplastische Komponente der Phloembeladung gibt, bleibt weiterhin unklar. Das tatsächliche Ausmaß der Bedeutung von AmSUT1 *in vivo* für den Phloemtransport und damit das Pflanzenwachstum wird sich erst endgültig klären lassen, wenn das *AmSUT1*-Gen z.B. durch

antisense-Inhibierung ausgeschaltet ist. Dazu wird es allerdings zunächst nötig sein, eine Methode zur stabilen Transformation von *Alonsoa meridionalis* zu entwickeln.

In dieser Arbeit wurde für zwei Vertreter der Gruppe der bisher als symplastische Phloembelader bezeichneten Pflanzenarten gezeigt, daß sie ihr Phloem apoplastisch, und nicht oder nur partiell symplastisch beladen. Dies stellt generell die Theorie der symplastischen Phloembeladung in Frage. Es werden jedoch weitere Untersuchungen an anderen Vertretern der Pflanzenarten mit offener Phloemanatomie, wie z.B. *Cucurbita maxima* oder *Coleus blumei*, notwendig sein, um die universelle Beteiligung von Saccharose-Transportern an der Phloembeladung nachzuweisen und die Bedeutung der Plasmodesmata bei diesem Prozeß zu klären.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Mechanismus der Phloembeladung in Pflanzen mit offener Phloemanatomie durchgeführt. Als Modellorganismen dienten hierbei die beiden Scrophulariaceen *Alonsoa meridionalis* und *Asarina barclaiana*. Nachdem diese beiden Pflanzenarten zunächst biochemisch charakterisiert worden waren, wurde danach mit molekularbiologischen Methoden untersucht, ob in diesen Pflanzen Saccharose-Transporter an der Phloembeladung beteiligt sind. Bei diesen Transportern handelt es sich um die essentiellen Komponenten der schon sehr gut charakterisierten und allgemein akzeptierten Theorie der Beladung des Phloems aus dem Apoplast. Es sollte also letztendlich geklärt werden, ob es tatsächlich eine symplastische Phloembeladung gibt oder nicht.

Anatomie des Phloems und biochemische Charakterisierung des Phloemtransports

1. *Alonsoa meridionalis* besitzt im Phloem vor allem Intermediärzellen und nur wenige gewöhnliche Geleitzellen. Es existieren zahlreiche symplastische Verbindungen zwischen dem Mesophyll und dem SE-CC-Komplex. Das Phloem von *Asarina barclaiana* enthält sowohl modifizierte Intermediärzellen (Intermediärzellen mit Zellwandeinstülpungen) als auch Transferzellen.
2. In *Alonsoa meridionalis* ist Stachyose der häufigste Zucker im Phloemsaft, gefolgt von Raffinose und Saccharose (380, 250 und 150 mM). Die Gesamtkonzentration der Zucker entspricht der, die man in apoplastischen Phloembeladern vorfindet. Saccharose ist der Hauptbestandteil des Phloemsafts von *Asarina barclaiana*. Die Konzentration ist mit 1.1 M ebenfalls so hoch wie in apoplastischen Phloembeladern. Raffinose und Stachyose sind nur in geringer Konzentration vorhanden.
3. Die Zuckerszusammensetzung im Phloemsaft beider Scrophulariaceen unterscheidet sich äußerst stark von der Zusammensetzung im Blatt. Es ist also augenscheinlich keine freie Diffusion zwischen Mesophyll und Phloem möglich, die den Aufbau von Konzentrationsgradienten für verschiedene Zucker verhindern würde.
4. Die Aminosäure-Konzentration und -Zusammensetzung im Phloemsaft beider Pflanzenarten unterscheidet sich nicht von den in apoplastischen Phloembeladern gemessenen Werten.

Charakterisierung von Saccharose-Transportern

1. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß Pflanzen mit offener Phloemanatomie Saccharose-Transporter besitzen. Aus *Alonsoa meridionalis* konnte ein Saccharose-Transporter (*AmSUT1*) und aus *Asarina barclaiana* zwei Saccharose-Transporter (*AbSUT1* und *AbSUT2*) isoliert werden.
2. *AmSUT1*, *AbSUT1* und *AbSUT2* wurden heterolog in Hefe exprimiert und ihre Aufnahmeleistungen bestimmt. Alle drei Transporter transportieren sehr effizient Saccharose, haben einen K_m -Wert von ca. 1 mM und funktionieren als H^+ -Symporter. Sie haben keine Affinität für Raffinose oder Stachyose. Bis auf einen Parameter unterscheiden sie sich nicht von den bisher charakterisierten Saccharose-Transportern aus apoplastischen Phloembeladern.
3. Einzig in ihrer Sensitivität gegenüber dem Saccharose-Transporter-Hemmstoff PCMBs unterscheiden sich *AmSUT1*, *AbSUT1* und *AbSUT2* signifikant von allen bisher bekannten Saccharose-Transportern. Während diese relativ stark durch PCMBs gehemmt werden, hat dieser Hemmstoff eine weitaus geringere Wirkung auf *AmSUT1*, *AbSUT1* und *AbSUT2*.
4. Es wurde ein 1.5 kb-Fragment des *AmSUT1*-Promotors isoliert, das einige potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthält, die durch Zucker reguliert werden können. Es wurden *AmSUT1*-Promotor-*GUS* und -*GFP*-Konstrukte hergestellt und heterolog in *Arabidopsis* exprimiert. Es stellte sich jedoch heraus, daß das 1.5 kb-Fragment des *AmSUT1*-Promotors in *Arabidopsis* nicht aktiv ist.
5. Die Methode der Semi-Quantitativen RT-PCR von Phloemsaft, der mittels der Laser-Aphiden-Technik gewonnen wurde, konnte durch diese Arbeit etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, daß sich die mRNA von *AmSUT1* und *AbSUT1* im Phloemsaft befindet.
6. Es wurden polyklonale Antikörper sowohl gegen die N-terminale als auch die C-terminale Region von *AmSUT1* hergestellt. Der Antikörper gegen den N-Terminus erwies sich dabei als spezifischer als der Antikörper gegen den C-Terminus. Durch Western-Blot Analyse wurde nachgewiesen, daß *AmSUT1* in der Plasmamembran lokalisiert ist.
7. Durch den anti-*AmSUT1*-N3-Antikörper konnte *AmSUT1* in Gewebeschnitten immunohistochemisch lokalisiert werden. *AmSUT1* befindet sich sowohl im Blatt als auch im Stängel ausschließlich im Phloem. In den „minor veins“ und „major veins“ ist *AmSUT1* in den

Geleitzellen lokalisiert, wohingegen AmSUT1 im Stengel sowohl in den Siebelementen als auch Geleitzellen des Phloems zu finden ist.

8. Das Vorhandensein von *AbSUT1*-mRNA und die hohe Konzentration von Saccharose im Phloemsaft von *Asarina barclaiana* zeigen, daß es sich bei dieser Pflanzenart vermutlich um einen apoplastischen Phloembelader handelt. Augenscheinlich ist in *Alonsoa meridionalis* als Pflanze mit offener Phloemanatomie und als Raffinose-Oligosaccharid transportierender Pflanzenart der Saccharose-Transporter AmSUT1 sowohl an der Phloembeladung wie auch an der Wiederaufnahme von Saccharose während des Ferntransports beteiligt. Daher könnte es sich bei *Alonsoa meridionalis* auch um einen apoplastischen Phloembelader handeln.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse an den beiden Modellpflanzen *Alonsoa meridionalis* und *Asarina barclaiana* zeigen, daß die Theorie der symplastischen Phloembeladung in ihrer heutigen Form nicht beibehalten werden kann. Ob es überhaupt eine symplastische oder gemischt symplastisch-apoplastische Phloembeladung gibt, muß sich in zukünftigen Untersuchungen herausstellen.

6. Abkürzungsverzeichnis

ABA	α -Aminobuttersäure
<i>AbIS</i>	<i>Asarina barclaiana</i> Interner RNA-Standard
AbLhca1*1	<i>Asarina barclaiana</i> Chlorophyll a/b-bindendes Protein Typ I
AbSUT1	<i>Asarina barclaiana</i> Saccharose-Transporter 1
AbSUT2	<i>Asarina barclaiana</i> Saccharose-Transporter 2
<i>AmIS</i>	<i>Alonsoa meridionalis</i> Interner RNA-Standard
AmLhca1*3	<i>Alonsoa meridionalis</i> Chlorophyll a/b-bindendes Protein Typ III
Amp	Ampicillin
AmSUT1	<i>Alonsoa meridionalis</i> Saccharose-Transporter 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C-AK	Antikörper gegen den C-Terminus von AmSUT1
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -Chlorophenylhydrazon
cDNA	copy-DNA
cpm/dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DDM	n-Dodecylmaltosid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Dithiothreitol
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FW	Frischgewicht
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GHC	Guanidiniumhydrochlorid
GUS	β -Glucuronidase
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid

kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KLH	„Keyhole Limpet Hemocyanin“
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
Km	Kanamycin
MES	Morpholino-Ethansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
N-AK	Antikörper gegen den N-Terminus von AmSUT1
NEM	N-Ethylmaleimid
NTP	Nukleotidtriphosphat (ATP, CTP, GTP, TTP, UTP)
OD	Optische Dichte
OPA	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCMBS	<i>p</i> -Chlorquecksilber-Benzosulfonsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-Diethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RACE	„Rapid Amplification of cDNA Ends“
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transcriptase, Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SE-CC-Komplex	Siebelement-Geleitzellen-Komplex
SUT/SUC	Saccharose-Transporter
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
U	Enzym-Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
x-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
x-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure

7. Literaturverzeichnis

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990:** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Bachmann M., Keller F., 1995:** Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. Inter- and intracellular compartmentation. *Plant Physiol.* 109: 991-998.
- Balachandran S., Xiang Y., Schobert C., Thompson G.A., Lucas W.J., 1997:** Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14150-14155.
- Baluska F., Cvrcková F., Kendrick-Jones J., Volkmann D., 2001:** Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength? *Plant Physiol.* 126: 39-46.
- Barker L., Kühn C., Weise A., Schulz A., Gebhardt C., Hirner B., Hellmann H., Schulze W., Ward J.M., Frommer W.B., 2000:** SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12: 1153-1164.
- Barlow C.A., Mc Cully M.E., 1972:** The ruby laser as an instrument for cutting the stylets of feeding aphids. *Can. J. Zool.* 50: 1497-1498.
- Beebe D.U., Turgeon R., 1992:** Localization of galactinol, raffinose, and stachyose synthesis in *Cucurbita pepo* leaves. *Planta* 188: 354-361.
- Bennett M.J., Marchant A., Green H.G., May S.T., Ward S.P., Millner P.A., Walker A.R., Schulz B., Feldmann K.A., 1996:** *Arabidopsis* AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948-950.
- Bent A.F., 2000:** *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol.* 124: 1540-1547.
- Bick J.A., Neelam A., Smith E., Nelson S.J., Hall J.L., Williams L.E., 1998:** Expression analysis of a sucrose carrier in the germinating seedling of *Ricinus communis*. *Plant Mol. Biol.* 38: 425-435.
- Blackman L.M., Boevink P., Santa Cruz S., Palukaitis P., Oparka K.J., 1998:** The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of *Nicotiana clevelandii*. *Plant Cell* 10: 525-537.
- Blatt M.R., 1985:** Extracellular potassium activity in attached leaves and its relation to stomatal function. *J. Exp. Bot.* 36: 240-251.
- Blum H., Beier H., Gross H.J., 1987:** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.

- Bostwick D.E., Dannenhoffer J.M., Skaggs M.I., Lister R.M., Larkins B.A., Thompson G.A., 1992:** Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells. *Plant Cell* 4: 1539-1548.
- Botha C.E.J., Evert R.F., 1978:** Observations of preferential feeding by the aphid, *Rhopalosiphum maidis* on abaxial phloem of *Cucurbita maxima*. *Protoplasma* 96: 75-80.
- Botha C.E.J., Evert R.F., Walmsley R.D., 1975:** Studies on *Gomphocarpus physocarpus*: Further evidence of preferential feeding by the aphid, *Aphis nerii* on the internal phloem. *Protoplasma* 84: 345-356.
- Botha C.E.J., Malcolm S.B., Evert R.F., 1977:** An investigation of preferential feeding habit in four Asclepiadaceae by the aphid, *Aphis nerii* B. de F. *Protoplasma* 92: 1-19.
- Bouché-Pillon S., Fleurat-Lessard P., Fromont J.C., Serrano R., Bonnemain J.L., 1994:** Immunolocalization of the plasma membrane H⁺-ATPase in minor veins of *Vicia faba* in relation to phloem loading. *Plant Physiol.* 105: 691-697.
- Bradford M.M., 1976:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Breitkreuz K.E., Shelp B.J., Fischer W.N., Schwacke R., Rentsch D., 1999:** Identification and characterization of GABA, proline and quaternary ammonium compound transporters from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 450: 280-284.
- Bürkle L., Hibberd J.M., Quick W.P., Kühn C., Hirner B., Frommer W.B., 1998:** The H⁺-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.
- Bush D.R., 1990:** Electrogenicity, pH-dependence, and stoichiometry of the proton-sucrose symport. *Plant Physiol.* 93: 1590-1596.
- Bush D.R., 1993:** Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 513-542.
- Canny M.J.P., 1975:** Mass transfer. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 1, M.H. Zimmermann and J.A. Milburn (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin.
- Canny M.J., 1987:** Locating active proton extrusion pumps in leaves. *Plant Cell Environ.* 10: 271-274.
- Chang H.C., Bush D.R., 1997:** Topology of NAT2, a prototypical example of a new family of amino acid transporters. *J. Biol. Chem.* 272: 30552-30557.
- Chen J.J., Janssen B.J., Williams A., Sinha N., 1997:** A gene fusion at a homeobox locus: alterations in leaf shape and implications for morphological evolution. *Plant Cell* 9: 1289-1304.

- Chen L., Bush D.R., 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 D.R., 2001:** *ANT1*, an aromatic and neutral amino acid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125: 1813-1820.
- Chiou T.J., Bush D.R., 1998:** Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4784-4788.
- Citovsky V., Zambryski P., 2000:** Systemic transport of RNA in plants. *Trends Plant Sci.* 5: 52-54.
- Clark A.M., Jacobsen K.R., Bostwick D.E., Dannenhoffer J.M., Skaggs M.I., Thompson G.A., 1997:** Molecular characterization of a phloem-specific gene encoding the filament protein, Phloem Protein 1 (PP1), from *Cucurbita maxima*. *Plant J.* 12: 49-61.
- Clough S.J., Bent A.F., 1998:** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.
- Cooper J.D.H., Ogden G., McIntosh J., Turnell D.C., 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.
- Crawford K.M., Zambryski P.C., 1999:** Plasmodesmata signaling: many roles, sophisticated statutes. *Curr. Opinion Plant Biol.* 2: 382-387.
- Crawford K.M., Zambryski P.C., 2001:** Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol.* 125: 1802-1812.
- Davies C., Wolf T., Robinson S.P., 1999:** Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues. *Plant Sci.* 147: 93-100.
- Delrot S., Faucher M., Bonnemain J.L., Bonmort J., 1983:** Nycthemeral changes in intracellular and apoplastic sugars in *Vicia faba* leaves. *Physiol. Vég.* 21: 459-467.
- Delrot S., Atanassova R., Maurousset L., 2000:** Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 281-306.
- DeWitt N.D., Sussman M.R., 1995:** Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell* 7: 2053-2067.
- DeWitt N.D., Harper J.F., Sussman M.R., 1991:** Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. *Plant J.* 1: 121-128.
- Dröge W., Broer I., Pühler A., 1992:** Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* 187: 142-151.
- Evert R.F., Eschrich W., Eichhorn S.E., Limbach S.T., 1972:** Observations on penetration of barley leaves by the aphid *Rhopalosiphum maidis* (Fitch). *Protoplasma* 77: 95-109.

- Fischer W.N., André B., Rentsch D., Krolkiewicz S., Tegeder M., Breitzkreuz K., Frommer W.B., 1998:** Amino acid transport in plants. *Trends Plant Sci.* 3: 188-195.
- Fisher D.B., 1990:** Measurement of phloem transport rates by an indicator-dilution technique. *Plant Physiol.* 94: 455-462.
- Fisher D.B., Frame J.M., 1984:** A guide to the use of the exuding-stylect technique in phloem physiology. *Planta* 161: 385-393.
- Fisher D.B., Wu Y., Ku M.S.B., 1992:** Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. *Plant Physiol.* 100: 1433-1441.
- Fisher D.G., 1986:** Ultrastructure, plasmodesmatal frequency, and solute concentration in green areas of variegated *Coleus blumei* Benth. leaves. *Planta* 169: 141-152.
- Flora L.L., Madore M.A., 1993:** Stachyose and mannitol transport in olive (*Olea europaea* L.). *Planta* 189: 484-490.
- Flora L.L., Madore M.A., 1996:** Significance of minor-vein anatomy to carbohydrate transport. *Planta* 198: 171-178.
- Flügge U.I., Heldt H.W., 1991:** Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 129-144.
- Fondy B.R., Geiger D.R., 1977:** Sugar selectivity and other characteristics of phloem loading in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* 59: 953-960.
- Frohman M.A., Dush M.K., Martin G.R., 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 W.B., Hummel S., Riesmeier J.W., 1993:** Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5944-5948.
- Gahrtz M., Stolz J., Sauer N., 1994:** A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. *Plant J.* 6: 697-706.
- Gallet O., Lemoine R., Larsson C., Delrot S., 1989:** The sucrose carrier of the plant plasma membrane I. Differential affinity labeling. *Biochim. Biophys. Acta* 978: 56-64.
- Gamalei Y., 1989:** Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. *Trees* 3: 96-110.
- Gamalei Y., 1991:** Phloem loading and its development related to plant evolution from trees to herbs. *Trees* 5: 50-64.
- Giaquinta R., 1976:** Evidence for phloem loading from the apoplast. *Plant Physiol.* 57: 872-875.
- Giaquinta R., 1977:** Possible role of pH gradient and membrane ATPase in the loading of sucrose into the sieve tubes. *Nature* 267: 369-370.
- Gietl C., Ziegler H., 1979:** mRNA in phloem exudates? *Naturwissenschaften* 66: 523-524.
- Goggin F.L., Medville R., Turgeon R., 2001:** Phloem loading in the tulip tree. Mechanisms and evolutionary implications. *Plant Physiol.* 125: 891-899.

- Golecki B., Schulz A., Carstens-Behrens U., Kollmann R., 1998:** Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of Cucurbitaceae. *Planta* 206: 630-640.
- Golecki B., Schulz A., Thompson G.A., 1999:** Translocation of structural P proteins in the phloem. *Plant Cell* 11: 127-140.
- Gottwald J.R., Krysan P.J., Young J.C., Evert R.F., Sussman M.R., 2000:** Genetic evidence for the *in planta* role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13979-13984.
- Greutert H., Keller F., 1993:** Further evidence for stachyose and sucrose/H⁺ antiporters on the tonoplast of Japanese artichoke (*Stachys sieboldii*) tubers. *Plant Physiol.* 101: 1317-1322.
- Grierson C., Du J.S., de Torres Zabala M., Beggs K., Smith C., Holdsworth M., Bevan M., 1994:** Separate *cis* sequences and *trans* factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J.* 5: 815-826.
- Grignon C., Sentenac H., 1991:** pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 103-128.
- Grimm E., Bernhardt G., Rothe K., Jacob F., 1990:** Mechanism of sucrose retrieval along the phloem path – a kinetic approach. *Planta* 182: 480-485.
- Grimm E., Jahnke S., Rothe K., 1997:** Photoassimilate translocation in the petiole of *Cyclamen* and *Primula* is independent of lateral retrieval. *J. Exp. Bot.* 48: 1087-1094.
- Hamilton A.J., Baulcombe D.C., 1999:** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
- Haritatos E., Keller F., Turgeon R., 1996:** Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo* L. leaves: Implications for phloem loading. *Planta* 198: 614-622.
- Haritatos E., Ayre B.G., Turgeon R., 2000a:** Identification of phloem involved in assimilate loading in leaves by the activity of the galactinol synthase promoter. *Plant Physiol.* 123: 929-937.
- Haritatos E., Medville R., Turgeon R., 2000b:** Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 105-111.
- Hayashi H., Fukuda A., Suzui N., Fujimaki S., 2000:** Proteins in the sieve element-companion cell complexes: their detection, localization and possible functions. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 489-496.
- Heyser W., Evert R.F., Fritz E., Eschrich W., 1978:** Sucrose in the free space of translocating maize leaf bundles. *Plant Physiol.* 62: 491-494.
- Holthaus U., Schmitz K., 1991:** Distribution and immunolocalization of stachyose synthase in *Cucumis melo* L. *Planta* 185: 479-486.

- Hsu L.C., Chiou T.J., Chen L., Bush D.R., 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.
- Imlau A., Truernit E., Sauer N., 1999:** Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein in 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.
- Ishiwatari Y., Honda C., Kawashima I., Nakamura S.I., Hirano H., Mori S., Fujiwara T., Hayashi H., Chino M., 1995:** Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* 195: 456-463.
- Jackson D., 2000:** Opening up the communication channels: recent insights into plasmodesmal function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 394-399.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W., 1987:** GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3908.
- Jorgensen R.A., Atkinson R.G., Forster R.L.S., Lucas W.J., 1998:** An RNA-based information superhighway in plants. *Science* 279: 1486-1487.
- Kaiser C.A., Botstein D., 1986:** Secretion-defective mutations in the signal sequence for *Saccharomyces cerevisiae* invertase. *Mol. Cell. Biol.* 6: 2382-2391.
- Kandler O., Hopf H., 1982:** Oligosaccharides based on sucrose (sucrosyl oligosaccharides). In: *Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 13 A: Plant Carbohydrates I; Intracellular Carbohydrates*, F.A. Loewus und W. Tanner (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin.
- Kehr J., Haebel S., Blechschmidt-Schneider S., Willmitzer L., Steup M., Fisahn J., 1999:** Analysis of phloem protein patterns from different organs of *Cucurbita maxima* Duch. by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectroscopy combined with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Planta* 207: 612-619.
- Kempers R., Ammerlaan A., van Bel A.J.E., 1998:** Symplasmic constriction and ultrastructural features of the sieve element/companion cell complex in the transport phloem of apoplasmically and symplasmically phloem-loading species. *Plant Physiol.* 116: 271-278.
- Kim M., Canio W., Kessler S., Sinha N., 2001:** Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* 293: 287-289.
- Klement Z., 1965:** Method of obtaining fluid from the intercellular spaces of foliage and the fluid's merit as substrate for phyto-bacterial pathogens. *Phytopathology* 55: 1033-1034.
- Knoblauch M., van Bel A.J.E., 1998:** Sieve tubes in action. *Plant Cell* 10: 35-50.
- Knop C., 1998:** Untersuchungen zum Zucker- und Aminosäuretransport bei der symplastischen Phloembeladung. Diplomarbeit, Math. Nat. Fakultät, 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.
- Komor E., Rotter M., Tanner W., 1977:** A proton-cotransport system in a higher plant: Sucrose transport in *Ricinus communis*. *Plant Sci. Letters* 9: 153-162.
- Komor E., Orlich G., Weig A., Köckenberger W., 1996:** Phloem loading – not metaphysical, only complex: towards a unified model of phloem loading. *J. Exp. Bot.* 47: 1155-1164.
- Koncz C., Schell J., 1986:** The promoter of T-L DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204: 383-396.
- Kühn C., Quick W.P., Schulz A., Riesmeier J.W., Sonnewald U., Frommer W.B., 1996:** Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant Cell Environ.* 19: 1115-1123.
- Kühn C., Franceschi V.R., Schulz A., Lemoine R., Frommer W.B., 1997:** Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* 275: 1298-1300.
- Laemmli U.K., 1970:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lalonde S., Boles E., Hellmann H., Barker L., Patrick J.W., Frommer W.B., Ward J.M., 1999:** The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11: 707-726.
- Le Gouill C., Parent J.L., 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 D.G., Heldt H.W., 1995:** Subcellular volumes and metabolite concentrations in potato (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) leaves. *Bot. Acta* 108: 439-444.
- Lemoine R., 2000:** Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 246-262.
- Lemoine R., Kühn C., Thiele N., Delrot S., Frommer W.B., 1996:** Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: Effects on amount and activity. *Plant Cell Environ.* 19: 1124-1131.
- Lemoine R., Bürkle L., Barker L., Sakr S., Kühn C., Regnacq M., Gaillard C., Delrot S., Frommer W.B., 1999:** Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Letters* 454: 325-330.
- Li Z.S., Gallet O., Gaillard C., Lemoine R., Delrot S., 1992:** The sucrose carrier of the plant plasmalemma III. Partial purification and reconstitution of active sucrose transport in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1103: 259-267.
- Logemann J., Schell J., Willmitzer L., 1987:** Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163: 16-20.

- Lohaus G., Moellers C., 2000:** Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* 211: 833-840.
- Lohaus G., Fischer K., 2001:** Intracellular and intercellular transport of nitrogen and carbon. In: *Advances in Photosynthesis: Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon metabolism*, C.H. Foyer und G. Noctor (Hrsg.), Kapitel 11, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. In Druck.
- Lohaus G., Burba M., Heldt H.W., 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 H.W., 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 H.W., 1998:** Transport of amino acids with special emphasis on the synthesis and transport of asparagine in the Illinois low protein and Illinois high protein strains of maize. *Planta* 205: 181-188.
- Lohaus G., Pennewiss K., Sattelmacher B., Hußmann M., Muehling K.H., 2001:** Is the infiltration technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiol. Plant.* 111: 457-465.
- Lu C.A., Lim E.K., Yu S.M., 1998:** Sugar response sequence in the promoter of a rice α -amylase gene serves as a transcriptional enhancer. *J. Biol. Chem.* 273: 10120-10131.
- Ludwig A., Stolz J., Sauer N., 2000:** Plant sucrose-H⁺ symporters mediate the transport of vitamin H. *Plant J.* 24: 503-509.
- Madore M.A., Webb J.A., 1981:** Leaf free space analysis and vein loading in *Cucurbita pepo*. *Can. J. Bot.* 59: 2550-2557.
- Marienfeld S., Stelzer R., 1993:** X-ray microanalyses in roots of Al-treated *Avena sativa* plants. *J. Plant Physiol.* 141: 569-573.
- Meyer S., Melzer M., Truernit E., Hümmer C., Besenbeck R., Stadler R., Sauer N., 2000:** *AtSUC3*, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant J.* 24: 869-882.
- Mitchell D.E., Gadus M.V., Madore M.A., 1992:** Patterns of assimilate production and translocation in muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Plant Physiol.* 99: 959-965.
- Moing A., Carbonne F., Zipperlin B., Svanella L., Gaudillère J.P., 1997:** Phloem loading in peach: symplastic or apoplastic? *Physiol. Plant.* 101: 489-496.
- Mühling K.H., Plieth C., Hansen U.P., Sattelmacher B., 1995:** Apoplastic pH of intact leaves of *Vicia faba* as influenced by light. *J. Exp. Bot.* 46: 377-382.
- Münch E., 1930:** Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Fischer Verlag, Jena.

- Mullis K.B., Faloona F.A., 1987:** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Noiraud N., Delrot S., Lemoine R., 2000:** The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiol.* 122: 1447-1455.
- Noiraud N., Maurousset L., Lemoine R., 2001:** Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *Plant Cell* 13: 695-705.
- Ohshima T., Hayashi H., Chino M., 1990:** Collection and chemical composition of pure phloem sap from *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.* 31: 735-737.
- Oparka K.J., Turgeon R., 1999:** Sieve elements and companion cells - traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* 11: 739-750.
- Oparka K.J., Santa Cruz S., 2000:** The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 323-347.
- Oparka K.J., Roberts A.G., 2001:** Plasmodesmata. A not so open-and-shut case. *Plant Physiol.* 125: 123-126.
- Oparka K.J., Roberts A.G., Boevink P., Santa Cruz S., Roberts I., Pradel K.S., Imlau A., Kolitzky G., Sauer N., Epel B., 1999:** Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 97: 743-754.
- Palauqui J.C., Elmayan T., Pollien J.M., Vaucheret H., 1997:** Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* 16: 4738-4745.
- Pate J.S., Gunning B.E.S., 1969:** Vascular transfer cells in angiosperm leaves. A taxonomic and morphological survey. *Protoplasma* 68: 135-156.
- Patrick J.W., 1990:** Sieve element unloading: cellular pathway, mechanism and control. *Physiol. Plant.* 78: 298-308.
- Patrick J.W., 1997:** Phloem unloading: Sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 191-222.
- Pawlowski K., Ratet P., Schell J., de Bruijn F.J., 1987:** Cloning and characterization of *nifA* and *ntnC* genes of the stem nodulating bacterium ORS571, the nitrogen fixing symbiont of *Sesbania rostrata*: Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes in the free living versus symbiotic state. *Mol. Gen. Genet.* 206: 207-219.
- Peterson G.L., 1977:** A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356.
- Pickard B.G., Beachy R.N., 1999:** Intercellular connections are developmentally controlled to help move molecules through the plant. *Cell* 98: 5-8.
- Randall P.J., Bouma D., 1973:** Zinc deficiency, carbonic anhydrase, and photosynthesis in leaves of spinach. *Plant Physiol.* 52: 229-232.

- Reichel C., Mathur J., Eckes P., Langenkemper K., Koncz C., Schell J., Reiss B., Maas C., 1996:** Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5888-5893.
- Rentsch D., Frommer W.B., 1996:** Molecular approaches towards an understanding of loading and unloading of assimilates in higher plants. J. Exp. Bot. 47: 1199-1204.
- Rentsch D., Hirner B., Schmelzer E., Frommer W.B., 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 K.J., Frommer W.B., 1998:** Structure and function of plasma membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. J. Membrane Biol. 162: 177-190.
- Riens B., Lohaus G., Heineke D., Heldt H.W., 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 J.W., Willmitzer L., Frommer W.B., 1992:** Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. EMBO J. 11: 4705-4713.
- Riesmeier J.W., Hirner B., Frommer W.B., 1993:** Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. Plant Cell 5: 1591-1598.
- Riesmeier J.W., Willmitzer L., Frommer W.B., 1994:** Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. EMBO J. 13: 1-7.
- Ripp K.G., Viitanen P.V., Hitz W.D., Franceschi V.R., 1988:** Identification of a membrane protein associated with sucrose transport into cells of developing soybean cotyledons. Plant Physiol. 88: 1435-1445.
- Robards A.W., Lucas W.J., 1990:** Plasmodesmata. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 369-419.
- Robinson D.G., Hinz G., 2001:** Organelle isolation. In: Plant Cell Biology: A practical approach, B. Satiat-Jeunemaitre und C. Hawes (Hrsg.), IRL Press, Oxford.
- Roblin G., Sakr S., Bonmort J., Delrot S., 1998:** Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. FEBS Lett. 424:165-168.
- Rothe K., Porzel A., Neumann S., Grimm E., 1999:** Characteristics of the phloem path: analysis and distribution of carbohydrates in the petiole of *Cyclamen*. J. Exp. Bot. 50: 1807-1816.
- Roychoudhury R., Jay E., Wu R., 1976:** Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. Nucl. Acids Res. 3: 863-877.

- Ruan Y.L., Llewellyn D.J., Furbank R.T., 2001:** The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K⁺ transporters and expansin. *Plant Cell* 13: 47-60.
- Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares B., Lucas W.J., 1999:** Phloem long-distance transport of *CmNACP* mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126: 4405-4419.
- Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares B., Lucas W.J., 2001:** The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr. Opinion Plant Biol.* 4: 202-209.
- Saier M.H., 2000:** Families of proteins forming transmembrane channels. *J. Membrane Biol.* 175: 165-180.
- Sakuth T., Schobert C., Pecsvaradi A., Eichholz A., Komor E., Orlich G., 1993:** Specific proteins in the sieve-tube exudate of *Ricinus communis* L. seedlings: separation, characterization and in-vivo labelling. *Planta* 191: 207-213.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989:** Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger F., Nickler S., Coulson A.R., 1977:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sasaki T., Chino M., Hayashi H., Fujiwara T., 1998:** Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol.* 39: 895-897.
- Sauer N., 1997:** Sieve elements and companion cells - extreme division of labour. *Trends Plant Sci.* 2: 285-286.
- Sauer N., Tanner W., 1984:** Partial purification and characterization of inducible transport proteins of *Chlorella*. *Z. Pflanzenphysiol.* 114: 367-375.
- Sauer N., Stadler R., 1993:** A sink-specific H⁺/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *Plant J.* 4: 601-610.
- 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: *Membrane Transport*, S. Baldwin (Hrsg.), Practical Approach Series, Oxford University Press: 79-105.
- Savchenko G., Wiese C., Neimanis S., Hedrich R., Heber U., 2000:** pH regulation in apoplastic and cytoplasmic cell compartments of leaves. *Planta* 211: 246-255.
- Schmitz K., Cuypers B., Moll M., 1987:** Pathway of assimilate transfer between mesophyll cells and minor veins in leaves of *Cucumis melo* L. *Planta* 171: 19-29.
- Schobert C., Baker L., Szederkényi J., Großmann P., Komor E., Hayashi H., Chino M., Lucas W.J., 1998:** Identification of immunologically related proteins in sieve-tube exudate collected from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Planta* 206: 245-252.

- Schobert C., Gottschalk M., Kovar D.R., Staiger C.J., Yoo B.C., Lucas W.J., 2000:** Characterization of *Rizinus communis* phloem profilin, RcPRO1. *Plant Mol. Biol.* 42: 719-730.
- Schulze W., Weise A., Frommer W.B., Ward J.M., 2000:** Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS Letters* 485: 189-194.
- Schwacke R., Grallath S., Breitzkreuz K.E., Stransky E., Stransky H., Frommer W.B., Rentsch D., 1999:** LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and γ -amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell* 11: 377-391.
- Serrano R., Kielland-Brandt M.C., Fink G.R., 1986:** Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$, K^+ - and Ca^{2+} -ATPases. *Nature* 319: 689-693.
- Shakya R., Sturm A., 1998:** Characterization of source- and sink-specific sucrose/ H^+ symporters from carrot. *Plant Physiol.* 118: 1473-1480.
- Sjölund R.D., 1997:** The phloem sieve element: A river runs through it. *Plant Cell* 9: 1137-1146.
- Smith L.M., Sabnis D.D., Johnson R.P.C., 1987:** Immunochemical localization of phloem lectin from *Cucurbita maxima* using peroxidase and colloidal-gold labels. *Planta* 170: 461-470.
- Sovonick S.A., Geiger D.R., Fellows R.J., 1974:** Evidence for active phloem loading in the minor veins of sugar beet. *Plant Physiol.* 54: 886-891.
- Speer M., Kaiser W.M., 1991:** Ion relations of symplastic and apoplastic space in leaves from *Spinacea oleracea* L. and *Pisum sativum* L. under salinity. *Plant Physiol.* 97: 990-997.
- Sprenger N., Keller F., 2000:** Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases. *Plant J.* 21: 249-258.
- Stadler R., Sauer N., 1996:** The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot. Acta* 109: 299-306.
- 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.
- Stadler R., Truernit E., Gahrtz M., Sauer N., 1999:** The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* 19: 269-278.
- Stitt M., 1996:** Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: a step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. *Plant Cell* 8: 565-571.
- Stolz J., Ludwig A., Stadler R., Biesgen C., Hagemann K., Sauer N., 1999:** Structural analysis of a plant sucrose carrier using monoclonal antibodies and bacteriophage lambda surface display. *FEBS Letters* 453: 375-379.
- Sturm A., Tang G.Q., 1999:** The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* 4: 401-407.

- Szederkényi J., Komor E., Schobert C., 1997:** Cloning of the cDNA for glutaredoxin, an abundant sieve-tube exudate protein from *Ricinus communis* L. and characterization of the glutathione-dependent thiol-reduction system in sieve tubes. *Planta* 202: 349-356.
- Tegeder M., Wang X.D., Frommer W.B., Offler C.E., Patrick J.W., 1999:** Sucrose transport into developing seeds of *Pisum sativum* L. *Plant J.* 18: 151-161.
- Tetlow I.J., Farrar J.F., 1993:** Apoplastic sugar concentration and pH in barley leaves infected with brown rust. *J. Exp. Bot.* 44: 929-936.
- Thompson G.A., Schulz A., 1999:** Macromolecular trafficking in the phloem. *Trends Plant Sci.* 4: 354-360.
- Truernit E., Sauer N., 1995:** The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β -glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196: 564-570.
- Tsien R.Y., 1998:** The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509-544.
- Turgeon R., 1991:** Symplastic phloem loading and the sink-source transition in leaves: a model. In: *Recent Advances in Phloem Transport and Assimilate Compartmentation*, J.L. Bonnemain, S. Delrot, W.J. Lucas, J. Dainty (Hrsg.), Ouest Editions, Nantes.
- Turgeon R., 1996:** Phloem loading and plasmodesmata. *Trends Plant Sci.* 1: 418-423.
- Turgeon R., Hepler P.K., 1989:** Symplastic continuity between mesophyll and companion cells in minor veins of mature *Cucurbita pepo* L. leaves. *Planta* 179: 24-31.
- Turgeon R., Gowan E., 1990:** Phloem loading in *Coleus blumei* in the absence of carrier-mediated uptake of export sugar from the apoplast. *Plant Physiol.* 94: 1244-1249.
- Turgeon R., Gowan E., 1992:** Sugar synthesis and phloem loading in *Coleus blumei* leaves. *Planta* 187: 388-394.
- Turgeon R., Webb J.A., Evert R.F., 1975:** Ultrastructure of minor veins in *Cucurbita pepo* leaves. *Protoplasma* 83: 217-232.
- Turgeon R., Beebe D.U., Gowan E., 1993:** The intermediary cell: Minor vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in the Scrophulariaceae. *Planta* 191: 446-456.
- Urwin N.A.R., Jenkins G.I., 1997:** A sucrose repression element in the *Phaseolus vulgaris* *rbcS2* gene promoter resembles elements responsible for sugar stimulation of plant and mammalian genes. *Plant Mol. Biol.* 35: 929-942.
- van Bel A.J.E., 1993:** Strategies of phloem loading. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 253-281.
- van Bel A.J.E., 1996:** Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. Two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons? *J. Exp. Bot.* 47: 1129-1140.
- van Bel A.J.E., Gamalei Y., 1992:** Ecophysiology of phloem loading in source leaves. *Plant Cell Environ.* 15: 265-270.

- van Bel A.J.E., van Kesteren W.J.P., Papenhuijzen C., 1988:** Ultrastructural indications for coexistence of symplastic and apoplastic phloem loading in *Commelina benghalensis* leaves. *Planta* 176: 159-172.
- van Bel A.J.E., Gamalei Y., Ammerlaan A., Bik L.P.M., 1992:** Dissimilar phloem loading in leaves with symplasmic or apoplasmic minor-vein configurations. *Planta* 186: 518-525.
- van Bel A.J.E., Ammerlaan A., van Dijk A.A., 1994:** A three-step screening procedure to identify the mode of phloem loading in intact leaves. *Planta* 192: 31-39.
- Viola R., Roberts A.G., Haupt S., Gazzani S., Hancock R.D., Marmioli N., Machray G.C., Oparka K.J., 2001:** Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell* 13: 385-398.
- Voinnet O., Vain P., Angell S., Baulcombe D.C., 1998:** Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95: 177-187.
- Weber H., Borisjuk L., Heim U., Sauer N., Wobus U., 1997:** A role for sugar transporters during seed development: Molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9: 895-908.
- Weig A., Komor E., 1996:** An active sucrose carrier (Scr1) that is predominantly expressed in the seedlings of *Ricinus communis* L. *J. Plant Physiol.* 147: 685-690.
- Weise A., Barker L., Kühn C., Lalonde S., Buschmann H., Frommer W.B., Ward J.M., 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.
- Weschke W., Panitz R., Sauer N., Wang Q., Neubohn B., Weber H., Wobus U., 2000:** Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant J.* 21: 455-467.
- Williams L.E., Lemoine R., Sauer N., 2000:** Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci.* 5: 283-290.
- Winter H., Lohaus G., Heldt H.W., 1992:** Phloem transport of amino acids in relation to their cytosolic levels in barley leaves. *Plant Physiol.* 99: 996-1004.
- Winter H., Robinson D.G., Heldt H.W., 1993:** Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves. *Planta* 191: 180-190.
- Winter H., Robinson D.G., Heldt H.W., 1994:** Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta* 193: 530-535.
- Winzer T., 1999:** Untersuchungen zum Einfluß des Phloemtransports auf das Speicherverhalten von verschiedenen Rübensorten (*Beta vulgaris* L.) unter besonderer Berücksichtigung des Saccharosetransporters BvSUT1. Dissertation, Math. Nat. Fakultät, Universität Göttingen.

- Winzer T., Lohaus G., Heldt H.W., 1996:** Influence of phloem transport, N-fertilization and ion accumulation on sucrose storage in the taproots of fodder beet and sugar beet. *J. Exp. Bot.* 47: 863-870.
- Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., Decruz E., Noyer Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z., Graham M.W., 1989:** Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl. Acids Res.* 17: 3469-3478.
- Xoconostle-Cázares B., Xiang Y., Ruiz-Medrano R., Wang H.L., Monzer J., Yoo B.C., McFarland K.C., Franceschi V.R., Lucas W.J., 1999:** Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 283: 94-98.
- Young G.B., Jack D.L., Smith D.W., Saier M.H.Jr., 1999:** The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1415: 306-322.
- Zhao R., Dielen V., Kinet J.M., Boutry M., 2000:** Cosuppression of a plasma membrane H⁺-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility. *Plant Cell* 12: 535-546.
- Zhou J.J., Miller A.J., 2000:** Comparison of the transport properties of three plant sucrose carriers expressed in *Xenopus* oocytes. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 725-732.
- Zhou J.J., Theodoulou F., Sauer N., Sanders D., Miller A.J., 1997:** A kinetic model with ordered cytoplasmic dissociation for SUC1, an Arabidopsis H⁺/sucrose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Membrane Biol.* 159: 113-125.
- Zimmermann M.H., Ziegler H., 1975:** List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 1, M.H. Zimmermann und J.A. Milburn (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin.

Vielen Dank an...

Frau PD Dr. Gertrud Lohaus für Ermöglichung dieser Arbeit, die jederzeitige Unterstützung meiner Ideen und wie immer das richtige Maß an Betreuung.

Prof. Dr. Hans-Walter Heldt für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können, die freundliche Übernahme des Korreferats und vor allem seine großzügige Unterstützung des Aufenthalts in Australien. Danke!

Dr. Katharina Pawlowski für all die molekularbiologischen Hilfestellungen im Lauf der Jahre, die lange Duldung in Labor 111 (obwohl ich das Experimentier-Glück alleine aufgebraucht habe) und die beruhigende Tatsache, daß immer noch jemand müder und gestresster war als ich.

Prof. Dr. Norbert Sauer und seine ebenso nette wie hilfsbereite Arbeitsgruppe in Erlangen, besonders Dr. Ruth Stadler, Carola Schröder und Dr. Astrid Imlau, für die Möglichkeit, die Immunolokalisation und Saccharose-Aufnahmetests bei ihnen durchführen zu können.

Frau Prof. Dr. Christiane Gatz und ihre Arbeitsgruppe für die Möglichkeit, jederzeit Geräte, Chemikalien und vor allem das „know how“ nutzen zu können.

Dr. Mareike Büker und Dr. Thilo Winzer für die schöne gemeinsame Zeit, obwohl sie viel mehr zu leiden hatten als ich.

Jens Tilsner für die Infiltration mit allen möglichen Filmen („Doo, doo, dude (?), looking out my back door“), Feierabend-Bieren etc. Möge mein Laborglück auf dich (und Katharina) übergehen!

Olga Voitsekhovskaja für ihr mit mir geteiltes Interesse an *Alonsoa* und *Asarina* und natürlich die Daten der nicht-wässrigen Fraktionierung.

Gerd Mader für die Überwindung aller technischen Hürden, die sich vor allem bei den Computern immer wieder auftürmten.

Herrn Wedemeyer für die exzellente Betreuung meiner Pflanzen, selbst wenn sie das ganze Gewächshaus mit weißer Fliege infizierten.

alle noch nicht genannten jetzigen und ehemaligen Kollegen in der Abteilung für Biochemie der Pflanze für die angenehme Atmosphäre durch all die Jahre. Es war eine schöne Zeit mit euch!

Lebenslauf

14.05.1972	geboren in Hildesheim
1978 - 1982	Grundschule Wehrstedt
1982 - 1984	Orientierungsstufe St. Augustinus, Hildesheim
1984 - 1991	Bischöfl. Gymnasium Josephinum, Hildesheim
Mai 1991	Abitur
Juli 1991 - September 1992	Zivildienst im Orthopädischen Reha-Klinikum „Salze Klinik II“, Bad Salzdetfurth
Oktober 1992	Beginn des Studiums der Biologie (Diplom) an der Universität-GH Kassel
Oktober 1994	Diplomvorprüfung in den Fächern Botanik, Zoologie, Mikrobiologie/Genetik, Chemie und Physik
März 1995	Studienortwechsel an die Georg-August-Universität in Göttingen
Juni 1997	Mündliche Diplomhauptprüfung in den Fächern Biochemie, Botanik und Organische Chemie
Juli 1997 - August 1998	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema „Untersuchungen zum Zucker- und Aminosäuretransport bei der symplastischen Phloembeladung“ im Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Abt. Biochemie der Pflanze, unter der Anleitung von Prof. Dr. H.-W. Heldt
September 1998	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation