

**Molekulare, biochemische und physiologische
Eigenschaften von Transportproteinen
der MCF (mitochondrial carrier family)
aus Pflanzen und Protisten**

Dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern zur Erlangung
des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften eingereichte

Dissertation

Vorgelegt von:

Michaela Leroch
Kaiserslautern, Juni 2006

Betreuer: Dr. Joachim Tjaden

Gutachter: Prof. Dr. H. E. Neuhaus
Prof. Dr. M. Hahn

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Evolution und physiologische Funktion von Mitochondrien	1
1.2 Eukaryotische Organismen ohne Mitochondrien, die alternative Organellen in Form von Hydrogenosomen bzw. Cryptosomen (Mitosomen) besitzen.....	3
1.3 Übersicht über eukaryotische Adeninnukleotid-Transporter	5
1.4 Physiologische Funktion und Energiebedarf des Endoplasmatischen Retikulums	6
1.5 Ziele der vorliegenden Dissertation	7
2. Material und Methoden	10
2.1 Pflanzen.....	10
2.1.1 Pflanzenanzucht unter sterilen Bedingungen.....	10
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	10
2.2.1 Bakterienstämme und Plasmide.....	10
2.2.2 Anzuchtbedingungen für Bakterien	12
2.2.3 Oligonukleotide.....	13
2.2.4 Rekombinante DNA-Techniken.....	14
2.2.4.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	14
2.2.4.2 Herstellung kompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	15
2.2.4.3 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Hitzeschock oder Elektroporation	15
2.2.4.4 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen.....	15
2.2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese	16
2.2.4.6 <i>In vitro</i> Manipulation von DNA	16
2.2.4.7 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	16
2.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA und Poly-A ⁺ -mRNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Oryza sativa</i>	17
2.2.6 Herstellung des 1.Strang cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Oryza sativa</i>	17
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	17
2.2.8 Quantitative RT-PCR	18

2.2.9	DNA-Sequenz-Analyse.....	19
2.2.10	Isolierung von Protoplasten aus Tabakblättern.....	19
2.2.11	Transformation von isolierten Tabakprotoplasten	20
2.2.12	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> („floral dip“-Methode).....	20
2.2.13	Isolierung genomischer DNA von <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
2.2.14	Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	21
2.2.15	Klonierungsstrategien.....	21
2.2.15.1	Herstellung der Plasmidkonstrukte zur heterologen Expression in <i>E. coli</i>	21
2.2.15.2	Herstellung transgener <i>AfER-ANT1</i> c-Myc-Tag Pflanzen.....	22
2.2.15.3	Herstellung des <i>AtAAC5</i> -Promotor-GUS-Fusionskonstruktes zur Analyse der Gewebe-spezifischen Expression	22
2.2.15.4	Klonierungsstrategie des <i>AfER-ANT1</i> -Antisensekonstruktes für die Herstellung von Dosismutanten.....	22
2.3	Biochemische Methoden	23
2.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford und Pierce	23
2.3.1.1	Bradford.....	23
2.3.1.2	Pierce.....	23
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	23
2.3.3	Westernblot und Antikörpernachweis.....	24
2.3.4	Methionin-Assay (Nachweis heterolog exprimierter Membranproteine in <i>E. coli</i> durch radioaktive Markierung mit ³⁵ S-Methionin).....	26
2.3.5	IMAC (Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie).....	27
2.3.6	Northern-Blot Analysen	27
2.3.7	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	28
2.3.8	Hybridisierung von Northern-Blots mit radioaktiv markierten DNA-Sonden.....	28
2.3.9	<i>In vitro</i> Translation von Membranprotein und Targeting in isolierte ER-Mikrosomen	28
2.3.10	Samenanalysen.....	29
2.3.10.1	Proteinbestimmung in Samen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
2.3.10.2	Lipidbestimmung in Samen	29
2.3.11	Metabolitenbestimmung in <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
2.3.11.1	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes	29

2.3.11.2	Aminosäurekonzentrationsbestimmung	30
2.3.11.3	Bestimmung der Nukleotidkonzentration.....	30
2.3.11.4	Bestimmung der Zucker- und Stärkekonzentration in <i>Arabidopsis thaliana</i> Blattmaterial	30
2.3.12	Saccharosedichtegradientenzentrifugation	31
2.3.13	Isolierung von intakten Mitochondrien aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
2.3.14	Importstudien an intakten Mitochondrien mit radioaktiv markiertem ATP und Glycin.....	33
2.3.15	Importstudien an intakten <i>E. coli</i> -Zellen	34
2.3.16	Herstellung von [α^{32} P]-ADP.....	34
2.3.17	GUS-Färbung	34
2.4	Computergestützte Analysen	35
3.	Ergebnisse.....	36
3.1	Charakterisierung des ER-ANT1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
3.1.1	Phylogenetische Eingruppierung des AtER-ANT1 und Aminosäuresequenzanalysen	36
3.1.2	Biochemische Charakterisierung des AtER-ANT1 mittels heterologer Expression in <i>E. coli</i>	40
3.1.2.1	Herstellung der Plasmidkonstrukte für eine heterologe Expression von AtER-ANT1 in <i>E. coli</i>	41
3.1.2.2	Importstudien zur biochemischen Charakterisierung des AtER-ANT1 durch heterologe Expression in <i>E. coli</i>	42
3.1.3	Subzelluläre Lokalisierung des AtER-ANT1	47
3.1.3.1	Analyse der subzellulären Lokalisierung von AtER-ANT1 mittels GFP-Fusion und transienter Expression in isolierten Tabakprotoplasten	48
3.1.3.2	Analyse der subzellulären Lokalisierung von AtER-ANT1 mittels <i>in vitro</i> -Translation und Targeting in ER-Mikrosomen.....	50
3.1.3.3	Analyse der subzellulären Lokalisierung von AtER-ANT1 mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation und Antikörper-Nachweis	52
3.1.4	Gewebe- und entwicklungsspezifische Expression von AtER-ANT1.....	58
3.1.5	Analyse von zwei unabhängigen AtER-ANT1 Knockout-Linien	60
3.1.5.1	Herstellung von AtER-ANT1 Antisense-Pflanzen	61
3.1.5.2	Phänotyp homozygoter Knockout-Pflanzen bezüglich des AtER-ANT1-Gens	63
3.1.5.3	Samenanalysen der homozygoten AtER-ANT1 Knockout-Pflanzen	66

3.1.5.4	Metabolitenbestimmung der homozygoten <i>AtER-ANT1</i> Knockout-Pflanzen	67
3.1.5.4.1	Bestimmung der Zuckerkonzentration und des Stärkegehaltes	68
3.1.5.4.2	Bestimmung der Nukleotidkonzentration.....	68
3.1.5.4.3	Bestimmung einiger Metabolite des primären Stoffwechsels.....	69
3.1.5.4.4	Analyse der Aminosäurekonzentration.....	70
3.1.5.4.5	Nähere Analyse der drastischen Erhöhung der Glycinkonzentration in <i>AtER-ANT1</i> Knockout-Pflanzen	71
3.1.5.4.5.1	Analyse der Glycinaufnahme von <i>AtER-ANT1</i> mittels heterologer Expression in <i>E.coli</i>	71
3.1.5.4.5.2	Analyse der Glycinaufnahme an isolierten Mitochondrien von <i>AtER-ANT1</i> Knockout- Pflanzen und Wildtyp-Pflanzen	72
3.1.5.4.5.3	Wachstumsanalyse homozygoter <i>AtER-ANT1</i> Knockout-Pflanzen unter hoch CO ₂ - Bedingungen	74
3.1.5.4.6	Metabolitenbestimmung unter hoch CO ₂ -Bedingungen.....	75
3.1.5.4.6.1	Bestimmung der Saccharose- und Stärkekonzentration.....	75
3.1.5.4.6.2	Bestimmung der Nukleotidkonzentration von ATP und ADP sowie den Gehalt an ADP- Glukose	76
3.1.5.4.6.3	Bestimmung der Aminosäurekonzentration unter hoch CO ₂ -Bedingungen.....	77
3.2	Charakterisierung des ANT1 aus <i>Oryza sativa</i>	79
3.2.1	Phylogenetische Analyse des <i>OsER-ANT1</i>	79
3.2.2	Biochemische Charakterisierung des <i>OsER-ANT1</i>	80
3.2.3	Subzelluläre Lokalisierung des <i>OsER-ANT1</i>	85
3.3	Redundanz mitochondrialer AAC-Isoformen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	86
3.3.1	Knockout-Linien bezüglich des <i>AtAAC1</i> -Gens.....	86
3.3.2	Identifizierung einer Knockout-Linie bezüglich des <i>AtAAC2</i> -Gens	88
3.3.3	Analyse einer Knockout-Linie bezüglich des <i>AtAAC3</i> -Gens.....	88
3.3.4	Analyse einer Knockout-Linie bezüglich des <i>AtAAC5</i> -Gens und Herstellung von AAC5- Promotor-GUS-Fusionskonstrukten	89
3.4	Charakterisierung eines ANT1 aus <i>Entamoeba histolytica</i>	92
3.4.1	Phylogenetische Analyse des ANT1 aus <i>Entamoeba histolytica</i>	92
3.4.2	Biochemische Charakterisierung des ANT1 aus <i>Entamoeba histolytica</i>	93

4. Diskussion	98
4.1 <i>AtER-ANT1</i> und <i>OsER-ANT1</i> : ATP/ADP-Transporter in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums	98
4.1.1 Biochemische Charakterisierung der Transportproteine <i>AtER-ANT1</i> und <i>OsER-ANT1</i>	99
4.1.2 Subzelluläre Lokalisierung von <i>AtER-ANT1</i> und <i>OsER-ANT1</i>	101
4.1.3 Einblicke in die physiologische Funktion des <i>AtER-ANT1</i>	104
4.2 Die Redundanz verschiedener AAC-Isoformen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	112
4.2.1 Die Existenz von <i>AtAAC1</i> ist für <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen essentiell	112
4.2.2 Homozygote Knockout-Pflanzen bezüglich <i>AtAAC2</i> und <i>AtAAC3</i>	113
4.2.3 <i>AtAAC5</i> : Eine weitere Isoform in <i>Arabidopsis thaliana</i>	114
4.3 Ein Adeninnukleotid-Transporter in dem einzelligen Protisten <i>Entamoeba histolytica</i>	115
5. Zusammenfassung	117
6. Literaturverzeichnis	118
7. Anhang	127
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	127
7.2 Symbole für Aminosäuren	129
7.3 Lebenslauf	130
7.4 Publikationen	131

1. Einleitung

Ein wichtiges Kennzeichen des Lebens einer Zelle stellt ein strikt regulierter Stoffwechsel dar, der durch eine kontrollierte Aufnahme bzw. Abgabe von Stoffwechselintermediaten über biologische Membranen gewährleistet wird. Strukturell sind biologische Membranen semipermeable Doppelschichten aus amphiphatischen Lipiden, die wiederum aus einem hydrophilen Außenbereich und einem hydrophoben Innenbereich aufgebaut sind. Sie sind in der Regel durchlässig für Wasser und Gase, zudem semipermeabel für einige Ionen und andere kleinere Moleküle. Für den Transport von größeren oder geladenen Molekülen besitzt die Lipiddoppelschicht u.a. spezifische integrale Transportproteine (Carrier), die einen kontrollierten Substrataustausch über biologische Membranen ermöglichen.

Prokaryotische Zellen besitzen nur eine Membran, die Plasmamembran. Dahingegen zeichnen sich eukaryotische Zellen durch das Vorhandensein eines komplexen Endomembransystems aus. Die daraus resultierende Kompartimentierung eukaryotischer Zellen ermöglicht das gleichzeitige Ablaufen verschiedener, oft gegenläufiger Stoffwechselprozesse in definierten Reaktionsräumen. Zu den unterschiedlichen Kompartimenten der eukaryotischen Zelle gehören die Plasmamembran, die Kernhülle, das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, die Vakuole (in Pflanzen und Hefen), die Peroxisomen, die Mitochondrien (bzw. alternative Organellen) und die Plastiden (in Pflanzen). Dabei besitzen die Energieversorgung und damit der Austausch von Adenosintriphosphat (ATP), der universellen Energiewährung aller biologischen Zellen, zwischen diesen Reaktionsräumen für den Gesamtmetabolismus eine herausragende und übergeordnete Rolle.

1.1 Die Evolution und physiologische Funktion von Mitochondrien

Fast alle existierenden eukaryotischen Organismen besitzen Mitochondrien. Dabei stellen die Mitochondrien ein Zellkompartiment dar, welches häufig auch als „Kraftwerk einer Zelle“ bezeichnet wird. Sie werden mütterlich vererbt und vermehren sich durch Teilung. Weiter besitzen Mitochondrien ein eigenes kleines Genom, das als Relikt ihrer Evolution angesehen werden kann. Dieses kleine Genom besteht aus etwa 37 Genen, die für 13 Proteine codieren, wobei diese Anzahl aufgrund der Diversität von Mitochondrien variiert. Die Evolution der Mitochondrien wird als ein sehr wichtiges Ereignis in der Entwicklung der ersten eukaryotischen Zelle angesehen, wobei diese derzeit stark kontrovers diskutiert wird (MARTIN & MÜLLER, 1998; CAVALIER-SMITH, 2002). Die heute favorisierte Hypothese (MARTIN & MÜLLER, 1998) postuliert, dass sich die erste eukaryotische Zelle durch die Symbiose zwischen einem methanogenen Archaeobakterium und einem α -Proteobakterium entwickelt hat. Während der Evolution verlor das α -Proteobakterium durch Gentransfer eine Vielzahl seiner Gene, die von dem Genom des Archaeobakteriums aufgenommen wurden. Dieses Ereignis führte daraufhin zu dem Verlust der Fähigkeit als eigenständiger Organismus zu existieren. Im Laufe der Evolution entwickelten sich so die α -Proteobakterien zu den energieliefernden Mitochondrien. Die endosymbiotische Herkunft der Mitochondrien erklärt auch die Existenz von zwei Membranen, die das Mitochondrium umgeben und so die mitochondriale Matrix vom Zytosol und anderen Zellkompartimenten abgrenzt. Die äußere mitochondriale Membran besitzt zahlreiche Poren, die für kleinere Moleküle und Ionen bis zu einer

molekularen Masse von bis zu 5 kDa durchlässig sind (MARECHAL *et al.*, 1987). Die innere Hüllmembran hingegen enthält im Vergleich zur äußeren Membran keine Poren, so dass die innere Membran die entscheidende Barriere für Stoffwechselintermediate darstellt.

Zusammen mit der inneren mitochondrialen Membran stellt die mitochondriale Matrix den Ort der Atmungskette und des Zitratzyklus dar, welche die zentralen Stoffwechselwege aller Mitochondrien sind. Diese zentralen Funktionen sind in allen Mitochondrien-tragenden Organismen, trotz unabhängiger Evolution, stark konserviert.

Studien an pflanzlichen Mitochondrien konnten zeigen, dass diese sich im Gegensatz zu Mitochondrien aus Tieren oder Hefen durch bemerkenswerte zusätzliche Fähigkeiten auszeichnen. Die Entwicklung dieser Fähigkeiten kann dabei als eine Anpassung an den pflanzlichen Tag- bzw. Nachtrhythmus angesehen werden. Besonders nachts wird mit Hilfe der Mitochondrien die Energieversorgung der gesamten Zelle gewährleistet. Dazu werden im Zitratzyklus Kohlenhydrate abgebaut und die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente (NADH und FADH₂) in der Atmungskette zur Ausbildung eines Protonengradienten über die innere mitochondriale Membran genutzt. Der Protonengradient dient daraufhin der Synthese von ATP durch den in der inneren Membran integrierten F₀/F₁-ATPase-Komplex (NATH, 2002). Durch Export des mitochondrial synthetisierten ATP ins Zytosol steht dieses einer Reihe von katabolen und anabolen Stoffwechselreaktionen zur Verfügung.

In der Lichtphase werden auch in den Chloroplasten der Pflanzenzellen durch die Photosynthese ATP und Reduktionsäquivalente synthetisiert. Da die Chloroplasten das synthetisierte ATP und die Reduktionsäquivalente allerdings nicht direkt dem Zytosol zur Verfügung stellen, wird die Energie u. a. für die während der Lichtphase im Zytosol stattfindende Saccharose-Synthese und Nitratassimilation durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien bereitgestellt (RAGHAVENDRA *et al.*, 1994).

Der Aufbau der Atmungskette in pflanzlichen Mitochondrien ist im Vergleich zu anderen Organismen einzigartig. Neben den vier Enzymkomplexen der Atmungskette, existieren in der inneren Mitochondrienmembran weitere Enzymkomplexe (Matrixseite: alternative Oxidase, alternative NADH-Dehydrogenase; zytosolische Seite: NADH-Dehydrogenase und NADPH-Dehydrogenase). Diese kontrollieren das zelluläre ATP/NADH-Verhältnis, indem sie überschüssige Reduktionsäquivalente entfernen ohne, dass an deren Oxidation ein Protonentransport und somit eine Synthese von ATP gekoppelt ist (DOUCE & NEUNBURGER, 1989). Weiter erfüllen diese Komplexe eine wichtige Funktion zum Schutz der Zelle vor Photoinhibition (RAGHAVENDRA *et al.*, 1994).

Die Beteiligung an der Photorespiration ist eine weitere einzigartige Funktion pflanzlicher Mitochondrien. Dabei kommt es zur Bildung von Glycin, welches durch einen bisher unbekanntem Transporter in die Mitochondrien transportiert und dort zu Serin decarboxyliert wird und während des Tages wahrscheinlich das Hauptatmungssubstrat darstellt (BERGMANN & ERICSON, 1983; HANNING & HELDT, 1993; KRÖMER, 1995).

Der Zitratzyklus dient neben der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die Atmungskette ebenso zur Bereitstellung von Kohlenstoffgerüsten als Vorstufen für weitere Biosynthesen. So wird beispielsweise mitochondriales Citrat und α -Ketoglutarat über einen pflanzenspezifischen Oxalacetat-Translokator für die in den Plastiden stattfindende Glutamin- und Glutamat-Synthese bereitgestellt. Weitere Transportproteine, speziell für pflanzliche Mitochondrien, stellen der Malat- und Glutamat-Transporter dar. Das importierte Malat kann über das NAD-Malat-Enzym zu Pyruvat oxidiert werden (MACRAE &

MOORHOUSE, 1970), wohingegen der Glutamat-Transporter die mitochondriale Glutamat-Dehydrogenase mit Substrat zur Bildung von α -Ketoglutarat versorgt.

Die Gewährleistung der komplexen Stoffwechselfunktionen von Mitochondrien führt zu einer *de novo* Entwicklung einer absolut neuen in Prokaryoten nicht vorhandenen Transporter-Familie, die MCF (mitochondrial carrier family). Zur MCF-Familie gehören dabei Transportproteine, die sehr variable Transportsubstrate aufweisen, wie z.B. Protonen, Dicarbonsäuren, Aminosäuren und Nukleotide etc. Strukturell sind die Proteine der MCF-Transporterfamilie Homodimere (HACKENBERG & KLINGENBERG, 1980), wobei jedes Monomer mit einem molekularen Gewicht von rund 32 kDa aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut ist. Die Transmembrandomänen sind jeweils über einen kurzen hydrophilen Loop miteinander verbunden. Ein weiteres charakteristisches Merkmal der MCF-Transportproteine ist das Vorhandensein von konservierten ETFS-Sequenzen (Energy Transfer Protein Signatures).

In *Arabidopsis thaliana* konnten bereits rund 45 mögliche MCF-Transportproteine identifiziert werden (PICAULT *et al.*, 2004), wohingegen Hefe nur ungefähr 35 MCF-Mitglieder besitzt (PALMIERI *et al.*, 2000). Dabei stellen die mitochondrialen ATP/ADP-Carrier (AAC), die bis zu 30% der Gesamtproteine der inneren Mitochondrienmembran ausmachen können, die prominentesten Vertreter der MCF-Familie dar. Erst die Entwicklung eines ATP/ADP-Transporters machte den Endosymbionten für die Zelle wertvoll und unverzichtbar, so dass eine Evolution der α -Proteobakterien zu einem energieliefernden Organell beginnen konnte.

1.2 Eukaryotische Organismen ohne Mitochondrien, die alternative Organellen in Form von Hydrogenosomen bzw. Cryptosomen (Mitosomen) besitzen

Wie oben bereits beschrieben, kann die Entwicklung von Mitochondrien als ein wichtiges Ereignis in der Evolution der ersten eukaryotischen Zellen angesehen werden. Studien zeigten allerdings, dass eukaryotische Organismen existieren, die keine klassischen Mitochondrien tragen, sondern alternative bzw. rudimentäre Organellen, wie zum Beispiel Hydrogenosomen oder Cryptosomen (Mitosomen). Diese Organismen werden innerhalb der Evolution häufig als sehr basale Eukaryoten eingestuft, die entweder eine obligat anaerobe oder mikroaerophile Lebensweise auszeichnen. Hydrogenosomen bzw. Cryptosomen (Mitosomen) konnten bereits in den einzelligen Eukaryoten wie zum Beispiel Trichomonaden, Apicomplexa, Ciliaten und Chytriden identifiziert werden (BIAGINI *et al.*, 1997; EMBLEY *et al.*, 1997; ROGER, 1998; YARLETT & HACKSTEIN, 2005; VAN DER GIEZEN & TOVAR, 2005; VAN DER GIEZEN *et al.*, 2005).

Bis auf eine derzeitige bekannte Ausnahme besitzen sowohl die Hydrogenosomen als auch die Mitosomen im Gegensatz zu den Mitochondrien kein eigenes Genom, welches ihren evolutiven Ursprung näher erklären könnte (LEON-AVILA & TOVAR, 2004; VAN DER GIEZEN & TOVAR, 2005). Einzig in dem Protisten *Nyctotherus ovalis* konnte Organellen-DNA durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern nachgewiesen und sequenziert werden (AKHMANOVA *et al.*, 1998; BOXMA *et al.*, 2005). Weiter zeigt sich, dass sowohl den Hydrogenosomen als auch den Mitosomen eine vollständige Elektronentransportkette fehlt, die in Mitochondrien zur ATP-Synthese dient. Die ATP-Produktion verläuft in Hydrogenosomen über

den Mechanismus der Substratkettenphosphorylierung. Bei Cryptosomen (Mitosomen) konnte bisher keine ATP-Synthese nachgewiesen werden (MÜLLER, 1993, 1998; VAN DER GIEZEN *et al.*, 1997; MARTIN & MÜLLER, 1998; TOVAR *et al.*, 1999, 2003; MARTIN *et al.*, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2002; DYALL *et al.*, 2004). Somit fehlen den Hydrogenosomen und Mitosomen durch den Verlust des Genoms und die nicht komplett vorhandene Elektronentransportkette die wichtigsten Charakteristika der Mitochondrien.

Es wird davon ausgegangen, dass diese Organellen durch eine Adaption an die Umweltbedingungen ihres Wirtes, die in sehr unterschiedlichen Umgebungen auftreten, mehrfach entstanden sind (VONKEN *et al.*, 2002; TJADEN *et al.*, 2004). Dabei stammen Mitochondrien, Hydrogenosomen und Cryptosomen (Mitosomen) alle von einem ursprünglichen gemeinsamen vormitochondrialen Vorläufer ab. Bei den Hydrogenosomen werden zudem unterschiedliche Entstehungsformen angenommen. Zum einen existieren Hydrogenosomen, z.B. aus den Trichomonaden, die sich unabhängig von den Mitochondrien aus einem gemeinsamen vormitochondrialen Vorläufer entwickelt haben. Weiter konnten Hydrogenosomen identifiziert werden, die sich durch Adaption an die Umweltbedingungen des Wirtes aus klassischen Mitochondrien heraus entwickelt haben, und so mitochondriale Relikte darstellen. Ein Beispiel hierfür stellen die Hydrogenosomen des Chytridiomyceten *Neocallimastix N. spec.* dar (VONKEN *et al.*, 2002; TJADEN *et al.*, 2004).

Proteomanalysen bezüglich der Proteinkomposition von Hydrogenosomen und Mitosomen, die einen Vergleich der Organellen und eine evolutive Eingruppierung ermöglichen würden, existieren bis heute noch nicht. Dagegen konnte bereits durch Proteomanalysen von Mitochondrien gezeigt werden, dass nur noch 20% der mitochondrialen Gene von dem Vorläufer der Mitochondrien, dem α -Proteobakterium, stammen (GABALDON & HUYNEN, 2003, 2004). Weiter konnte ebenfalls festgestellt werden, dass Mitochondrien nicht nur in ihrer Größe und im Vorkommen, sondern auch in ihrer Proteinkomposition und Funktion sehr stark divergieren können (TIELENS *et al.*, 2002; GABALDON & HUYNEN, 2004). Neben dem dramatischen Verlust eines großen Teils des Genoms kommt erschwerend hinzu, dass die Mitochondrien eine große Vielzahl von zusätzlichen Proteinen dazugewonnen haben.

Die Entwicklung von ATP/ADP-Transportern kann als ein solch zusätzlich erworbenes Charakteristikum angesehen werden, dass eindeutig eukaryotischen Ursprungs ist und nicht vom α -Proteobakterium stammt (PALMIERI, 1994; WINKLER & NEUHAUS, 1999). ATP/ADP-Transporter (AACs) sind für alle derzeit bekannten Mitochondrien charakteristisch, weil durch den Energieaustausch erst die Endosymbiose etabliert werden konnte. Somit stellt die Entwicklung von ATP/ADP-Transportproteinen ein Schlüsselereignis in der Evolution der Mitochondrien dar. Da auch bestimmte Eukaryoten, im Besonderen die anaeroben amitochondrialen Organismen ebenso alternative bzw. „vormitochondriale“ ATP/ADP-Transporter besitzen, kann davon ausgegangen werden, dass sich diese parallel voneinander mehrfach entwickelt haben. Die Analyse der ATP/ADP-Transportproteine aus Mitochondrien, Hydrogenosomen und Cryptosomen (Mitosomen) könnte also die Frage nach dem evolutiven Ursprung der Organellen näher klären.

1.3 Übersicht über eukaryotische Adeninnukleotid-Transporter

In eukaryotischen Zellen konnten bereits vier verschiedene Gruppen von Adeninnukleotid-Transportern auf dem molekularen Level identifiziert werden.

Eine Gruppe stellen die bereits oben kurz erwähnten mitochondrialen ATP/ADP-Transporter (AACs) dar, die phylogenetisch in die Gruppe der MCF (mitochondrial carrier family) eingegliedert werden. Ihre funktionelle Bedeutung liegt im ATP-Export aus den Mitochondrien im strengen Gegentausch mit zytosolischem ADP (HAFERKAMP *et al.*, 2002).

Als erste Vertreter der AAC-Gruppe wurden die Proteine aus Tieren und Hefe umfangreich biochemisch untersucht (KLINGENBERG & PFAFF, 1969; PALMIERI *et al.*, 2000). Aus *Arabidopsis thaliana* konnten erst kürzlich drei pflanzliche mitochondriale AACs aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert und biochemisch charakterisiert werden, die zu den tierischen AACs eine starke Homologie aufweisen (HAFERKAMP *et al.*, 2002).

Weiter wurden innerhalb der MCF-Familie bereits zwei weitere Adeninnukleotid-Transportproteine identifiziert, die nicht in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert sind und auch phylogenetisch nicht in die „Untergruppe“ der klassischen mitochondrialen AACs eingruppiert werden, obwohl sie die für MCF-Mitglieder charakteristischen Merkmale aufweisen. Zum einen handelt es sich hierbei um den in den Peroxisomen lokalisierten ANT1p aus *Saccharomyces cerevisiae*. Es wird angenommen, dass dieser Transporter eine wichtige Rolle bei der peroxisomalen Fettsäuresynthese spielt und dafür ATP und AMP über die peroxisomale Membran transportiert (PALMIERI *et al.*, 2001).

Das zweite Transportprotein der MCF, welches nicht in der inneren Mitochondrienmembran sondern in der inneren Hüllmembran der Plastiden lokalisiert ist, stellt der Adeninnukleotid-Transporter StBT1 aus *Solanum tuberosum* dar. Im Gegensatz zu den anderen Nukleotid-Transportern der MCF katalysiert StBT1 einen Uniport der Substrate AMP, ADP und ATP, um das Zytosol und andere Kompartimente mit Adeninnukleotiden zu versorgen, die *de novo* exklusiv innerhalb der Plastiden synthetisiert werden (LEROCH *et al.*, 2005).

Die letzte Gruppe eukaryotischer Adeninnukleotid-Transporter stellen die plastidären ATP/ADP-Transporter (NTTs) dar. Sowohl in der Struktur als auch auf Proteinebene unterscheiden sich diese Transporter absolut von Proteinen der MCF. Dabei handelt es sich bei den NTTs um Monomere, die insgesamt 12 Transmembrandomänen besitzen und ein Molekulargewicht von ungefähr 60 kDa aufweisen. Die physiologische Funktion der NTTs besteht in der Versorgung der Plastiden mit Energie in Form von ATP um Stoffwechselprozesse wie z.B. die Stärke- und Fettsäuresynthese aufrecht zu erhalten (REISER *et al.*, 2004; TJADEN *et al.*, 1998). Dabei wird zytosolisches ATP im Gegentausch mit stromalem ADP in die Plastiden transportiert.

Neben den Adeninnukleotid-Transportern der MCF, die in den Plastiden und Peroxisomen lokalisiert sind konnte bereits in der Diplomarbeit von LEROCH (2003) ein weiterer putativer ATP/ADP-Transporter identifiziert werden, der zwar phylogenetisch den klassischen mitochondrialen AACs nahe steht, allerdings nicht in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert zu sein scheint. Dieses Transportprotein stammt aus *Arabidopsis thaliana* und stellt eine vierte Isoform (*AtER-ANT1*) zu den bereits

charakterisierten mitochondrialen AACs aus *Arabidopsis thaliana* dar (HAFERKAMP *et al.*, 2002). Subzelluläre Lokalisierungsstudien mittels AtER-ANT1-GFP-Fusion und anschließende transiente Expression des Proteins in Tabakprotoplasten indizierten eine mögliche Lokalisierung des AtER-ANT1 im Endoplasmatischen Retikulum.

1.4 Physiologische Funktion und Energiebedarf des Endoplasmatischen Retikulums

Strukturell ist das Endoplasmatische Retikulum (ER) ein in der Zelle stark verzweigtes Netzwerk aus Röhren und Zisternen, welches durch eine Membran das innere ER-Lumen vom Rest der Zelle abgrenzt. Dabei kann das Endoplasmatische Retikulum in zwei Formen auftreten.

Zum einen existiert das raue ER, welches an seiner Oberfläche mit Ribosomen besetzt ist und somit essentielle Funktionen bei der Translation, Proteinfaltung, posttranslationale Modifikationen und Transport von Transmembran- und sekretorischen Proteinen besitzt. Zusammen mit dem Golgi-Apparat werden Proteine zur Plasmamembran, Vakuole, sekretorischen Vesikeln und Lysosomen dirigiert und verteilt. Viele Sekretions- und Membranproteine tragen kovalent gebundene Kohlenhydratanteile, wobei beispielsweise bei Glykoproteinen die Oligosaccharide entweder durch N-glykosidische Bindung an Asparaginseitenketten oder durch O-glykosidische Bindung an Serin- und Threoninseitenketten gebunden vorliegen.

Neben dem rauhen ER gibt es außerdem das glatte Endoplasmatische Retikulum, welches von besonderer Bedeutung für die Synthese von Lipiden, Fettsäuren und Steroiden ist. Beispielsweise werden Triacylglycerine über das Endoplasmatische Retikulum gebildet, wobei diese bis zu 60% des Trockengewichtes in reifen Samen ausmachen können (WANNER *et al.*, 1992). Pflanzen, die fettreiche Samen besitzen, verwenden die in Lipidkörperchen (NAPIER *et al.*, 1996) eingelagerten Triacylglycerine als alleinige Kohlenstoff- und somit Energiequelle im Anfangsstadium der Samenkeimung.

Um die oben beschriebenen komplexen Prozesse des Endoplasmatischen Retikulums zu gewährleisten, ist ein hoher Bedarf an Energie notwendig. Adenosintriphosphat (ATP) stellt im zellulären Organismus eine solche universelle Energiequelle dar. Für den posttranslationalen Proteinimport, der über einen Importkomplex (bestehend aus Sec61p, Sec62p, Sec63p) verläuft, konnte bereits eine ATP-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Das zu der Hsp70-Familie gehörende Chaperon BiP (Binding Protein) stellt eine ATPase dar, die während dem posttranslationalen Proteinimport an die J-Domäne des Sec63p auf der ER-Lumenseite bindet und dabei zwei mögliche Funktionen besitzt (PANZER *et al.*, 1995; BODSKY & SCHECKMAN, 1993). Zum einen kann BiP als energieabhängiger Anker dienen, der durch das Binden an die importierte Polypeptidkette ein Herausrutschen der Kette verhindert, zum anderen könnte BiP aktiv, unter ATP-Verbrauch, die importierte Polypeptidkette durch den Translokationskomplex ziehen (MATLACK *et al.*, 1998). Neben BiP konnten bereits weitere ATP-abhängige Chaperone, die im ER-Lumen für eine korrekte Faltung von Proteinen sorgen nachgewiesen werden (GETHING & SAMBROOK, 1992; SIMONS *et al.*, 1995). Dabei stellen Chaperone im Allgemeinen sehr langsame ATPasen dar. Der ADP-Chaperon-Komplex besitzt eine sehr hohe Affinität für ungefaltete Polypeptidketten, nicht jedoch für native Proteine. Das Binden einer Peptidkette an ein Chaperon bewirkt die Freisetzung von ADP und den Eintritt von ATP in das aktive Zentrum des Komplexes. Der ATP-Chaperon-Komplex setzt daraufhin das Polypeptid

wieder frei. Durch die Hydrolyse des ATP ist das Chaperon dann wieder in der Lage eine neue Polypeptidkette zu binden. Da sowohl die Ladung und die Größe von Nukleotiden eine freie Diffusion über biologische Membranen (KLINGENBERG, 1989) verhindert, ist das Vorhandensein eines ATP-Transportproteins, welches den Import von cytosolischem ATP in das ER-Lumen katalysiert, absolut essentiell.

Ein ATP-Transport über die Membran des Endoplasmatischen Retikulums in Hefe konnte bereits durch die Rekonstitution von ER-Mikrosomen nachgewiesen werden. Die Studien zeigten, dass es sich bei diesem Transport um einen Gegentauschmechanismus von ATP gegen ADP handelt. Die Bestimmung der Substrataffinität erwies eine hohe ATP-Transportaffinität von ungefähr 10 μM . Sowohl der Transportmodus als auch die biochemischen Charakteristika ähneln den biochemischen Eigenschaften der klassischen mitochondrialen AACs (MAYINGER *et al.*, 1995; HAFERKAMP *et al.*, 2002).

Neben dem ATP-Transport in das ER von Hefe konnte außerdem ein ATP-Transport in ER-Mikrosomen aus Säugerzellen beobachtet werden (CAPASSO *et al.*, 1989; CLAIRMONT *et al.*, 1992). Obwohl bereits der ATP-Transport in das Endoplasmatische Retikulum in den verschiedensten Organismen gezeigt werden konnte, sind die korrespondierenden Proteine bzw. Gene auf dem molekularen Level bisher noch völlig unbekannt.

1.5 Ziele der vorliegenden Dissertation

Wie bereits oben beschrieben, konnten in *Arabidopsis thaliana* drei mitochondriale ATP/ADP-Transporter identifiziert werden. Diesen drei Isoformen konnten nach heterologer Expression im *E. coli*-System sehr ähnliche biochemische Funktion zugewiesen werden. Das heterologe *E. coli*-Expressionssystem hat sich neben der Charakterisierung von mitochondrialen Proteinen zudem für die Analyse von bakteriellen und plastidären Transportproteinen erfolgreich bewährt (HAFERKAMP *et al.*, 2002; TJADEN *et al.*, 1998). Mit Hilfe des *Arabidopsis*-Genoms konnten während der Diplomarbeit von LEROCH (2003) zwei weitere putative Isoformen, AAC4 (*AtER-ANT1*) und AAC5, in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Dabei zeigten Lokalisierungsstudien über GFP-Fusion mit anschließender transienter Expression der zu untersuchenden Proteine in Tabakprotoplasten eine mögliche subzelluläre Lokalisierung von *AtER-ANT1* im Endoplasmatischen Retikulum. Für AAC5 konnte eine putative Lokalisierung in den Mitochondrien gezeigt werden. Die biochemische Funktion von *AtER-ANT1* und AAC5 konnte im Rahmen der Diplomarbeit von LEROCH 2003 nicht geklärt werden.

Ein zentraler Fokus der vorliegenden Dissertation stellte die umfangreiche Analyse und Charakterisierung der vierten AAC-Isoform *AtER-ANT1* aus *Arabidopsis thaliana* dar. Dazu sollte mittels heterologer Expression von *AtER-ANT1* in *E. coli* geklärt werden, ob es sich bei diesem Transportprotein ebenfalls um einen ATP/ADP-Transporter handelt, oder ob diese Isoform andere biochemische Eigenschaften im Vergleich zu den klassischen mitochondrialen AACs aufweist. Weiter sollte die subzelluläre Lokalisierung dieses Proteins genau untersucht werden. Für eine detaillierte Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von *AtER-ANT1* wurden in dieser Arbeit weitere Methoden angewandt. Unter anderem wurden Studien mit dem *AtER-ANT1*-GFP-Konstrukt mittels transienter Expression in Tabakprotoplasten,

sowie *in vitro* Translationsexperimente mit Targetingstudien in isolierte ER-Mikrosomen und die Analyse der AtER-ANT1-Lokalisierung durch die Herstellung von transgenen AtER-ANT1-c-Myc-Tag Pflanzen durchgeführt. Bei diesen transgenen Pflanzen sollte durch eine Überexpression von AtER-ANT1 und Fusion des Proteins mit einem c-terminalen Myc-Tag eine detaillierte Untersuchung der Lokalisierung des Proteins *in planta* über einen spezifischen Myc-Tag Antikörper ermöglicht werden. Des Weiteren sollte die putative physiologische Rolle des AtER-ANT1 für den pflanzlichen Metabolismus bestimmt werden. Dabei dienten AtER-ANT1-Promotor-GUS-Pflanzen zur Untersuchung der gewebespezifischen und entwicklungsabhängigen Expression dieses Gens. Zudem wurden im Rahmen dieser Arbeit homozygote Knockout-Linien bezüglich des AtER-ANT1-Gens umfassend analysiert, um die physiologische Einbindung von AtER-ANT1 in den pflanzlichen Stoffwechsel detailliert aufzuzeigen.

Durch die Veröffentlichung des Reis-Genoms, konnte in der monokotyledonen Pflanzen *Oryza sativa* ebenso ein Transportprotein (OsER-ANT1) identifiziert werden, das zu AtER-ANT1 homolog ist. Auch dieser Transporter wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation biochemisch und molekularbiologisch charakterisiert.

Das dritte zentrale Thema der hier vorliegenden Dissertation beschäftigte sich mit der Frage, weshalb in Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana* mindestens drei AAC-Isoformen existieren. Die biochemische Analyse dieser Proteine im *E. coli*-System zeigte sehr ähnliche biochemische Charakteristika für alle drei AAC-Isoformen (HAFERKAMP *et al.*, 2002), so dass hiermit die physiologische Bedeutung für das Vorhandensein von drei Isoformen noch nicht geklärt werden konnte. In Hefe konnte bereits nachgewiesen werden, dass die verschiedenen mitochondrialen AACs in Abhängigkeit des Stoffwechsels exprimiert werden (KOLAROV *et al.*, 1990). Weiter konnte für AAC-Isoformen aus Rind, Ratte und Mensch eine gewebespezifische Expression festgestellt werden (POWELL *et al.*, 1989; LI *et al.*, 1989). In den Arbeiten von HAFERKAMP (2003) und von GERHOLD (2004) konnte mit Hilfe von Promotor-GUS-Fusionskonstrukten und Microarray-Analysen (Genevestigator) bezüglich der drei klassischen AAC-Isoformen in *Arabidopsis thaliana* eine unterschiedliche gewebespezifische Expression der drei untersuchten Proteine gezeigt werden. Dabei wurde deutlich, dass AtAAC1 eine im Vergleich zu AAC2 bzw. AAC3 sehr omnipräsente Expression in allen pflanzlichen Geweben und Entwicklungszuständen aufweist. AAC2 und AAC3 hingegen schienen sehr entwicklungspezifisch exprimiert zu werden. Bei AAC2 zeigte sich eine erhöhte Expression in der Blüte, wobei AAC3 besonders während der Seneszenz von physiologischer Bedeutung zu sein scheint. Zur näheren Analyse der physiologischen Rolle dieser Proteine wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht, homozygote Knockout-Linien bezüglich der einzelnen AAC-Isoformen zu züchten, um möglicherweise genauere Aussagen über die Existenz mehrerer AAC-Isoformen in *Arabidopsis* machen zu können.

Neben der umfassenden Charakterisierung der Transportproteine AtER-ANT1 und OsER-ANT1 sowie der Analyse der physiologischen Bedeutung für das Vorhandensein von drei klassischen mitochondrialen AACs in *Arabidopsis thaliana* ist die Charakterisierung von ATP/ADP-Transportproteinen aus evolutiv sehr interessanten Protisten ein weiterer Schwerpunkt dieser Dissertation.

Die Untersuchung von ATP/ADP-Transportern aus Protisten ist besonders im Hinblick auf die Analyse des Ursprunges von Mitochondrien, Hydrogenosomen und Cryptosomen (Mitosomen) bzw. der evolutiven Beziehung zueinander von besonderem Interesse. Dabei konnten bereits ein klassischer AAC in dem Hydrogenosomen-tragenden Organismus *Neocallimastix*, sowie ein alternativer

hydrogenosomaler ATP/ADP-Transporter aus *Trichomonas gallinae* identifiziert und biochemisch - unter Verwendung des heterologen *E. coli*-Expressionssystems - charakterisiert werden (VONKEN *et al.*, 2002; HAFERKAMP *et al.*, 2002; TJADEN *et al.*, 2004). In dem Mitosomen-tragenden Protisten *Entamoeba histolytica* konnte in der Diplomarbeit von LEROCH (2003) eine Sequenz identifiziert werden, die für einen ATP/ADP-Transporter codiert (*EhANT1*). *Entamoeba histolytica* ist ein extrazellulär lebender Protist, der sich im Lumen des menschlichen Dickdarmes einnistet und der Erreger der Amöbenruhr ist. Der Organismus zeichnet sich weiter durch einen obligat fermentativen Stoffwechsel aus, der sich stark von Mitochondrien- oder Hydrogenosomen-tragenden Organismen unterscheidet (REEVES, 1984; MÜLLER, 1993; BAKER-GRUNWALD & WOSTMANN, 1993). In der Diplomarbeit von LEROCH (2003) konnte bereits ein ATP/ADP-Transporter durch heterologe Expression des *EhANT1* im *E. coli*-Stamm BL21 nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Aufnahmeexperimente mit dem verwendeten Expressionsstamm BL21 als sehr schwierig bzw. instabil erwiesen, wurde im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation eine umfassende biochemische Charakterisierung des ATP/ADP-Transporters mit einem für *EhANT1* besser geeigneten *E. coli*-Expressionsstamm (C43) angestrebt. Die neuen Daten könnten die Entwicklung der Mitosomen im Vergleich zur Mitochondrien- und Hydrogenosomenentwicklung näher erklären.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Dissertation folgende Fragestellungen geklärt:

- Handelt es sich bei *AfER-ANT1* um einen ATP/ADP-Transporter und unterscheidet er sich in seinen biochemischen Charakteristika von denen der klassischen mitochondrialen AACs aus *Arabidopsis thaliana*?
- Ist *AfER-ANT1* innerhalb der Zelle subzellulär in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert?
- Wird *AfER-ANT1* gewebespezifisch und/oder entwicklungsabhängig exprimiert und welche physiologische Funktion besitzt dieses Transportprotein im pflanzlichen Stoffwechsel?
- Existieren Proteine, die zu *AfER-ANT1* homolog sind und wie unterscheiden sie sich?

- Warum existieren in pflanzlichen Mitochondrien mehrere klassische ATP/ADP-Transportproteine, die sich biochemisch nicht voneinander unterscheiden?
- Besitzen diese Isoformen eine unterschiedliche physiologische Relevanz?

- Welche biochemischen Eigenschaften besitzt der mitosomale ATP/ADP-Transporter aus dem Protisten *Entamoeba histolytica*?
- Unterscheiden sich die biochemischen Charakteristika von hydrogenosomalen und mitochondrialen ATP/ADP-Transportproteinen?
- Was bedeuten die neuen Erkenntnisse für die Entstehungsgeschichte der Cryptosomen (Mitosomen)?

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzen

Arabidopsis thaliana Wildtyp-Pflanzen (Ecotyp: Columbia) sowie *Arabidopsis* Knockout-Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen in Klimakammern (22°C) angezogen. Dabei wurde ED73 Erde, die mit einem Langzeitdünger versetzt ist, verwendet. Um die Pflanzen vor Insektenbefall zu schützen wurden diese zeitweise mit in Wasser gelöstem Confidor (50 mg/l) gegossen. Zur Blühinduktion wurden die Pflanzen in Klimakammern (22°C) unter Langtagbedingungen gestellt.

Die Anzucht von *Oryza sativa* Wildtyp-Pflanzen erfolgte in den Gewächshäusern der TU Kaiserslautern.

2.1.1 Pflanzenanzucht unter sterilen Bedingungen

Für nähere Analysen von *Arabidopsis thaliana* Knockout-Pflanzen war es manchmal notwendig, die Pflanzen unter sterilen Bedingungen auf MS-8 bzw. MS-2 Medium auszusäen. Eine Oberflächensterilisation konnte durch eine Behandlung der Samen mit EtOH (70%), Natriumhypochlorid (12%) und anschließendem Waschen in sterilem H₂O erreicht werden.

Um eine gleichzeitige Keimung der Samen zu gewährleisten, erfolgte eine Inkubation der Platten für zwei Tage bei 4°C.

MS-8 Medium:

2,2 g/l	Murashige & Skoog Medium (incl. Vitamine)
1% (w/v)	Saccharose
0,05% (w/v)	MES
0,5-1,5% (w/v)	Agar (pH 7,5 mit KOH)

MS-2 Medium:

4,4 g/l	Murashige & Skoog Medium (incl. Vitamine)
2% (w/v)	Saccharose
0,05% (w/v)	MES
0,5-1,5% (w/v)	Agar (pH 5,7 mit KOH)

Für die Isolierung von Protoplasten aus Tabakpflanzen wurden Wildtyp-Tabakpflanzen (W38) auf MS-2 Medium nach MURASHIGE & SKOOG (1962) in Magenta-Plastikboxen der Firma Sigma unter sterilen Bedingungen angezogen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Bakterienstämme und Plasmide

In Tabelle 2.1 sind die Bakterienstämme gezeigt, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die *E. coli*-Stämme XL1blue und XL10gold wurden dabei für rekombinante DNA-Techniken verwendet, wohingegen die Stämme BL21 und C43 zu heterologen Expressionsstudien von Transportproteinen dienten. Mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* konnten transgene *Arabidopsis thaliana* Pflanzen hergestellt werden.

Tabelle 2.1 Bakterienstämme

Stamm	Resistenz	Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i> XL1blue	Tet ^r	Klonierung	BULLOCK <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> XL10gold	Tet ^r	Klonierung	BULLOCK <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> BL21	Clm ^r	heterologe Expression	MIROUX & WALKER, 1996
<i>E. coli</i> C43	—	heterologe Expression	MIROUX & WALKER, 1996
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Gent ^r , Rif ^r	Transformation <i>A.thaliana</i>	KONCZ & SHELL, 1987

In Tabelle 2.2 wurden alle verwendeten bzw. konstruierten Plasmide zusammengefasst.

Tabelle 2.2 Plasmide

Plasmid	relevante Merkmale	Referenz
pBSK	Amp ^r , Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
pET16b	Amp ^r , Expressionsvektor	Novagen, Heidelberg
pART27	Kan ^r , Spec ^r , Strep ^r , binärer Pflanzentransformationsvektor	GLEAVE <i>et al.</i> , 1992
pA35	Amp ^r , Zwischenvektor für Agrobakterien-Transformation; CaMV-35-S-Promotor, OCS Terminator	Prof. Antje von Schaewen
pDE1001	Amp ^r , Spec ^r , Pflanzentransformationsvektor	Novagen, Heidelberg
pHannibal	Amp ^r , Klonierungsvektor	GLEAVE <i>et al.</i> , 1992
pGPTV	Kan ^r , Basta-Resistenz, GUS-Reportergen, Pflanzentransformationsvektor	BECKER, 1992
pGFP2	Amp ^r , Pflanzentransformationsvektor, CaMV-35S-Promotor	WENDT <i>et al.</i> , 2000
pBIN	Kan ^r , Pflanzentransformationsvektor; pGFP5 mit ER-Kontrolle	Prof. Antje von Schaewen
pVDAC	Amp ^r , Pflanzentransformationsvektor; pGFP2 mit Mitochondrienkontrolle	WORMIT <i>et al.</i> , 2004
pLeSUT	Amp ^r , Pflanzentransformationsvektor; pGFP2 mit Plasmamembrankontrolle	WORMIT <i>et al.</i> , 2004
pAAC4pro	Promotor ER-ANT1 <i>A.t.</i> in pGPTV (GUS-Konstrukt)	HAFERKAMP, 2003
pM23	ER-ANT1 <i>A.t.</i> in pGFP2	LEROCH, 2003
pM24	AAC1 <i>A.t.</i> in pGFP2	LEROCH, 2003
pM58	ANT <i>E.h.</i> in pET16b, N-terminaler His-tag	LEROCH, 2003
pM84	ER-ANT1 <i>A.t.</i> in pBSK, T3-Orientierung, für <i>in vitro</i> -Translation	diese Arbeit
pM104	AAC1 <i>A.t.</i> in pBSK, T3-Orientierung, für <i>in vitro</i> -Translation	diese Arbeit
pM100	AAC5 <i>A.t.</i> in pBSK, T7-Orientierung, für Promotor-GUS-Fusion	diese Arbeit
pM110	AAC5 <i>A.t.</i> in pGPTV, Promotor-GUS-Fusionskonstrukt	diese Arbeit
pM70	<i>At</i> ER-ANT1 in pA35 für Antisense-Klonierung	diese Arbeit
pM71	<i>At</i> ER-ANT1 in pDE1001 in Antisense-Orientierung; Konstrukt für Agrobakterientransformation	diese Arbeit
pM112	ER-ANT1 <i>A.t.</i> in pBSK, T7-Orientierung, mit c-terminalem Myc-tag	diese Arbeit
pM118	ER-ANT1 <i>A.t.</i> in pHannibal mit c-terminalem Myc-tag	diese Arbeit
pM119	ER-ANT1 <i>A.t.</i> in pART mit c-terminalem Myc-tag	diese Arbeit
pM113	ANT1 <i>O.s.</i> in pBSK, T3-Orientierung, Konstrukt für pET16b Klonierung	diese Arbeit
pM114	ANT1 <i>O.s.</i> in pET16b, heterologe Expression	diese Arbeit
pM119	ER-ANT1 <i>A.t.</i> in pBSK, T3-Orientierung, mit His-tag, für pET16b	diese Arbeit

Plasmid	relevante Merkmale	Referenz
pM120	ER-ANT1 A.t. in pBSK, T7-Orientierung, mit His-tag, für pET16b	diese Arbeit
pM121	ER-ANT1 A.t. in pBSK, T3-Orientierung, ohne His-tag, für pET16b	diese Arbeit
pM122	ER-ANT1 A.t. in pBSK, T7-Orientierung, ohne His-tag, für pET16b	diese Arbeit
pM123	ER-ANT1 A.t. in pET16b, ohne His-tag	diese Arbeit
pM124	ER-ANT1 A.t. in pET16b, mit His-tag	diese Arbeit

2.2.2 Anzuchtbedingungen für Bakterien

Die *E. coli*-Zellen wurden bei 37°C unter aeroben Bedingungen entweder in sterilem YT-Vollmedium oder TB-Vollmedium (SAMBROOK *et al.*, 2001) angezogen.

YT-Medium:

0,8% (w/v)	Pepton
0,5% (w/v)	Hefe-Extrakt
0,25% (w/v)	NaCl, pH 7,0
[1,5% (w/v) Agar für Agarplatten]	

TB-Medium:

1,2% (w/v)	Pepton
2,4% (w/v)	Hefe-Extrakt
0,4% (v/v)	Glycerin

Nach dem Autoklavieren wurde das TB-Medium mit sterilem Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 im Verhältnis 9:1 versetzt. In allen Versuchen wurde dem TB-Medium zusätzlich 10 mM Pyruvat und 10 mM Malat hinzugefügt.

Durch Zugabe entsprechender Antibiotika wurden geeignete Selektionsmedien hergestellt (Tabelle 2.3). Zur Aufbewahrung der selektionierten Bakterienklone wurden diese bei -70°C in Flüssigkultur mit 15% (v/v) Glycerin gelagert.

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika-Konzentrationen für *E. coli*

Antibiotikum	Stocklösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	100,0 [50% EtOH]	200,0
Tetrazyklin	5,0 [50% EtOH]	10,0
Kanamycin	12,5 [H ₂ O]	25,0
Chloramphenicol	12,5 [100% EtOH]	12,5
Rifampicin	20,0 [100% MeOH]	20,0

Im Gegensatz zu *E. coli* wurden *A. tumefaciens* Zellen bei 30°C angezogen. Folgende Tabelle zeigt die entsprechenden Antibiotikakonzentrationen die zur Herstellung geeigneter Selektionsmedien verwendet wurden.

Tabelle 2.4: Verwendete Antibiotika-Konzentrationen für *A. tumefaciens*

Antibiotikum	Stocklösung [mg/ml]	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Gentamycin	25,0 [H ₂ O]	25,0
Spectinomycin	50,0 [H ₂ O]	100,0
Streptomycin	150,0 [H ₂ O]	300,0
Rifampicin	20,0 [100% MeOH]	20,0

2.2.3 Oligonukleotide

Tabelle 2.5 zeigt die Oligonukleotide, die in dieser Arbeit zum einem für DNA-Amplifikation und zum anderen für Sequenzierungen verwendet wurden. Die Oligonukleotide wurden kommerziell von den Firmen MWG Biotech, Genaxis bzw. Invitrogen synthetisiert.

Tabelle 2.5: Verwendete Oligonukleotide

Eingefügte Restriktionsschnittstellen sind durch den Schriftstil „**bold**“ hervorgehoben, Veränderungen von der Ursprungssequenz sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet, s=sense, as=antisense

Oligonukleotide	Sequenz 5'→3'	Verwendung/Klonierung
T3 Promotor Primer	AATTAACCCTCACTAAAGGGA	Sequenzierung (Stratagene)
T7 Promotor Primer	GTAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung (Stratagene)
M13;s	GTA AACGACGGCCAGT	Sequenzierung
M13;as	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung
GUS;as	ATCCAGACTGAATGCCACAGG	Sequenzierung
GFP-seq	ATCACCTTCACCTCTCCA	Sequenzierung
Myc;s	GGTTCCTTAGAGGGAACTTC	Light-Cycler <i>AfER-ANT1</i> Myc-Tag Pflanzen
Myc;as	CTTCAGAGATGAGTTTCTGCTC	Light-Cycler <i>AfER-ANT1</i> Myc-Tag Pflanzen
M39(NdeI);s	GTGAGGGAAAAG catATGG CTTTGATCG	<i>AfER-ANT1</i> pET16b Klonierung mit His-Tag (pM124)
M40(NcoI);s	GTGAGGGAAAAG AccATGG CTTTGATCG	<i>AfER-ANT1</i> pET16b Klonierung ohne His-Tag (pM123)
HA28;as	GGATTATTGATATAACAATGTTACTGCAC	<i>AfER-ANT1</i> pET16b Klonierung mit/ohne His-Tag (pM122/pM123)
HA54;s	GTGAGGGAAAAGACCATGGCTTTGACTG	<i>AfER-ANT1</i> c-Myc-Tag Klonierung (pM119)
M35;as	TCCTACAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGC TCCTGAACCCAATGCTTATAAGCAATCTGGTGA AGCTG	<i>AfER-ANT1</i> c-Myc-Tag Klonierung (pM119)
SK1(NdeI);s	GAATCCGCCGTCG cAtATG CCATCCG	<i>Os-ANT1</i> pET16b Klonierung mit His-Tag (pM114)
SK2;as	TCCAACTTCAACCAAGGATATGCCTC	<i>Os-ANT1</i> pET16b Klonierung mit His-Tag (pM114)
TLP-4;s	CAGGAGTGCTTGCGGGATATG	<i>AfER-ANT1</i> Knockout-Screening
TRP-4;as	TGGTTTGGGTAATTGCTTACCAG	<i>AfER-ANT1</i> Knockout-Screening

Oligonukleotide	Sequenz 5'→3'	Verwendung/Klonierung
LBb-1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	T-DNA-spezifischer Primer zum Screening von <i>A.thaliana</i> Knockout-Pflanzen
HA54	GTGAGGGAAAAGACCATGGCTTTGACTG	<i>AtER-ANT1 in vitro</i> -Translationskonstrukt (pM84)
HA59	GATTGATGCCTCGAGGGGATATAC	<i>AtAAC1 in vitro</i> -Translationskonstrukt (pM104)
M48;s	TAGGCCTTGAACCTTGCCTTC	<i>AtAAC1</i> Knockout-Screening Linie1
M47;as	TCCAAAATTCTTTAAAATCGAAGAG	<i>AtAAC1</i> Knockout-Screening Linie1
M45;s	AACATCTCAGTTTATTGCGGG	<i>AtAAC1</i> Knockout-Screening Linie2
M46;as	AAACTGCCAATGTTATCCG	<i>AtAAC1</i> Knockout-Screening Linie2
M49;s	TGCTTTGCTTAAAGTCCGATC	<i>AtAAC1</i> Knockout-Screening Linie3
M50;as	AGGGCAAAGTTCAAGGCCTAC	<i>AtAAC1</i> Knockout-Screening Linie3
M52	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	<i>AtAAC2</i> Knockout-Screening Gaby-Linie T-DNA-spezifisch
M51;s	GAGCAAACTAGCGAAGAACTGT	<i>AtAAC2</i> Knockout-Screening
HA13;as	TGTAGAGGTTTCATATGGTTGAACAGACTC	<i>AtAAC2</i> Knockout-Screening
TLP-3;s	TTGGTGCAACGATTACAGAGG	<i>AtAAC3</i> Knockout-Screening
TRP-3;as	ACATCTCATGCGTTGGAATTG	<i>AtAAC3</i> Knockout-Screening
TLP-5;s	GCTGCTGGTTGTAAGTCTTTG	<i>AtAAC5</i> Knockout-Screening
TRP-5;as	CAAGAAAGTGGGTCTGTCCAA	<i>AtAAC5</i> Knockout-Screening
M33;s	TAGGGATTTATCATCTTCTTGTCCATTTGGAGC	<i>AtAAC5</i> Promotor GUS-Fusionskonstrukt (pM110)
M34(SmaI);as	GATTCCTTCGAT CCCGGG ATGGATCTTCTTCG	<i>AtAAC5</i> Promotor GUS-Fusionskonstrukt (pM110)
M18;s(XbaI)	GGACCCG TCTAGAC ACTGATG	<i>AtER-ANT1</i> Antisense Klonierung
M19;as(BamHI)	CTACTGAAC CGGATCC TATAAGC	<i>AtER-ANT1</i> Antisense Klonierung

2.2.4 Rekombinante DNA-Techniken

2.2.4.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung hitzekompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach HANNAHAN (1983). Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurde eine 200 ml Kultur in ψ B-Medium unter selektiven Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Die Ernte der Zellen erfolgte nach zehnmütiger Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift in 10%igem Glycerin, wonach die Zellen anschließend in 1,5 ml 10% (v/v) Glycerin (steril) aufgenommen wurden.

Die *E. coli*-Zellen wurden abschließend in 40 μ l Aliquots aufgeteilt und bei -70°C gelagert oder aber direkt für die Transformation mittels Elektroporation (siehe Kapitel 2.2.4.2) eingesetzt.

ψ B-Medium:

0,5% (w/v)	Hefe-Extrakt
2% (w/v)	Bactopepton
0,4% (w/v)	MgSO ₄
10 mM	KCl

2.2.4.2 Herstellung kompetenter *A.tumefaciens*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *A.tumefaciens*-Zellen wurden 2 ml einer Übernachtskultur in 200 ml YEB-Medium (mit Rifampicin) unter aeroben Bedingungen bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Nach Waschen der Zellen in TE-Puffer wurden die Zellen in 5 ml YEB-Medium resuspendiert und anschließend in 500 µl Aliquots bei -70°C bis zur Transformation gelagert.

YEB-Medium:

0,5% (w/v)	Beef-Extrakt
0,1% (w/v)	Hefe-Extrakt
0,5% (w/v)	Pepton
2 mM	MgSO ₄
[1,5% (w/v)	Agar für Platten)

TE-Puffer:

10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
1 mM	EDTA

2.2.4.3 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock oder Elektroporation

Bei der Transformation von Zellen durch Hitzeschock wurde ein 200 µl-Zellaliquot 10 min auf Eis aufgetaut, die zu transformierende DNA vorsichtig hinzupipettiert und dieser Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgte durch anschließende Inkubation der Zellen in einem 42°C Wasserbad für 90 Sekunden. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen 5 min auf Eis abgekühlt, 1 ml ψB-Medium hinzugefügt, für 1,5 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert und abschließend auf antibiotikahaltigen YT-Platten ausplattiert.

Für die Transformation der *E. coli*-Zellen durch Elektroporation wurde ein „*E. coli*-Pulser“ der Firma Biorad (München) verwendet. Zu den *E. coli*-Zellen wurden maximal 50 ng Plasmid-DNA gegeben. Dieser Ansatz wurde daraufhin einem Stromimpuls von ungefähr 9 ms mit einer Spannung von 2,5 kV ausgesetzt. Zur Regeneration wurden die Zellen in 0,8 ml ψB-Medium für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es folgte das Ausplattieren auf selektiven YT-Platten.

2.2.4.4 Transformation von *A. tumefaciens* Zellen

Um *A. tumefaciens* Zellen zu transformieren wurde ein Zellaliquot auf Eis aufgetaut und anschließend 0,5-2 µg zu transformierende DNA hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert und daraufhin in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufnahme der Fremd-DNA erfolgte durch schnelles Erhitzen der Zellen auf 37°C. Weiter wurde zu den Zellen 1 ml YEB-Medium gegeben und der gesamte Ansatz für 4-6 Stunden bei 30°C inkubiert. Abschließend konnten die Zellen durch Ausplattieren auf antibiotikahaltigen Agarplatten selektiert werden. Die erhaltenen Transformanten wurden mehrfach vereinzelt, um mögliche „cross-feeding“ Reaktionen ausschließen zu können.

2.2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte nach SAMBROOK *et al.* (2001) und wurde in horizontalen Gelapparaturen bei konstanter Spannung (80-120 V) durchgeführt.

Abhängig von der zu trennenden Größe der Moleküle wurden 0,8-2%ige Agarose-Gele hergestellt. Dazu wurde die Agarose in 1-fach TAE-Puffer gekocht, unter Rühren auf ca. 50°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml), das in die DNA interkaliert, versetzt. Das Ethidiumbromid fluoresziert unter UV-Licht ($\lambda=260$ nm) orange. Die Lösung wurde anschließend in eine Gelkammer mit Taschenformer gegossen. Zu trennende DNA-Proben wurden zuvor mit 10-fach TAE-Ladepuffermedium für den Gellauf vorbereitet. Als Größenstandard diente PstI verdaute λ -DNA, die von der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Roth bezogen wurde.

50x TAE-Puffer:

242 g	Tris-HCl (pH8,5)
57,1 ml	Eisessig
500 mM	EDTA
ad 1l mit H ₂ O	

2.2.4.6 *In vitro* Manipulation von DNA

Unter *in vitro* Manipulation von DNA wird das gezielte Schneiden der DNA mit spezifischen Restriktionsendonukleasen und darauf folgend das kontrollierte Zusammenfügen einzelner DNA-Fragmente durch Ligation verstanden.

Die DNA-Restriktion wurde sowohl zur Klonierung von Vektor-DNA als auch zur Analyse von Konstrukten aus Vektor- und Fremd-DNA eingesetzt. Für den Restriktionsansatz wurden die von den Herstellern (MBI Fermentas, NEB) angegebenen Puffermedien und Inkubationstemperaturen verwendet. Die geschnittene DNA wurde daraufhin mittels Agarose-Gelelektrophorese nach Fragmentgröße aufgetrennt und das gesuchte Fragment mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte unter Verwendung des Gelextraktionskits „NucleoSpin Extract II“ von Macherey & Nagel.

Bei der Ligation handelt es sich um das gezielte Zusammenfügen bestimmter DNA-Fragmente durch Einsatz der T4-DNA-Ligase. Dieses Enzym hat die Eigenschaft die kovalente Verknüpfung komplementärer DNA-Enden zu katalysieren. So kann die Ligase — nach Restriktion eines Vektors und eines spezifischen Fragmentes mit den gleichen Restriktionsenzymen — den Vektor mit dem spezifischen DNA-Fragment kovalent über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpfen.

In dieser Arbeit wurden T4-DNA-Ligasen der Firma Gibco, MBI Fermentas und Invitrogen jeweils nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.4.7 Plasmidpräparation aus *E. coli*-Zellen

Um Plasmide aus *E. coli* zu isolieren wurde in dieser Arbeit die Methode der alkalischen Lyse verwendet, bei der eine Isolierung aufgrund der unterschiedlichen Präzipitationseigenschaften von Plasmid-DNA, chromosomaler *E. coli*-DNA, Proteinen sowie RNA möglich ist (BIRNBOIM & DOLY, 1979; SAMBROOK *et al.*, 2001). Zur Isolierung besonders reiner Plasmid-DNA, die zum Beispiel für Sequenzierungen oder Protoplastentransformation notwendig ist, wurde das „QIAprep-spin-Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

Für alle weiteren Verwendungszwecke wurde die Plasmid-DNA im Prinzip nach der „QIAprep-spin-Kit“-Methode isoliert, mit dem Unterschied, dass die Plasmid-DNA nicht über Säulen, sondern über eine Isopropanolfällung mit Waschen des DNA-Pellets in 70%igem Ethanol und abschließender Elution des DNA-Pellets mit H₂O gewonnen wurde.

2.2.4.8 Plasmidpräparation aus *A. tumefaciens* Zellen

Die Plasmidisolierung aus *A. tumefaciens* Zellen erfolgte ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (BIRNBOIM & DOLY, 1979). Es wurde dabei das gleiche Protokoll wie für *E. coli* verwendet, mit dem Unterschied, dass dem ersten Puffer (P1, siehe „QIAprep-spin-Kit“) noch zusätzlich Lysozym zugesetzt wurde um die Zelllyse zu vereinfachen.

2.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA und Poly-A⁺-mRNA aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* wurde das „RNA-Easy-Plant-Kit“ der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Um die RNA vor Ribonukleasen zu schützen wurde während der Isolierung mit sterilen und gut gekühlten Geräten gearbeitet. Mit Hilfe des „OligoTex-Kits“ der Firma Qiagen wurde nach Herstellerangaben aus der Gesamt-RNA die Poly-A⁺-mRNA aus *Arabidopsis thaliana* bzw. *Oryza sativa* präpariert.

2.2.6 Herstellung des 1. Strang cDNA aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*

Zur Herstellung der komplementären DNA (cDNA) aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* diente zuvor isolierte Poly-A⁺-mRNA als Ausgangstemplate. Unter Einsatz des Enzyms Superscript^{II} der Firma Gibco konnte die mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Zur cDNA-Herstellung wurden 17 µl der synthetisierten mRNA zu 3 µl Oligo(dT)-Primer-Mix (100 µM) gegeben, dieser Ansatz 10 min bei 70°C inkubiert, kurz abgekühlt, anzentrifugiert und Folgendes hinzugefügt:

- + 3 µl 0,1 M DTT
- + 6 µl Superscript^{II}-Puffer (5x)
- + 1,5 µl dNTPs (10 mM)

Dieser Ansatz wurde für 2 min bei 42°C inkubiert, worauf 1,5 µl (2U) Superscript^{II} dazugegeben wurden. Es folgte eine Inkubation über 50 min bei 42°C und eine Denaturierung des Enzyms durch Inkubation des Ansatzes bei 70°C für 15 min.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt eine effiziente Methode zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte dar. Für die Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen werden zwei Oligonukleotide (siehe Tabelle 2.5) benötigt, der „sense“- und der „antisense“-Primer.

Ein Standard-PCR-Ansatz setzt sich bei einem Gesamtvolumen von 50 µl aus 200 µM dNTPs, je 50 pmol Primer („sense“ und „antisense“), 10-50 ng Template-DNA, und 2 Units DNA-Polymerase zusammen. Die PCR-Reaktionen wurden in den vom Hersteller vorgesehenen Puffermedien durchgeführt. Zur Optimierung von PCR-Reaktionen und Sequenzanalysen wurde die *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Nach

Optimierung der PCR und für Klonierungszwecke wurde die *Pfu*-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Pyrococcus furiosus* (Stratagene, Heidelberg) stammt, benutzt. Die *Pfu*-Polymerase zeichnet sich im Vergleich zur *Taq*-Polymerase durch eine geringere Fehlerquote bei der Amplifizierung aus.

Die DNA-Amplifizierung wurde nach folgendem Programm in einem TRIO-Thermoblock TB1 (Biometra, Göttingen) durchgeführt:

„Hot-Start“ innerhalb der ersten	5 min	94°C (bei <i>Pfu</i> -Polymerase)	
Denaturierung	0,5-1,5 min	94°C	} 45 Zyklen
Anlagerung der Primer	1-1,5 min	42-60°C	
Strangverlängerung	3-7,30 min	72°C	
Abschlussverlängerung	5 min	72°C	
	∞	4°C	

Die gewählte Annealing-Temperatur ist dabei von der Schmelztemperatur der jeweils verwendeten Oligonukleotide abhängig.

2.2.8 Quantitative RT-PCR

Die Methode der quantitativen RT-PCR kann dazu genutzt werden um die relative Transkriptmenge eines bestimmten Gens zu untersuchen. So kann zum Beispiel die gewebespezifische Expression eines Gens oder aber auch Unterschiede im Transkriptgehalt von unabhängigen transgenen Pflanzen untersucht werden.

Als Template für die quantitative RT-PCR diente Gesamt-RNA, die mit Hilfe des „RNA-Easy-Plant-Kit“ der Firma Qiagen nach Herstellerangaben isoliert wurde. Die RT-PCR wurde unter Verwendung des „QuantiTect-SYBR-Kits“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben mit dem Lightcycler (Roche, Mannheim) durchgeführt. Dabei wurde folgender Standard-PCR-Ansatz gemacht:

Template (100ng Gesamt-RNA)	x	µl
QuantiTect RT-Mix	0,2	µl
QuantiTect SYBR RT-PCR-Mix	10	µl
Sense Primer (5pmol)	1	µl
Antisense Primer (5pmol)	1	µl
H ₂ O	ad 20µl	

Eine quantitative RT-PCR verläuft nach folgendem Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit	
cDNA Synthese	50°C	20min	
Inaktivierung der reversen Transkriptase; Aktivierung der DNA-Polymerase	95°C	15min	
cDNA Denaturierung	95°C	15sec	55 Zyklen
Anlagerung	53-60°C	30sec	
Verlängerung	72°C	40sec	
Abschlussverlängerung	72°C	15min	
Kühlung	4°C	∞	

Nach jedem Zyklus wurde die Menge der Fluoreszenz des in die DNA interkalierten SYBR-Green bestimmt. Dabei ist die Menge der Fluoreszenz direkt proportional zur amplifizierten DNA-Menge. Die Berechnung der relativen Transkriptmenge erfolgte folgendermaßen:

$$N_0 = N_n / E^{C_t}$$

N_0 = Anzahl der DNA-Kopien vor Beginn der PCR

N_n = Anzahl der DNA-Kopien nach n Zyklen

E = Faktor der PCR-Effizienz (nach Hersteller 1,85)

C_t = Anzahl der Zyklen

2.2.9 DNA-Sequenz-Analyse

Zur Kontrolle der in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide wurde besonders reine Plasmid-DNA mit Hilfe des „QIAprep Spin Kits“ (Qiagen) isoliert und mit entsprechenden Sequenzierungsprimern im Nano-Bio-Zentrum der TU Kaiserslautern analysiert.

2.2.10 Isolierung von Protoplasten aus Tabakblättern

Die Methode der Protoplastenisolierung aus Tabakblättern (W38) wurde nach DAMM & WILLMITZER (1989) durchgeführt. Für die Isolierung wurden 2-3 Wochen alte Tabakpflanzen verwendet. Zur Trennung von intakten und zerstörten Protoplasten wurde ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt durchgeführt, bei dem die gesamte Protoplastensuspension auf eine Saccharose/MES-Lösung gegeben wurde. Nach der Zentrifugation sammelten sich die intakten Protoplasten am oberen Rand des Zentrifugationsgefäßes und konnten daraufhin in W5 Medium überführt werden. Nach Bestimmung der Protoplastenzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählerkammer wurden die Protoplasten ein weiteres Mal pelletiert und abschließend für die Transformation auf eine Konzentration von $1,6 \cdot 10^6$ Protoplasten/ml mit Magnesium/Mannit-Lösung eingestellt.

Saccharose/MES-Lösung:

0,5 M Saccharose
0,1% (w/v) MES
[pH 5,7 mit NaOH einstellen und Lösung autoklavieren]

W5-Medium:

145 mM NaCl
125 mM CaCl₂
5 mM KCl
5 mM Glukose
Der pH-Wert sollte zwischen 5,0 und 6,0 liegen.

Magnesium/Mannit-Lösung:

0,5 M Mannit
15 mM MgCl₂
0,1% (w/v) MES
Mit 0,1 N KOH wurde der pH auf 5,7 eingestellt und die Lösung anschließend sterilfiltriert.

2.2.11 Transformation von isolierten Tabakprotoplasten

Die Transformation der isolierten Tabakprotoplasten erfolgte nach WENDT *et al.*, 2000. Dabei wurde Plasmid-DNA in einer Konzentration $\geq 30 \mu\text{g}$ eingesetzt um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erreichen. Die transformierten Protoplasten wurden über Nacht im Dunkeln bei 23°C inkubiert und die Fluoreszenz der transformierten Protoplasten entweder mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop der Firma Zeiss oder mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss) analysiert.

2.2.12 Transformation von *Arabidopsis thaliana* („floral dip“-Methode)

Die Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen erfolgte mit Hilfe von *A. tumefaciens* vermittelter Transformation (CLOUGH & BENT, 1998). Dazu wurden 250 ml einer rekombinanten *Agrobakterien* Übernachtskultur bei 5.000g für 15 min pelletiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 500 ml Saccharoselösung (5%) mit 0,01% Silwet L77 (BASF, Ludwigshafen) resuspendiert. Zur Transformation der *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen wurden die gesamten Blütenstände in die *Agrobakterien*-Suspension getaucht und anschließend für einen Tag in einem „Minigewächshaus“ inkubiert. Abschließend konnten die transformierten Pflanzen unter Langtagbedingungen bis zur Samenreife und Ernte gelagert werden.

2.2.13 Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach der „Simple-DNA-Prep“-Methode der Universität Wisconsin (Biotechnology Center, UWBC, USA).

2.2.14 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS stellt zusammen mit pET-Plasmidvektoren (Novagen, Heidelberg) ein ideales bakterielles Expressionssystem für rekombinante Proteine dar (STUDIER *et al.*, 1990). Der *E. coli*-Stamm wurde so konstruiert, dass eine kontrollierte Expression eines Gens, das in ein Plasmid kloniert wurde, stattfindet. Zur Konstruktion des *E. coli*-Stammes wurde der *lacUV5*-Promotor und das T7-Polymerase-Gen des Bakteriophagen D3 in das Genom des *E. coli*-Stammes inseriert. Der *lacUV5*-Promotor sorgt für die Kontrolle der Transkription der T7-RNA-Polymerase. Eine Induktion der Polymerase wird durch Zugabe von Isopropylthiogalaktosid (IPTG) erreicht. IPTG verhindert das Binden des *lac*-Repressors an den *lac*-Operator, so dass die Expression der T7-RNA-Polymerase ermöglicht wird. Die induzierte T7-RNA-Polymerase bindet an einen T7-Promotor, der bei den pET-Expressionssystemen dem multiplen Klonierungsbereich vorgeschaltet ist. Daraufhin wird die Zielsequenz, die in den multiplen Klonierungsbereich eingebaut wurde, transkribiert. Es folgt die Translation der mRNA zu einer Proteinsequenz an den Ribosomen der *E. coli*-Zellen.

In dieser Arbeit wurde die cDNA putativer ATP/ADP-Transporter aus *Arabidopsis thaliana*, *Entamoeba histolytica* und *Oryza sativa* in das Leseraster des pET-Vektors inseriert und die daraus resultierenden Proteine heterolog exprimiert um deren biochemische Funktion zu klären. Um die Proteine heterolog zu exprimieren, wurden zunächst Vorkulturen über Nacht angezogen und dann in frischem Medium im Verhältnis 1:100 in Kulturkolben mit Schikane angeimpft. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Die Zellen wurden 60-120 min nach der Induktion durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 3.000g geerntet, in KH₂PO₄-Puffer resuspendiert und für die Importmessungen verwendet.

2.2.15 Klonierungsstrategien

2.2.15.1 Herstellung der Plasmidkonstrukte zur heterologen Expression in *E. coli*

Zur heterologen Expression von putativen Transportproteinen in *E. coli* wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen mittels spezifischer Primer (siehe Tabelle 2.5) und PCR auf dem jeweiligen cDNA-Strang amplifiziert. Dabei wurde die PCR stets mit der Pfu-Polymerase durchgeführt. Die amplifizierten DNA-Sequenzen wurden daraufhin in den mit dem Restriktionsenzym EcoRV geöffneten Klonierungsvektor pBSK ligiert. Für die heterologe Expression der zu untersuchenden Sequenzen wurden diese anschließend entweder mit NcoI/XhoI oder NdeI/XhoI bzw. NdeI/BamHI wieder aus dem pBSK-Klonierungsvektor herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pET16b kloniert, der ebenfalls zuvor mit den jeweiligen Enzymen geöffnet wurde. Bei einer Klonierung über NcoI/XhoI in den pET16b-Vektor wurde die zu untersuchende DNA-Sequenz nicht mit einem His-Tag versehen. Bei der Verwendung von NdeI/XhoI bzw. NdeI/BamHI hingegen wurde an das putative Transportprotein ein c-terminaler His-Tag mit 10 Histidinen fusioniert. Die in den Expressionsvektor pET16b klonierten DNA-Sequenzen standen einer biochemischen Charakterisierung mittels heterologer Expression in *E. coli* zur Verfügung.

Bei dem in dieser Arbeit zu untersuchenden AtER-ANT1 wurden Konstrukte sowohl mit als auch ohne His-Tag hergestellt. Analog zu dieser Strategie wurden in dieser Arbeit ebenfalls die putativen Transportproteine OsER-ANT1 und EhANT1 in den pET16b-Expressionsvektor kloniert. Allerdings wurden hier nur die Konstrukte mit His-Tag hergestellt.

2.2.15.2 Herstellung transgener *AtER-ANT1*-c-Myc-Tag Pflanzen

Zur Analyse der subzellulären Lokalisierung des *AtER-ANT1* wurden transgene Pflanzen hergestellt, bei denen *AtER-ANT1* über einen starken 35S-Promotor überexprimiert wird. Außerdem wurde *AtER-ANT1* mit einem c-terminalen Myc-Tag (10 Aminosäuren) fusioniert, um das Protein mit Hilfe eines spezifischen Anti-c-Myc-Tag Antikörpers nachweisen zu können.

Zur Herstellung der transgenen Pflanzen wurde *AtER-ANT1* mit den Primern HA54 und M35 auf dem 1.Strang cDNA mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde bei dem Primer M35 zusätzlich eine Sequenz hinzugefügt, die für einen c-Myc-Tag codiert (Sequenz: CTACAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTC). Das erhaltene PCR-Produkt wurde daraufhin in den mit EcoRV geschnittenen Klonierungsvektor pBSK ligiert. *AtER-ANT1*-c-Myc wurde im Folgenden über die Restriktionsenzyme XbaI/XhoI aus dem Vektor pBSK herausgeschnitten und daraufhin in den Vektor pHannibal ligiert. Das Plasmid pHannibal besitzt einen konstitutiven 35S-Promotor, der eine starke und kontinuierliche Expression von Proteinen verspricht. Zusammen mit diesem 35S-Promotor wurde daraufhin die *AtER-ANT1*-c-Myc-Sequenz über das Enzym NotI aus pHannibal herausgeschnitten und in den Pflanzentransformationsvektor pART27 ligiert. Die Selektion transgener *AtER-ANT1*-c-Myc-Tag Pflanzen erfolgte durch eine erworbene Kanamycinresistenz.

2.2.15.3 Herstellung des *AtAAC5*-Promotor-GUS-Fusionskonstruktes zur Analyse der gewebespezifischen Expression

Für die Analyse der gewebespezifischen Expression von *AtAAC5* wurde dessen Promotorbereich mit den spezifischen Primern (M33, M34) über PCR amplifiziert. In M34 wurde eine zusätzliche SmaI-Schnittstelle eingebaut. Das ungeschnittene PCR-Produkt wurde daraufhin in den mit SmaI-linearisierten Klonierungsvektor pBSK ligiert. Es folgte ein Restriktionsverdau mit den Enzymen HindIII und SmaI, woraufhin der Promotorbereich von *AtAAC5* in den Pflanzentransformationsvektor pGPTV (Glucuronidase Plant Transformation Vector) ligiert wurde. Der Promotorbereich wurde „in frame“ vor das GUS-Gen (β -Glucuronidase) kloniert. Der Vektor pGPTV besitzt zusätzlich noch das Markergen *bar*, welches für das Enzym Phosphinotricin-Acetyl-Transferase codiert. Dieses Enzym ist in der Lage das Herbizid Ammonium-Glufosinat (BASTA) abzubauen und kann somit zur Selektion von transformierten Pflanzen eingesetzt werden.

2.2.15.4 Klonierungsstrategie des *AtER-ANT1*-Antisensekonstruktes zur Herstellung von Dosismutanten

Zur Herstellung des *AtER-ANT1*-Antisense-Konstruktes wurde *AtER-ANT1* mittels PCR auf dem ersten Strang cDNA mit den Primern M18 (mit inserierter XbaI-Schnittstelle) und M19 (BamHI-Schnittstelle) amplifiziert und in den Zwischenklonierungsvektor pA35 kloniert. Das Plasmid pA35 besitzt einen konstitutiven 35S-Cauliflower-Mosaik-Virus Promotor und einen OCS Terminator. Nach einem Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und HindIII wurde das 35S-Promotor/*AtER-ANT1*/OCS-Terminatorkonstrukt in den Pflanzentransformationsvektor pDE1001, der mit den gleichen Enzymen linearisiert wurde, ligiert. Das fertige Konstrukt wurde abschließend in *A. tumefaciens*-Zellen transformiert und diese rekombinanten Zellen für die Herstellung von *Arabidopsis thaliana* Dosismutanten, bezüglich des *AtER-ANT1*-Gens, verwendet.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford und Pierce

2.3.1.1 Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) wurde die zu bestimmende Proteinlösung in H₂O auf 500 µl aufgefüllt und mit 500 µl Bradfordlösung versetzt. Die gemischte Probe wurde daraufhin für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und der Proteingehalt bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem Photometer der Firma Eppendorf bestimmt. Zur Analyse des Proteingehaltes wurde im Vorfeld eine Eichgerade mit BSA (Rinderserumalbumin) erstellt.

2.3.1.2 Pierce

Im Fall von Proteinbestimmungen aus Samen wurde der Pierce-Test (Pierce Chemica, Rockford, IL) zur Analyse herangezogen. Dabei wurde die Bestimmung des Proteingehaltes nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde nach der Methode von LAEMMLI (1970) durchgeführt.

Dabei erfolgte die Auftrennung der Proteine in vertikalen Gelapparaturen der Firma Biorad und Serva bei einer konstanten Spannung zwischen 80-130 Volt. Das verwendete SDS-Gel bestand aus folgenden Komponenten:

Trenngel (6 ml):

14,6% (w/v)	Acrylamid
0,44% (w/v)	Bisacrylamid
300 mM	Tris-HCl, pH 8,8
0,08% (w/v)	SDS
0,05% (v/v)	TEMED
0,05% (w/v)	APS

Sammelgel (3 ml):

3% (w/v)	Acrylamid
0,08% (w/v)	Bisacrylamid
125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
0,1% (w/v)	SDS
0,1% (v/v)	TEMED
0,05% (w/v)	APS

SDS-Laufpuffermedium:

25 mM	Tris-HCl, pH 8,3
192 mM	Glycerin
1% (w/v)	SDS

5x Gelladepuffermedium:

0,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8
2% (w/v)	SDS
10% (v/v)	Glycerin
1% (w/v)	Bromphenolblau

Aufgetrennte Proteinbanden konnten mit Hilfe einer Färbelösung, die den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue enthält, sichtbar gemacht werden.

Färbelösung:

0,1% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
10% (v/v)	Essigsäure
40% (v/v)	Methanol

Überschüssige Färbelösung wurde mit folgender Entfärbelösung entfernt:

Entfärbelösung:

7% (v/v)	Essigsäure
5% (v/v)	Methanol
in H ₂ O	

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der aufgetrennten Proteine wurde der „Prestained Protein Marker“ der Firma NEB (Frankfurt) verwendet.

2.3.3 Western-Blot und Antikörpernachweis

Bei der Methode des Western-Blotting wird ein durch SDS-Page aufgetrenntes Proteingemisch auf eine Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,2 µm) übertragen. Es wurde dabei das „Wet-Blotting“-Verfahren in einem MiniTank Elektrobloetter, Modell VEP-2 der Firma Peqlab verwendet. Das zu blottende SDS-Gel wurde für 2-4 Stunden mit 200-500 mA geblottet.

Um Proteine über Antikörper auf der Membran nachzuweisen wurden freie Bereiche abgesättigt indem die Membran für 1-2 Stunden in einer TBS/BSA-Lösung inkubiert wurde. Das überschüssige BSA wurde entfernt, indem die Membran für jeweils 5 min in TBS-Puffer, TBST-Puffer und wiederum TBS-Puffer gewaschen wurde. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membran über Nacht mit dem ersten spezifischen Antikörper, der nach Herstellerangaben verdünnt in TBS/BSA-Puffer eingesetzt wurde. Die Membran wurde daraufhin von überschüssiger Antikörperlösung befreit, indem sie wiederum je 5 min in TBS-, TBST- und TBS-Puffer gewaschen wurde. Der zweite Antikörper wurde je nach Herstellerangaben in TBS/BSA-Puffer verdünnt eingesetzt und für mindestens 5 Stunden mit der Membran inkubiert. Überschüssige Antikörperlösung wurde durch erneutes Waschen wieder entfernt. Der Nachweis des gebundenen zweiten Antikörpers erfolgte auf unterschiedliche Weise:

Bei der Verwendung eines zweiten Antikörpers, an den eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt vorlag wurde folgender Reaktionsansatz auf die Membran gegeben:

	15 mg 4-Chloro-1-naphtol (in 5 ml Methanol _{p.a.})
+	25 ml TBS-Lösung

Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 15 µl H₂O₂ gestartet. Nach 1-5 min erschienen die Proteinbanden, an welche die Antikörper gebunden vorlagen. Die Reaktion wurde durch Waschen der Membran mit H₂O abgestoppt.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit mit sekundären Antikörpern gearbeitet, die zum Nachweis eine alkalische Phosphatase tragen. Dabei wurde folgender Reaktionsansatz gemischt und auf die zu entwickelnde Membran gegeben:

	50 ml	AP-Puffer
+	220 µl	BCIP
+	165 µl	NBT

Die Reaktion wurde ebenfalls durch Waschen der Nylonmembran mit H₂O abgestoppt.

Transfer-Puffer für das „Wet-Blotting“:

25 mM	Tris-HCl, pH 8,3
192 mM	Glycin
20% (w/v)	Methanol
1% (w/v)	SDS
in H ₂ O	

TBS-Puffer:

20 mM	Tris-HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
in H ₂ O	

TBST-Puffer:

20 mM	Tris-HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
0,1% (v/v)	Tween 20
in H ₂ O	

AP-Puffer :

100 mM	Tris-HCl (pH 9,5)
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂
in H ₂ O	

2.3.4 Methionin-Assay (Nachweis heterolog exprimierter Membranproteine in *E. coli* durch radioaktive Markierung mit ³⁵S-Methionin)

Diese Methode eignet sich besonders zum Nachweis sehr gering exprimierter Proteine. Dazu wurden 50 ml YT-Medium im Verhältnis 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft und diese bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3.000g für 5 min geerntet und das Zellpellet in 1 ml eines M9-Minimalmedium-Mix resuspendiert. Durch Zugabe von 10 µl IPTG (20%) und schüttelnder Inkubation bei 37°C für 15 min erfolgte die Induktion der heterologen Expression. Durch Zugabe von 20 µl Rifampicin (Stock: 20 mg/ml) wurde die Expression der bakteriellen Proteine inhibiert, indem die *E. coli*-eigene RNA-Polymerase gestört wurde. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 37°C, wonach bis zu 50 µCi [³⁵S]-Methionin dem Ansatz beigefügt wurden. Dieses radioaktiv-markierte Methionin wird als Substrat bei der Proteinbiosynthese eingebaut. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur und unter schüttelnden Bedingungen für 20 min inkubiert. Dann erfolgte die Ernte der Zellen durch Zentrifugation bei 4.000g für 5 min. Das Pellet wurde in 500 µl Aufschlußpuffer für Membranproteine mit Pefa-Block (1:1.000) resuspendiert, 2 min sonifiziert und anschließend 10 min bei 15.800g zentrifugiert. Im erhaltenen Pellet befanden sich Einschlußkörperchen (Inclusion-bodies) und im Überstand waren sowohl lösliche als auch Membranproteine enthalten. Durch eine 1-stündige Zentrifugation bei 100.000g wurden die Membranproteine pelletiert, wohingegen sich die löslichen Proteine im Überstand befanden. Alle drei erhaltenen Fraktionen konnten einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen werden. Das Gel wurde daraufhin getrocknet und die radioaktive Markierung der Proteine in den einzelnen Fraktionen mit Hilfe des Cyclone (Storage Phosphor Screen) der Firma Packard detektiert.

M9-Minimalmedium-Mix:

0,6% (w/v)	Na ₂ HPO ₄
0,3% (w/v)	KH ₂ PO ₄
0,1% (w/v)	NH ₄ Cl
0,4% (w/v)	Glukose
0,05% (w/v)	NaCl
1 mM	MgSO ₄
1 mM	Natriumcitrat
0,1 mM	CaCl ₂
100 µg/ml	Thiamin
0,01% (w/v)	Methionin Assay Medium (Difco Laboratories, Hamburg)

Aufschlußpuffer für Membranproteine:

10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
1 mM	EDTA
15% (v/v)	Glycerin
0,1 mM	Pefa-Block (immer frisch dazugeben)

2.3.5 IMAC (Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie)

Die Methode der IMAC bietet die Möglichkeit Membranproteine, die mit einem Histidin-Tag versehen sind anzureichern. Zur Anreicherung wurde Nickel-NTA-Agarose der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

So konnte ein nach Ultrazentrifugation erhaltenes Membranproteinpellet in 43 μl Dodecyl- β -Maltosid (20%) und 207 μl SäulenpufferA resuspendiert werden. Dieser Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, mit weiteren 750 μl SäulenpufferA versehen, gemischt und anschließend für 2 min bei 14.000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine vorher äquilibrierte Nickel-Säule gegeben und über Nacht bei 4°C in einem Überkopftaumler inkubiert. Im Folgenden wurde die Nickel-Säule mehrmals mit SäulenpufferA gewaschen und das anzureichernde Membranprotein abschließend durch die Zugabe des Elu-Puffers von der Nickel-Säule entfernt. Um eine weitere Ankonzentrierung zu Erreichen wurde das Eluat daraufhin einer Acetonfällung unterzogen.

SäulenpufferA:

300 mM	NaCl
100 mM	Natriumphosphat
10 mM	Imidazol
8 mM	Glycerin
0,1% (w/v)	DM (Dodecyl- β -Maltosid)
[pH 8,0 mit HCl einstellen]	

Elu-Puffer:

20 mM	Tris
500 mM	NaCl
500 mM	Imidazol
1% (v/v)	Triton

2.3.6 Northern-Blot Analysen

Zur Trennung von Gesamt-RNA wurden in dieser Arbeit 1,2%ige Formaldehyd-Agarosegele verwendet. Dazu wurden 62 ml DMPC-H₂O mit 7,5 ml MOPS-Puffer (10x) und 0,825 g Agarose aufgekocht und die erhaltene Lösung auf ungefähr 50°C abgekühlt, mit 5,5 ml Formaldehyd vermischt, und die gesamte Lösung in eine vorbereitete Gelkammer mit Taschenformer gegeben. Der Gellauf erfolgte in 1x MOPS-Puffer bei einer konstanten Spannung von 70 Volt für etwa 1 Stunde. Die aufzutrennenden RNA-Proben wurden folgendermaßen für den Gellauf vorbereitet:

	10 μg	RNA (max. 14 μl)
+	3 μl	10x MOPS
+	5 μl	Formaldehyd
+	10 μl	Formamid
+	2 μl	Bromphenolblau
+	1 μl	Ethidiumbromid (10 mg/ml)
	ad 35 μl mit DMPC-H ₂ O	

10x-MOPS-Puffer:

200 mM	MOPS
50 mM	Natriumacetat
10 mM	EDTA
(pH 6,8 mit NaOH)	

Nach dem Gellauf wurde das RNA-Gel zuerst zweimal für 15 min in Wasser geschwenkt und daraufhin in 10fach SSC äquilibriert. Es folgte der Blot des RNA-Gels auf eine positiv geladene Nylonmembran (Nytran-Plus, Schleicher & Schuell, Deutschland) durch kapillaren Flüssigkeitsstrom. Dieser Transfer dauerte mindestens 3 Stunden. Zur Immobilisierung der transferierten RNA auf der Nylonmembran wurde diese auf der Membran durch UV-Licht (254 nm) „gecrosslinkt“.

10x-SSC:

0,15 M	Natriumcitrat, pH 7,0
1,5 M	NaCl

2.3.7 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit dem „Ready-to-go DNA Labeling Beads Kit“ der Firma Amersham Biosciences (Freiburg). Zur Radioaktivmarkierung wurde [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (pro Ansatz 20 μCi , Amersham Biosciences) verwendet. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde durch eine Gelfiltrationschromatographie (Sephadex G50, Amersham Biosciences) erreicht. Zur Sonden-Markierung wurde 100-250 ng DNA eingesetzt.

2.3.8 Hybridisierung von Northern-Blots mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die Hybridisierung der Northern-Blots mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP-markierten DNA-Sonden erfolgte nach der Methode von SAMBROOK *et al.*, 2001 mit Churchpuffermedium (CHURCH & GILBERT, 1984) als Hybridisierungspuffer.

Church-Puffer:

0,25 M	di-Natriumhydrogenphosphat (pH 7,2)
1 M	EDTA
1% (w/v)	BSA
7% (w/v)	SDS

Die Northernblot-Analyse konnte mit Hilfe des Cyclone (Storage Phosphor Screen) der Firma Packard ausgewertet werden.

2.3.9 *In vitro* Translation von Membranproteinen und Targeting in isolierte ER-Mikrosomen

Die *in vitro* Translation von Proteinen kann dazu genutzt werden, um die subzelluläre Lokalisierung eines Proteins zu untersuchen. Dazu wird das Protein bei der *in vitro* Translation radioaktiv markiert und der Import in verschiedene Zellorganellen analysiert. In dieser Arbeit wurden AtER-ANT1 und AtAAC1 (als mitochondriale Negativkontrolle) der *in vitro* Translation unterzogen und das Targeting in aus Hund

isolierten ER-Mikrosomen überprüft. Dabei wurden die verwendeten ER-Mikrosomen freundlicherweise von der Arbeitsgruppe R. Zimmermann, Abteilung für Medizinische Biochemie in Homburg zur Verfügung gestellt. Für die *in vitro* Translation wurde das „Rabbit Reticulocyte Lysate System“ der Firma Promega nach Herstellerangaben verwendet. Als Ausgangskonstrukt diente jeweils die zu untersuchende Sequenz im Vektor pBSK in der T3-Orientierung. Bei den jeweiligen Konstrukten wurde darauf geachtet, dass eine natürliche Korzak-Sequenz erhalten blieb. Zur Radioaktiv-Markierung wurde [³⁵S]-Methionin verwendet. Die Importstudien konnten durch Einsatz des Cyclone (Storage Phosphor Screen) der Firma Packard ausgewertet werden.

2.3.10 Samenanalysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Samen der beiden unabhängigen homozygoten *AtER-ANT1*-Knockout-Linien sowohl auf ihren Proteingehalt als auch auf die Menge an Lipid hin untersucht.

2.3.10.1 Proteinbestimmung in Samen von *Arabidopsis thaliana*

Zur Analyse der Proteinmenge wurden jeweils 50 mg Samen eingesetzt. Diese wurden bei Raumtemperatur mit einem Mörser zerrieben, 1 ml Proteinextraktionspuffer hinzugefügt und das gesamte Material für exakt 3 min weiter homogenisiert. Das Homogenat wurde in E-cups transferiert und 10 min bei 20.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration einem Pierce-Test unterzogen.

Proteinextraktionspuffer:

50 mM	Hepes (pH 7,5)
5 mM	MgCl ₂
1% (v/v)	Triton X-100
15% (v/v)	Glycerin
2% (w/v)	SDS
1 mM	EDTA
1/100 (v/v)	PMSF (100 mM)

2.3.10.2 Lipidbestimmung in Samen

Für die Analyse des Lipidgehaltes in *Arabidopsis* Samen wurden 100 mg getrocknete Samen unter flüssigem Stickstoff in 1,5 ml Isopropanol für 5 min homogenisiert. Die Suspension wurde daraufhin in ein E-cup transferiert und über Nacht auf einem Eppendorf-Thermoschüttler bei 4°C und 1.000 rpm geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 20.000g. Der Überstand wurde in ein vorher gewogenes E-cup überführt und das Isopropanol über 8 Stunden in einem Eppendorf-Thermoschüttler bei 60°C abgedampft. Der Lipidgehalt konnte daraufhin durch erneutes Wiegen des E-cups ermittelt werden.

2.3.11 Metabolitenbestimmung in *Arabidopsis thaliana*

2.3.11.1 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Zur Analyse des Chlorophyllgehaltes in *Arabidopsis thaliana* Blättern wurde Gewebematerial zunächst in Ethanol (80%) durch Pottern homogenisiert und bei 20.000g für 5 min zentrifugiert. Der erhaltene

Überstand konnte direkt zur Messung der Gesamt-Chlorophyllkonzentration in einem Photometer bei 652 nm eingesetzt werden.

2.3.11.2 Aminosäurekonzentrationsbestimmung

Mit Hilfe der HPLC (high performance liquid chromatography) ist es möglich die Konzentration von Aminosäuren in einer Pflanze zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde die Menge an Aminosäuren im Blatt von *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen und in beiden unabhängigen *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bestimmt. Die Analysen wurden im Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben mit freundlicher Unterstützung von Dr. Mohammad Hajirezaei durchgeführt. Durch Derivatisierung der Aminosäuren mit dem fluoreszierenden Reagenz ACQ (6-Aminoquionyl-N-hydroxy-succinimidyl-carbamate) und Verwendung einer C18-Säule konnten die Aminosäuren über die HPLC voneinander getrennt und die Mengen der verschiedenen Aminosäuren analysiert werden. Die stabile Fluoreszenz wurde bei 395nm gemessen.

2.3.11.3 Bestimmung der Nukleotidkonzentration

Zur Bestimmung von Nukleotidkonzentrationen (ATP, ADP, AMP) in Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp- und Knockout-Pflanzen wurden die zu messenden Metabolite mittels Methanol/Chloroform extrahiert und die erhaltenen Proben über die HPLC aufgetrennt. Die Derivatisierung der Nukleotide erfolgte mittels Chloracetaldehyd. Die Analysen erfolgten ebenfalls im IPK in Gatersleben unter der Anleitung von Dr. Mohammad Hajirezaei.

2.3.11.4 Bestimmung der Zucker- und Stärkekonzentration in *Arabidopsis thaliana* Blattmaterial

Zur Bestimmung der Zucker- und Stärkekonzentration wurde ein gekoppelter Enzymtest durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte photometrisch über die Reduktion von NADP zu NADPH, wobei die Extinktionsänderung bei 340 nm verfolgt wurde.

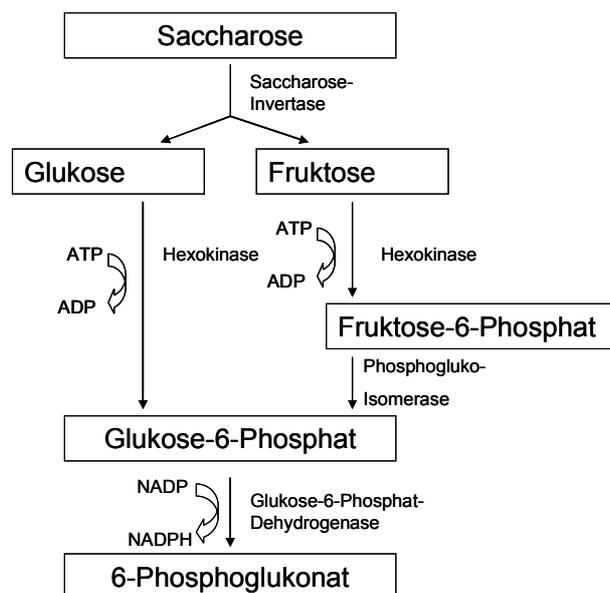


Abbildung 2.1: Gekoppelter Enzymtest für die Bestimmung von Zucker- und Stärkekonzentrationen

Wenn die Enzyme in der Reihenfolge Hexokinase, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Phospho-Gluko-Isomerase und abschließend wiederum Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zugegeben und die Extinktionsänderung verfolgt wurde, konnten Glukose und Fruktose gemeinsam in einem Ansatz bestimmt werden. Mit Hilfe des Enzyms Saccharose-Invertase konnte daraufhin die in den Extrakten vorhandene Saccharose in Glukose und Fruktose gespalten werden. Die Bestimmung der Saccharosekonzentration erfolgte daraufhin durch Messen der Glukose und Fruktosegehalte.

Die Stärkekonzentration konnte ebenfalls indirekt über die Glukosekonzentration ermittelt werden, indem diese im Vorfeld über die Enzyme Amyloglukosidase und α -Amylase in einzelne Glukosemoleküle gespalten und die Glukosemenge bestimmt wurde.

2.3.12 Saccharosedichtgradientenzentrifugation

Durch Einsatz der Saccharosedichtgradientenzentrifugation mit und ohne Magnesium können ER-Membranen von Membranen anderer Zellorganellen getrennt werden. Im Fall, dass kein Magnesium zu den verwendeten Puffermedien hinzugefügt wird, kommt es zu dem Effekt, dass die Ribosomen nicht mehr an die ER-Membran binden können. Die ER-Membranen verlieren somit an Gewicht und es kommt zu einem „Shift“ innerhalb des Saccharosegradienten. Bei allen anderen Zellorganellen konnte ein solches Verhalten bisher nicht beobachtet werden. Somit kann diese Methode dazu genutzt werden, um z.B. die subzelluläre Lokalisierung eines Proteins, welches im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, zu überprüfen.

Als Ausgangsmaterial für diese Methode dienen 12 g Pflanzenmaterial von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen und *AtER-ANT1-c-Myc-tag* Pflanzen, bei denen das Transportprotein *AtER-ANT1* überexprimiert wird und über einen Myc-tag Antikörper nachgewiesen werden kann.

Das Pflanzenmaterial wurde in 25 ml Homogenisierungspuffer 15-20 min bei 4°C stark gemörsert und über zwei Lagen Mull und zwei Lagen Miracloth abfiltriert. Die erhaltene Suspension wurde daraufhin für 15 min bei 8.000 rpm bei 4°C zentrifugiert, um weitere Pflanzen- und Zellreste zu entfernen. Es folgte ein Ultrazentrifugenschritt bei 100.000g für 1 Stunde um alle Zellmembranen zu pelletieren. Das Membranpellet wurde daraufhin in 600 μ l Resuspendierpuffer homogenisiert und stand somit der darauf folgenden Saccharosedichtgradientenzentrifugation zur Verfügung. Zur Herstellung des Gradienten wurden zwei Saccharoselösungen benötigt (20% und 60%), die unter Verwendung eines Hoefer SG30 Gradientengießers zu einem Gradienten gemischt wurden. Eine Trennung der einzelnen Zellmembranen wurde erreicht, indem der Saccharosegradient mit der zu trennenden Probe für 16 Stunden bei 100.000g zentrifugiert wurde. Daraufhin konnten durch Anstechen der Zentrifugenröhrchen und langsames Ablassen des Gradienten einzelne Fraktionen gewonnen werden. Um Proteine in den einzelnen Fraktionen nachzuweisen, wurden die Fraktionen einer SDS-Page und anschließendem Western-Blot unterzogen. Durch den Einsatz einer Reihe von Antikörpern konnte so die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen innerhalb der einzelnen Fraktionen untersucht werden. Die Bestimmung des Saccharosegehaltes innerhalb der verschiedenen Fraktionen wurde mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt.

Homogenisierungspuffer:

50 mM	Tris (pH 8,2)
20% (v/v)	Glycerin
1 mM	DTT
2 mM	EDTA
1/100 (v/v)	PMSF (100 mM)

Resuspendierpuffer:

10 mM	Tris (pH 7,6)
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
10% (v/v)	Glycerin
1/100 (v/v)	PMSF (100 mM)

Saccharoselösung:

20% (w/v)	Saccharose (bzw. 60%)
10 mM	Tris (pH 7,6)
2 mM	EDTA
1 mM	DTT
1/100 (v/v)	PMSF (100 mM)

Bei den Saccharosedichtegradienten mit Magnesium wurden alle verwendeten Puffermedien ohne EDTA und mit zusätzlich 5 mM MgCl₂ angesetzt.

2.3.13 Isolierung von intakten Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolierung intakter Mitochondrien wurde stets mit eiskalten Geräten und Medien gearbeitet. Für die Aufreinigung wurden 200 g frisch geerntetes Pflanzenmaterial mit 1 l Extraktionsmedium in einem Haushaltsmixer viermal 30 sec lang homogenisiert und das Homogenat über vier Lagen Mull und zwei Lagen Miracloth filtriert. Zum Entfernen der groben Zellreste und Plastiden wurde die Suspension daraufhin für 5 min bei 3.500 rpm (Rotor A6.9) zentrifugiert. Das Pelletieren der Organellen (Mitochondrien, restliche Plastiden, Peroxisomen) wurde durch Zentrifugation des Überstand bei 10.000g für 10 min (Rotor HFA 14.290) erreicht. Zum Waschen der Zellorganellen wurde das erhaltene Pellet in Waschpuffer resuspendiert und die erhaltene Lösung erneut bei 3.000g für 10 min zentrifugiert (Rotor HFA 22.40, SS34 Röhrchen). Es folgte eine weitere Pelletierung der Zellorganellen (15 min, 10.000g). Die Organellen wurden in 1 ml Waschpuffer aufgenommen und zur Trennung der Mitochondrien von den übrigen Zellkompartimenten erst einem 28%igen Percollgradienten und anschließend einem 24%igen Percollgradienten unterzogen. Um das Percoll zu entfernen, wurden die Mitochondrien abschließend einmal mit Waschpuffer und dreimal mit Saccharoselösung gewaschen. Die isolierten Mitochondrien wurden daraufhin direkt für Transportmessungen eingesetzt.

Extraktionsmedium:

2 mM	EDTA
0,5% (v/v)	PVP-40
5 mM	Glycin
5 mM	Malat
4 mM	Cystein
0,3 M	Mannit
20 mM	tetra-Na-pyrophosphat-10-hydrat
0,1%	BSA

[pH 7,5 mit Phosphorsäure]

Waschpuffer:

0,3 M	Mannit
10 mM	KH ₂ PO ₄
1 mM	EDTA
10 mM	Malat
10 mM	Pyruvat
5 mM	Glycin
0,1%	BSA

[pH 7,2 mit KOH]

Percollpuffer:

0,3 M	Saccharose
10 mM	KH ₂ PO ₄
1 mM	EDTA
10 mM	Malat
10 mM	Pyruvat
0,1%	BSA

[pH 7,2 mit KOH]

Saccharoselösung:

170 mM	Saccharose
17 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
1,7 mM	MgCl ₂

2.3.14 Importstudien an intakten Mitochondrien mit radioaktiv markiertem ATP und Glycin

Transportaufnahmen an intakten Mitochondrien wurden mittels der „Rapid-Filter“ Technik (WINKLER *et al.*, 1968) durchgeführt. Für die Aufnahmen wurden jeweils 20 µl isolierte Mitochondrien mit 180 µl Transportmedium über unterschiedliche Zeiten bei 30°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte über die „Rapid Filter“ Technik und das Abtrennen nicht eingebauter Radioaktivität durch Spülen der Membranfilter mit 16 ml Basic-Medium.

Basic-Medium:

3 mM	KH ₂ PO ₄
13 mM	K ₂ HPO ₄
58 mM	KCl
30 mM	NaCl
[pH 7,4]	

2.3.15 Importstudien an intakten *E. coli* Zellen

Die Importstudien an intakten *E. coli* Zellen erfolgte ebenfalls unter Verwendung der „Rapid Filter“ Technik (WINKLER *et al.*, 1968) und wurde in Anlehnung an die Methode von TJADEN *et al.*, 1998 durchgeführt. Für die Aufnahmeexperimente wurden die *E. coli* Zellen entweder in YT bzw. TB-Medium angezogen und die Proteinexpression bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 durch die Zugabe von IPTG induziert. Nach einer Induktionszeit von 1-2 Stunden wurden die Zellen für die Aufnahmeexperimente geerntet und mit KH₂PO₄-Puffer (50 mM) auf eine OD₆₀₀ von 5-8 eingestellt. Die Importstudien wurden bei 30°C durchgeführt, wobei jeweils 100 µl *E. coli* Zellen mit 100 µl Transportmedium inkubiert wurden. Mit Hilfe der „Rapid Filter“ Technik und geeigneten Membranfiltern (Firma Schleicher & Schnell, 0,45 µm Porendurchmesser) wurde die Reaktion abgestoppt. Zum Entfernen nicht importierter Radioaktivität wurden die *E. coli* Zellen mit 16 ml KH₂PO₄-Puffer (50 mM) gespült und die Menge der importierten Radioaktivität mit einem Scintillationszähler quantifiziert.

2.3.16 Herstellung von [α^{32} P]-ADP

Das Enzym Hexokinase macht es möglich [α^{32} P]-ATP in [α^{32} P]-ADP umzuwandeln. Die Hexokinase katalysiert dabei folgende Reaktion:



Für die [α^{32} P]-ADP-Synthese wurde folgender Reaktionsansatz erstellt:

140 µCi	[α^{32} P]-markiertes ATP
+ 1 mM	Glucose
+ 10 µM	ATP
+ 50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
+ 5 mM	MgCl
+ 3 Units	Hefe-Hexokinase (Roche, Mannheim)

Dieser Reaktionsansatz wurde für 45-60 min bei Raumtemperatur inkubiert und das Enzym durch Erhitzen auf 95°C für 5 min denaturiert.

2.3.17 GUS-Färbung

Zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression von Transportproteinen ist es möglich den Promotorbereich des zu untersuchenden Proteins mit einem Reporter gen zu fusionieren und die Expression *in planta* zu analysieren. Ein solches Reporter gen stellt *uidA* (aus *E. coli*) dar, welches für das GUS-Enzym (Glucuronidase) kodiert. Zum Nachweis des Reporter gens wird das zu untersuchende Pflanzengewebe mit dem synthetischen Substrat X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronid)

infiltriert, welches nach oxidativer Kondensation und Spaltung einen blauen Farbniederschlag am exakten Syntheseort liefert.

Die Methode der GUS-Färbung erfolgte in Anlehnung an SESSIONS *et al.*, 1999. Dabei wurde zuerst das zu untersuchende Pflanzenmaterial mit 90% eiskaltem Aceton für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert um das Chlorophyll aus den verwendeten Pflanzengeweben herauszulösen. Daraufhin wurde das Gewebe 1 Stunde mit dem Färbepuffer infiltriert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden pflanzeneigene Farbreste durch 30 minütige Waschschriffe mit jeweils 20%, 35%, 50% und 75% Ethanol entfernt und die gewebespezifische Expression der zu untersuchenden Transportproteine ausgewertet.

Färbepuffer:

50 mM	Natrium-Phosphat (pH 7,2)
1% (v/v)	Triton X-100
10 mM	Natrium-Ferrocyanid
10 mM	Natrium-Ferricyanid

2.4 Computergestützte Analysen

Die in dieser Arbeit verwendeten Gensequenzen wurden den Datenbanken EMBL (www.ebi.ac.uk/embl) und NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) entnommen.

Zur Erstellung von Aminosäurealignments dienten die Programme Genedoc und Clustal X.

Für die Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungsstrategien (siehe Kapitel 2.2.15) wurde mit dem Programm Clonemanager7 gearbeitet.

Elektronische Expressionstudien bezüglich der Gewebe- und Entwicklungsspezifität wurden mit dem Genevestigator (www.genevestigator.ethz.ch) erstellt und Vorhersagen bezüglich der subzellulären Lokalisierung von Proteinen mit den Programmen Target_P und Signal_P (EMANUELSSON *et al.*, 2000; NIELSON *et al.*, 1997) analysiert.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Experimente, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden gliedern sich in vier Themenbereiche:

- Im ersten Teil wird die molekulare, biochemische und physiologische Charakterisierung des *AtER-ANT1* beschrieben. Zur biochemischen Charakterisierung wurde eine heterologe Expression dieses Transportproteins in *E. coli* durchgeführt. Weiter konnten über GFP-Fusionskonstrukte, *in vitro* Translationsexperimente und Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation mit anschließender Antikörperdetektion Analysen bezüglich der subzellulären Lokalisierung von *AtER-ANT1* vorgenommen werden. Um die physiologische Rolle im pflanzlichen Stoffwechsel zu untersuchen, wurden außerdem *AtER-ANT1* homozygote Knockout-Pflanzen umfangreich untersucht, sowie die gewebe- und entwicklungsspezifische Expression mittels Promotor-GUS-Fusionskonstrukt analysiert (3.1).
- Der zweite Teil beschreibt die Charakterisierung des Transportproteins, *OsER-ANT1*, das zu dem Transportprotein in *Arabidopsis thaliana* (*AtER-ANT1*) homolog ist. Neben phylogenetischen Analysen wurde das Transportprotein ebenfalls durch Einsatz der heterologen Expression biochemisch im *E. coli*-System untersucht (3.2).
- Im nächsten Themenbereich der vorliegenden Arbeit wird die Ursache für das Vorhandensein von 5 verschiedenen AAC-Isoformen in *Arabidopsis thaliana* untersucht. Dazu wurde mit *Arabidopsis thaliana* Knockout-Pflanzen gearbeitet, bei denen die jeweiligen Transportproteine durch eine T-DNA-Insertion ausgeschaltet wurden (3.3).
- Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der biochemischen Charakterisierung des *ANT1* aus dem Protisten *Entamoeba histolytica* mittels heterologer Expression in *E. coli* unter besonderer Berücksichtigung der evolutiven Bedeutung solcher Transportproteine (3.4).

3.1 Charakterisierung des ER-ANT1 aus *Arabidopsis thaliana*

3.1.1 Phylogenetische Eingruppierung des *AtER-ANT1* und Aminosäuresequenzanalysen

Das Transportprotein ER-ANT1 aus *Arabidopsis thaliana* wird phylogenetisch in die Gruppe der MCF (mitochondrial carrier family) eingruppiert, die eine Vielzahl unterschiedlicher Metabolite über verschiedene endogene Membranen (z.B. Mitochondrien, Plastiden, Peroxisomen etc.) innerhalb der eukaryotischen Zelle transportieren können. Transportproteine der MCF bestehen aus sechs Membrandurchspannenden hydrophoben Sequenzbereichen, die jeweils durch einen kurzen hydrophilen Loop miteinander verbunden sind. Es wird davon ausgegangen, dass die hydrophoben Transmembrandomänen durch eine Triplikation eines Ursprungselementes entstanden sind (KUAN & SAIER, 1993). Weiter wird angenommen, dass die Transportproteine der MCF funktionell in Form eines Dimers vorliegen (HACKENBERG & KLINGENBERG, 1980). In Abbildung 3.1 ist die Eingruppierung des *AtER-ANT1* in den phylogenetischen Stammbaum einiger ausgewählter MCF-Transportproteine gezeigt.

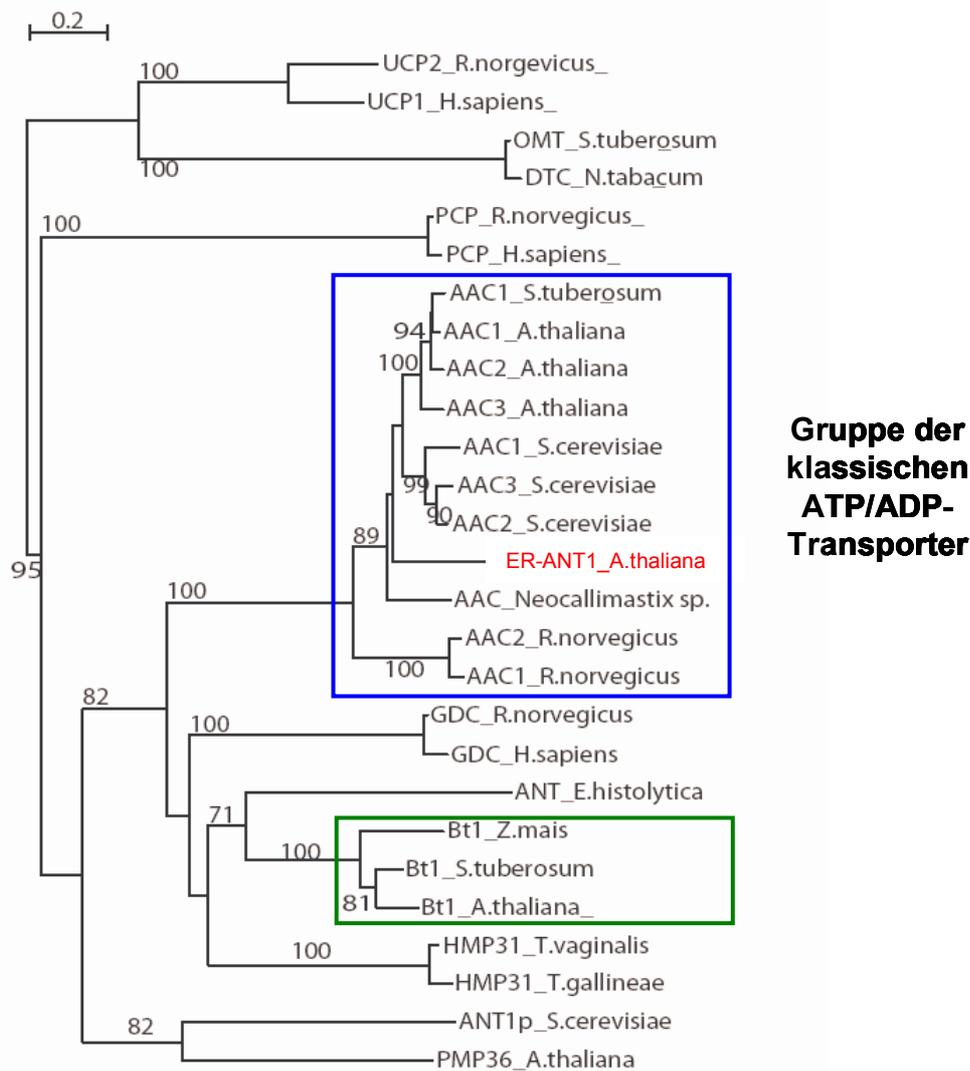


Abbildung 3.1: Einbindung des AtER-ANT1 in den phylogenetischen Stammbaum einiger ausgewählter MCF-Transporter. Der Stammbaum wurde in Kooperation mit dem „Department of Evolutionary Microbiology“, Faculty of Science, University of Nijmegen (Niederlande) erstellt. Die Berechnung des Stammbaumes wurde mit dem Programm MRBAYES durchgeführt. Die Analyse der „Bootstrap“-Werte erfolgte mittels BAYESIAN CARLO SIMULATION wohingegen die Längen der Verzweigungen mit dem Programm PUZZLE ermittelt wurden. Zur Kalkulation des Stammbaumes diente der „Neighbour-joining“-Algorithmus (SAITOU & NEI, 1987). In roter Schrift ist die Eingruppierung des AtER-ANT1 in die Gruppe der MCF zu sehen. Die Gruppe der klassischen AACs verschiedener Organismen ist blau umrandet. In grün umrandet ist die Gruppe der Brittle-Familie dargestellt. Erläuterungen dazu siehe Text.

Das in dieser Arbeit zu untersuchende Transportprotein AtER-ANT1 wird phylogenetisch eindeutig in die Gruppe der klassischen mitochondrialen AACs (ATP/ADP-Carrier) eingruppiert (PICAULT *et al.*, 2004). Dabei konnten klassische AACs bereits in einer großen Vielzahl von Organismen identifiziert und charakterisiert werden, so zum Beispiel in *Rattus*, *Arabidopsis* oder *Saccharomyces*. In *Arabidopsis thaliana* sind bereits drei AAC-Isoformen biochemisch als Vertreter mitochondrialer ATP/ADP-Transporter analysiert worden (HAFERKAMP *et al.*, 2002). Bei genauerer Betrachtung ist zu erkennen, dass die vierte Isoform, AtER-ANT1 zwar in die Gruppe der klassischen AACs eingruppiert wird, jedoch nicht in unmittelbarer Nähe der bereits charakterisierten Isoformen AAC1-3 in *Arabidopsis thaliana*. Das

Transportprotein *AtER-ANT1* liegt dabei phylogenetisch zwischen den AACs aus *Arabidopsis* bzw. *Saccharomyces* und einem klassischen AAC aus dem Protisten *Neocallimastix*.

Interessanterweise ergaben detaillierte Studien bezüglich der MCF-Vertreter, dass neben den mitochondrialen Proteinen auch subzellulär nicht mitochondrial lokalisierte MCF-Transportproteine existieren. Eine plastidäre Lokalisierung der Brittle-Familie und eine peroxisomale Lokalisierung des ANT1p konnten bereits nachgewiesen werden (LEROCH *et al.*, 2005; PALMIERI *et al.*, 2001).

Eine detaillierte Untersuchung der für die Funktionalität mitochondrialer AACs wichtigen Aminosäure-Reste wurde mittels eines Aminosäurealignments (Abbildung 3.2) zwischen dem *AtER-ANT1* und den drei bekannten mitochondrialen AACs aus *Arabidopsis thaliana* durchgeführt.

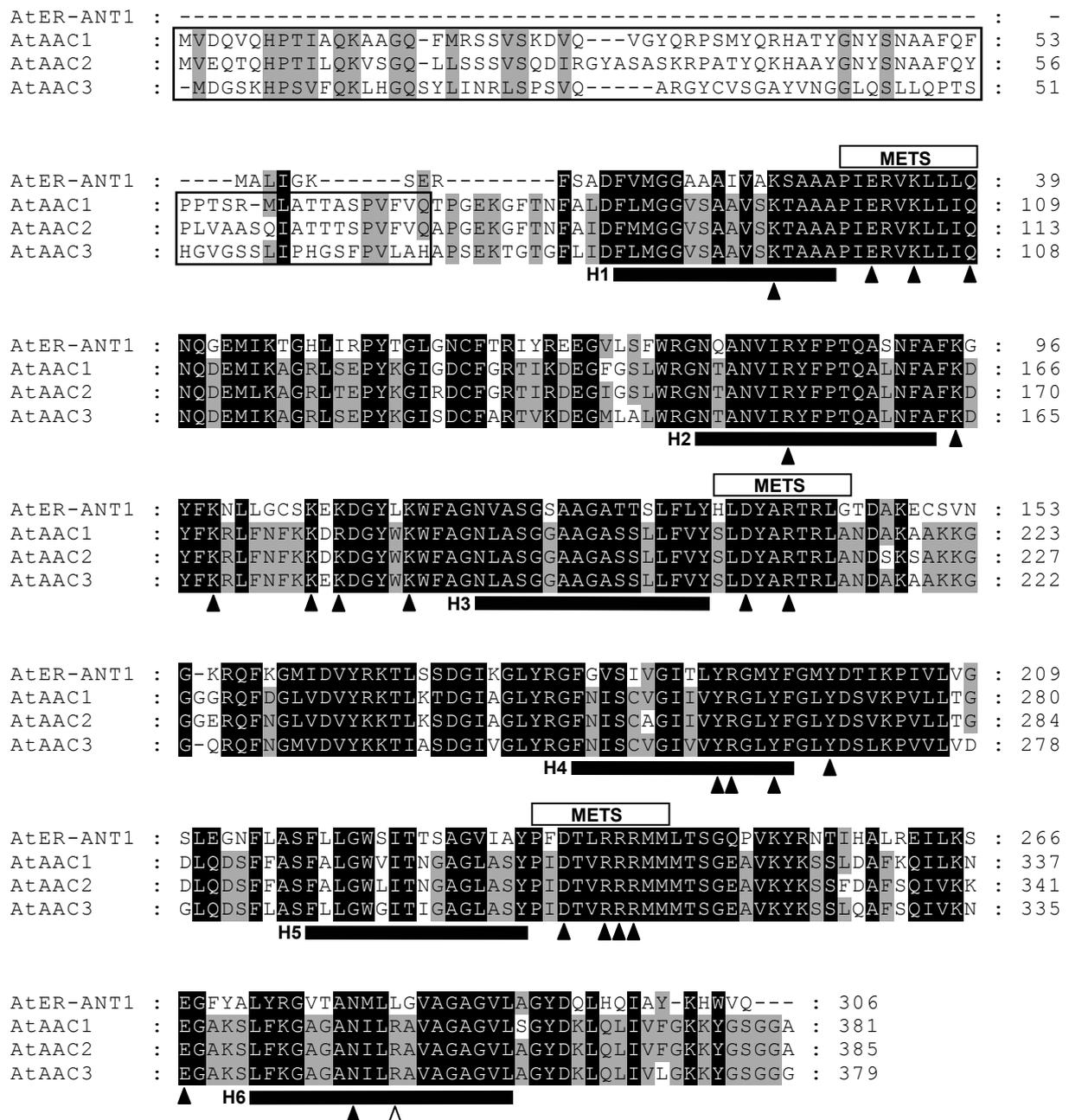


Abbildung 3.2: Aminosäurealignment des *AtER-ANT1* und der klassischen mitochondrialen AAC Isoformen 1-3 in *Arabidopsis thaliana*. Identische oder ähnliche Aminosäuren bei allen untersuchten Transportproteinen sind in schwarz, wohingegen konservierte Aminosäuren in drei Proteinen grau schattiert sind. Die vorhergesagten N-terminalen Transitpeptide der *AtAAC1-3* sind durch ein schwarzes Rechteck gekennzeichnet. Die schwarzen Balken

H1-H6 zeigen die sechs putativen hydrophoben Membran-durchspannenden Transmembrandomänen. METS: konservierte „Mitochondrial energy transfer signature“ (METS = P-x-[DE]-x-[LIVAT]-[RK]-x-[LRH]-[LIVMFY]-[QGAIVM]), die nach den Transmembrandomänen H1, H3 und H5 folgen. Aminosäuren, die mit einem Dreieck gekennzeichnet sind, stellen wichtige Aminosäuren für die Funktion der mitochondrialen AACs dar. Dabei sind Aminosäuren, die mit schwarz-gefüllten Dreiecken gekennzeichnet sind, ebenfalls in *AtER-ANT1* konserviert, wohingegen ungefüllte Dreiecke Unterschiede zu den mitochondrialen AACs aufzeigen. *AtER-ANT1* (*At5g17400*); *AtAAC1* (*At3g08580*); *AtAAC2* (*At5g13490*); *AtAAC3* (*At4g28390*).

Bei der Betrachtung des Aminosäurealignments von *AtER-ANT1* mit den mitochondrialen *AtAAC1-3* fällt zunächst auf, dass *AtER-ANT1* eine putative N-terminale Signalsequenz fehlt, die notwendig ist um pflanzliche AACs korrekt in die innere mitochondriale Membran zu transportieren (MURCHA *et al.*, 2005).

Bei einer komplexen Untersuchung der Aminosäuren, die essentiell für die Funktion der mitochondrialen AACs sind, zeigt sich eine mögliche Funktion des *AtER-ANT1* als ADP/ATP-Transporter. Die wichtige Bedeutung von basischen Aminosäuren für die Funktion von AAC2 in *Saccharomyces cerevisiae* konnte bereits mittels zielgerichteter Mutagenese gezeigt werden. Dabei spielen sechs Arginine und ein Lysin (R96, R204, R252, R253, R254, R294, und K38) eine kritische Rolle für die ATP/ADP-Transport-Aktivität des mitochondrialen AAC2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (NELSON *et al.*, 1993). Die korrespondierenden Aminosäuren in *AtER-ANT1* (R83, R192, R240, R241, R242, L282 und K25) sind fast identisch mit der Ausnahme, dass R294 durch L282 ersetzt wurde (siehe Abbildung 3.2).

Weiter wurde die Struktur des AAC1 Monomers aus Rind über eine Röntgen-Kristallstruktur-Analyse mit einer Auflösung von 2.2 Å untersucht (PEBAY-PEYROULA *et al.*, 2003). Dabei konnten mehrere Cluster mit geladenen Aminosäuren identifiziert werden, die potentiell an der Substratbindung beteiligt sind. Diese scheinen somit essentiell für die Funktion klassischer mitochondrialer ADP/ATP-Transporter zu sein. Innerhalb des Translokationskanals des Rinder-AAC1 wurde ein kationischer Cluster, bestehend aus zwei Lysinen und sechs Argininen (K22, K32, R79, R137, R234, R235, R236 und R279) identifiziert, der zum Substrat hin gerichtet ist. Die Position der Aminosäureseitengruppen wird dabei durch ein komplexes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Interaktionen stabilisiert. Dabei binden die elektrostatischen Wechselwirkungen Wassermoleküle und saure oder polare Seitengruppen der Aminosäuren E29, D134, D231, Q36, E264 und N276, ein. Diese eben beschriebenen geladenen oder polaren Aminosäuren sind vollständig in *AtER-ANT1* konserviert (K25, K35, R83, R140, R192, R240, R241, R242, L282, E32, D137, D237, Q39, E267 und N279). Eine Ausnahme bildet R279 (in Hefe R294), welches durch L282 ersetzt wird. Weiterhin wurde ein zweiter kationischer Cluster im Translokationskanal des Rinder-AAC1, bestehend aus vier Lysinen und zwei Argininen (K91, K95, K106, K198, R104 und R187) identifiziert, welcher möglicherweise an der Funktion des Transportes beteiligt ist. Auch dieser kationische Cluster ist in *AtER-ANT1* konserviert (K95, K99, K101, K106, K108, K203, R192), wobei R104 des Rinder-AAC1 in *AtER-ANT1* durch die gleich geladene Aminosäure Lysin K106 ersetzt wurde. Ein weiterer kationischer Cluster, der eine Leiter aus drei Tyrosinen (Y186, Y190, Y194) bildet, soll im Rinder-AAC1 am Durchschleusen von ADP durch den Kanal beteiligt sein. Diese Tyrosinleiter ist in *AtER-ANT1* komplett konserviert (Y191, Y195, Y199). Neben diesen Aminosäure-Motiven konnten in *AtER-ANT1* auch die METS („mitochondrial energy transfer signatures“), die charakteristisch für Membranproteine der MCF sind (LEROCH *et al.*, 2005), nachgewiesen werden.

Die hohe Konservierung der Aminosäuren, die essentiell für die Funktion der mitochondrialen AACs ist, indiziert eine mögliche Funktion des *AtER-ANT1* als Adenylat-Transportprotein. Der größte Unterschied

zwischen den Sequenzen der oben betrachteten Proteine ist das Fehlen der N-terminalen Signalsequenz bei *AtER-ANT1* im Vergleich zu den drei mitochondrialen AACs in *Arabidopsis thaliana*.

Um den Verwandtschaftsgrad der klassischen mitochondrialen AACs zu *AtER-ANT1* darzustellen sind in Tabelle 3.1 die Anteile der ähnlichen bzw. identischen Aminosäuren gezeigt.

Tabelle 3.1: Anteil ähnlicher bzw. identischer Aminosäuren der mitochondrialen *AtAAC1-3* und *AtER-ANT1*.

Zur Ermittlung der Werte wurden die Aminosäuresequenzen ohne N-terminale Signalsequenz verwendet. Die Werte wurden mit Hilfe der Programme ClustalX und Genedoc ermittelt. Der Anteil ähnlicher (bzw. identischer) Aminosäuren wurde jeweils in Prozent angegeben.

	<i>AtAAC1</i>	<i>AtAAC2</i>	<i>AtAAC3</i>
<i>AtER-ANT1</i>	74 (57)	73 (57)	76 (59)
<i>AtAAC3</i>	92 (86)	92 (86)	
<i>AtAAC2</i>	97 (92)		

Die Analyse des Anteils ähnlicher bzw. identischer Aminosäuren zeigt die sehr stark ausgeprägte Homologie zwischen den bereits charakterisierten mitochondrialen Isoformen AAC1-3 in *Arabidopsis thaliana*. Der Anteil ähnlicher Aminosäuren erreicht zwischen diesen Transportproteinen über 90 Prozent. *AtER-ANT1* hingegen besitzt nur rund 75 Prozent ähnliche bzw. rund 58 Prozent identische Aminosäuren im Vergleich zu den AAC1-3. Dennoch sprechen die oben beschriebenen hochgradig konservierten Aminosäure-Motive für eine biochemische Funktion des *AtER-ANT1* als ADP/ATP-Transporter.

3.1.2 Biochemische Charakterisierung des *AtER-ANT1* mittels heterologer Expression in *E. coli*

Eine biochemische Charakterisierung von Transportproteinen kann mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden.

Eine Möglichkeit sind Transportstudien an intakten Zellorganellen, so zum Beispiel an isolierten Mitochondrien (WINKLER *et al.*, 1968; KLINGENBERG, 1970). Diese haben allerdings den Nachteil, dass keine einzelnen Protein-Isoformen untersucht werden können. Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung bietet die Rekonstitution von rekombinanten Proteinen im Liposomensystem. Dieses System hat sich bereits zur Analyse verschiedenster Transportproteine bewährt, allerdings birgt diese Methode zwei erhebliche Nachteile. Zum einen ist es relativ schwierig funktionelles Protein zu isolieren, besonders wenn es sich um ein Homodimer handelt. Zum anderen kann das zu untersuchende Protein in der künstlich geschaffenen Membran in zwei unterschiedlichen Orientierungen vorliegen, so dass externe und interne Affinitäten des Transportproteins schwer zu analysieren sind. Weiter gibt es die Möglichkeit der heterologen Expression von Transportproteinen im Hefesystem (VAN DER GIEZEN *et al.*, 2002). Das Hefesystem hat dabei den Nachteil, dass eine Expression des zu untersuchenden Transportproteins in verschiedenen Membranorganellen stattfinden kann, da es sich bei Hefe um einen eukaryotischen Organismus handelt. Speziell für die Charakterisierung von ATP/ADP-Transportern kommt zusätzlich die Schwierigkeit hinzu, dass Hefe ebenfalls ATP/ADP-Transporter besitzt, so dass in diesem Fall mit spezifischen Hefe-Mutanten gearbeitet werden müsste. Eine vierte Methode der biochemischen Charakterisierung von Transportproteinen ist die heterologe Expression der Proteine im *E. coli*-System. Im Gegensatz zu Hefe ist *E. coli* ein prokaryotischer Organismus, der von sich aus keine eigenen ATP/ADP-Transporter besitzt. Das *E. coli*-System hat sich bereits zur Charakterisierung von Transportproteinen aus Mitochondrien, Plastiden und Bakterien bewährt (HAFERKAMP *et al.*, 2002; TJADEN

et al., 1999; TJADEN et al., 1998). Nach einer kontrollierten Expression wird das zu untersuchende Transportprotein in die *E. coli*-Membran inseriert. Die Analyse der Funktion dieses Proteins kann daraufhin über radioaktive Aufnahmeexperimente an intakten *E. coli*-Zellen erfolgen.

Zur biochemischen Charakterisierung von AtER-ANT1 wurde in der vorliegenden Arbeit aus den oben aufgeführten Gründen das heterologe *E. coli*-Expressionssystem gewählt.

3.1.2.1 Herstellung der Plasmidkonstrukte für eine heterologe Expression von AtER-ANT1 in *E. coli*

Es wurden sowohl Expressionskonstrukte von AtER-ANT1 mit und ohne Histidin-Tag (His-Tag) hergestellt. Der His-Tag bietet die Möglichkeit, das Protein über einen spezifischen His-Tag-Antikörper zum Beispiel in der *E. coli*-Membran nachzuweisen. Um sicherzustellen, dass sich dieser His-Tag möglicherweise negativ auf die Funktionalität des AtER-ANT1 auswirkt, wurde ebenfalls ein Expressionskonstrukt ohne His-Tag hergestellt. Abbildung 3.3 zeigt die Herstellung der Plasmidkonstrukte für eine heterologe Expression von AtER-ANT1 in *E. coli*.

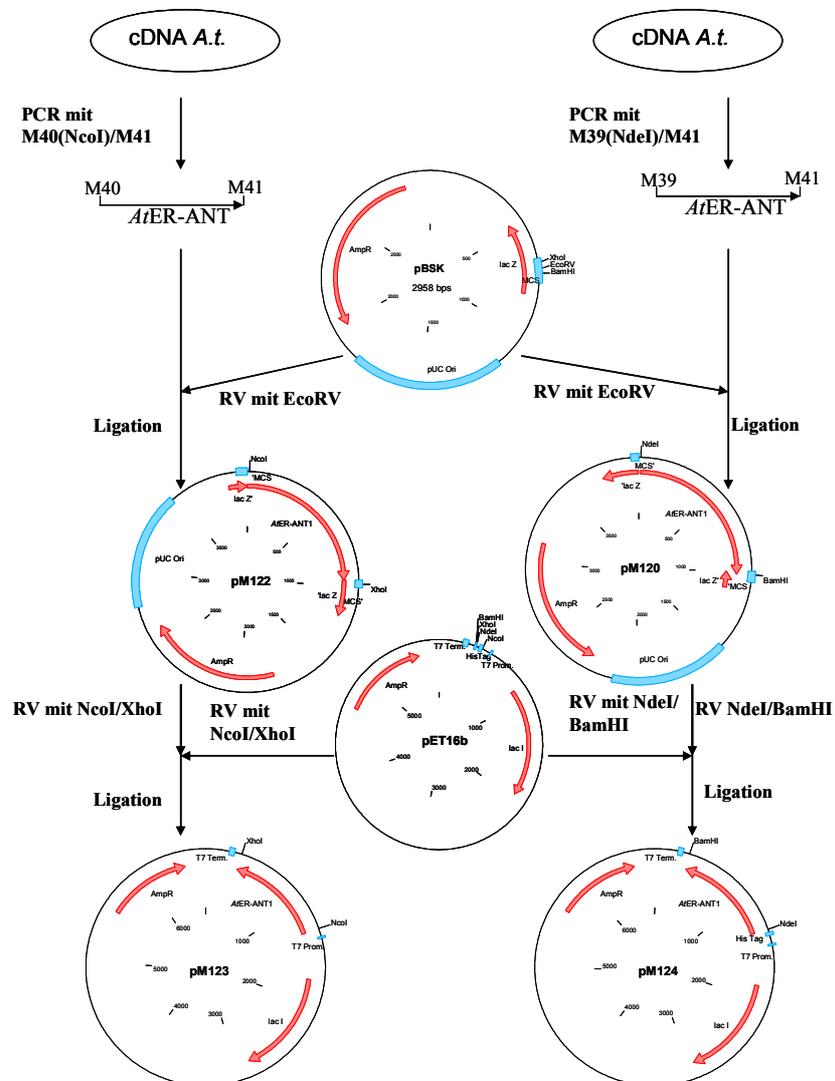


Abbildung 3.3: Klonierungsstrategie für die heterologe Expression von AtER-ANT1 in *E. coli*.

PCR: Polymerasekettenreaktion; RV: Restriktionsverdauung; AmpR: Ampicillinresistenz; MCS: "multiple cloning site"; His-Tag: Histidin-Tag; T7 Prom: T7-Promotor; T7 Term: T7-Terminator

Für eine heterologe Expression von Transportproteinen in *E. coli* ist es nötig, dass diese in die *E. coli*-Membran integrieren. In Abbildung 3.4 ist der Einbau von AtER-ANT1 (ohne His-Tag) in die *E. coli*-Membran gezeigt. Der Nachweis erfolgte über einen Methioninassay, bei dem AtER-ANT1 mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert wurde.

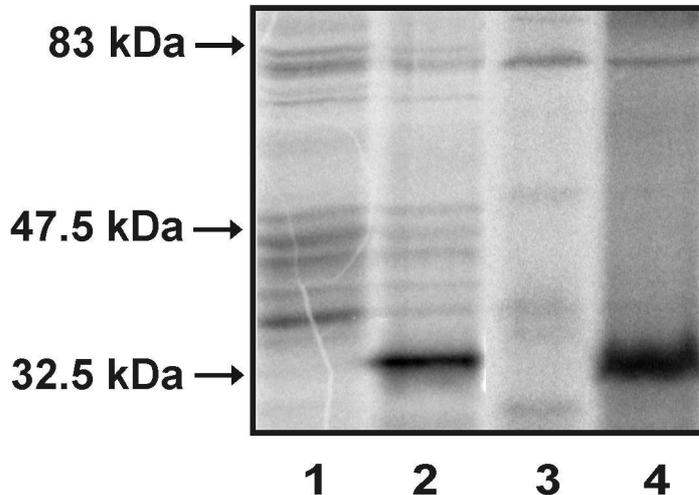


Abbildung 3.4: Nachweis des Einbaus von AtER-ANT1 in die *E. coli*-Membran mittels Methionin-Assay.

Spur 1: nicht-induzierte *E. coli* Zellen Gesamtprotein (Kontrolle); Spur 2: induzierte *E. coli* Zellen Gesamtprotein; Spur 3: nicht-induzierte *E. coli* Zellen Membranfraktion (Kontrolle); Spur 4: induzierte *E. coli* Zellen Membranfraktion; Spur 1+3: 50µg Protein; Spur 2+4: 5µg Protein

Abbildung 3.4 zeigt, dass eine Induktion der *E. coli* Zellen zum einen zu einer Expression von AtER-ANT1 führt (siehe Spur 2 im Gesamt-*E. coli*-Extrakt) zum anderen, dass AtER-ANT1 in die Membran der *E. coli* Zellen integriert wird (siehe Spur 4 Membranfraktion). Dabei kann AtER-ANT1 bei dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 33 kDa detektiert werden. Ohne Induktion der *E. coli* Zellen kann kein AtER-ANT1-Protein sowohl im Gesamtextrakt als auch in der Membranfraktion nachgewiesen werden.

Aufgrund des Einbaus von AtER-ANT1 in die Membran der *E. coli* Zellen war es im weiteren Verlauf der Arbeit möglich radioaktive Aufnahmeexperimente an intakten *E. coli* Zellen, die AtER-ANT1 heterolog exprimieren, durchzuführen.

3.1.2.2 Importstudien zur biochemischen Charakterisierung des AtER-ANT1 durch heterologe Expression in *E. coli*

Um die biochemische Funktion des AtER-ANT1 zu klären, mussten die Bedingungen für die Anzucht der *E. coli* Zellen stark optimiert werden. In der Diplomarbeit von LEROCH (2003) wurden die Aufnahmen mit einem Expressionskonstrukt durchgeführt, welches AtER-ANT1 mit einem c-terminalen His-Tag trägt. Weiter wurden die Transportstudien während der Diplomarbeit mit Zellen gemacht, die in YT-Medium angezogen wurden.

Aktiver Transport konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation nur mit den *E. coli* Zellen gemessen werden, die AtER-ANT1 ohne His-Tag heterolog exprimieren. Das Anfügen eines Histidin-Tags an AtER-ANT1 scheint somit die Funktionalität des Transportproteins negativ zu beeinflussen. Zur Optimierung der Aufnahmestudien, wurden die *E. coli* Zellen stets in TB-Medium angezogen und zusätzlich 30 min vor der

Induktion mit Malat und Pyruvat gefüttert, um die „Fitness“ der Zellen zu erhöhen. Weiter konnten erst nach zwei Stunden Induktion der Zellen durch heterolog exprimiertes AtER-ANT1-Protein Aufnahmen nachgewiesen werden. Bei anderen Transportproteinen, die ebenfalls heterolog in *E. coli* exprimiert wurden, konnten Aufnahmen bereits nach einer Stunde Induktionszeit gemessen werden (HAFERKAMP *et al.*, 2002; TJADEN *et al.*, 1999; TJADEN *et al.*, 1998). Abbildung 3.5 zeigt die zeitabhängige Aufnahme von radioaktiv markiertem ATP und ADP durch heterologe Expression von AtER-ANT1 in *E. coli*.

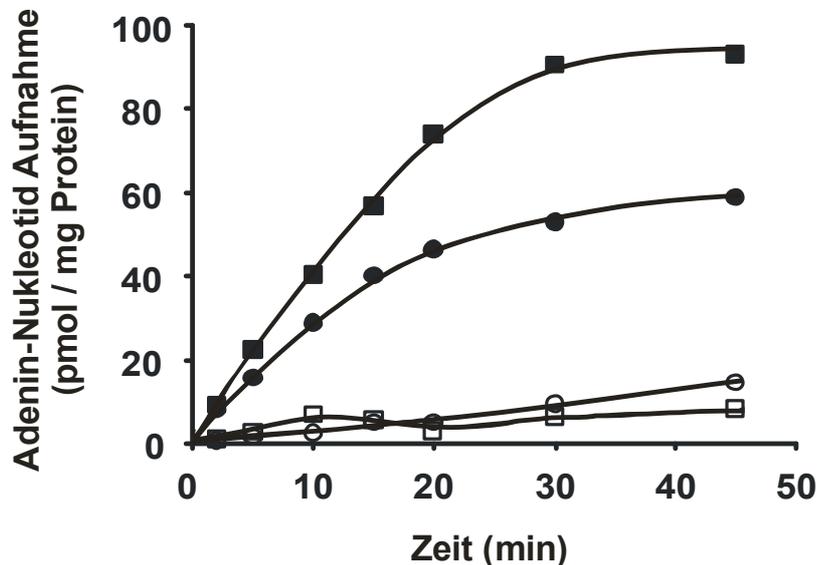


Abbildung 3.5: Zeitabhängige Adeninnukleotid-Aufnahme in intakte *E. coli* Zellen. IPTG-induzierte *E. coli* Zellen, die das AtER-ANT1 codierende Plasmid tragen, wurden mit 100 μM [$\alpha^{32}\text{P}$]-ADP (■) oder [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP (●) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Nicht induzierte *E. coli* Zellen, die ebenfalls das AtER-ANT1 codierende Plasmid tragen, wurden als Kontrolle verwendet (□, ADP und ○, ATP). Die Ermittlung der Aufnahmeraten basiert auf jeweils 4 unabhängigen Experimenten. Der Standarderror (SE) beträgt weniger als 8% der Mittelwerte.

Induzierte *E. coli* Zellen, die AtER-ANT1 heterolog exprimieren sind in der Lage sowohl radioaktiv markiertes ATP als auch ADP zu transportieren. Die Aufnahmen sind bei beiden Substraten über 20 min zeitlinear. Die gemessenen Aufnahmeraten für ADP sind bei einer Endkonzentration des Transportmediums von 100 μM etwas höher als die ermittelten Raten für ATP. Bei nicht induzierten *E. coli* Zellen können unter diesen Bedingungen keine signifikanten Aufnahmeraten für ATP und ADP gemessen werden. Zur Analyse der biochemischen Charakteristika (K_M und V_{MAX}) wurden die Aufnahmeraten für ATP und ADP in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelt. Abbildung 3.6 zeigt die Ergebnisse dieser Aufnahmeexperimente.

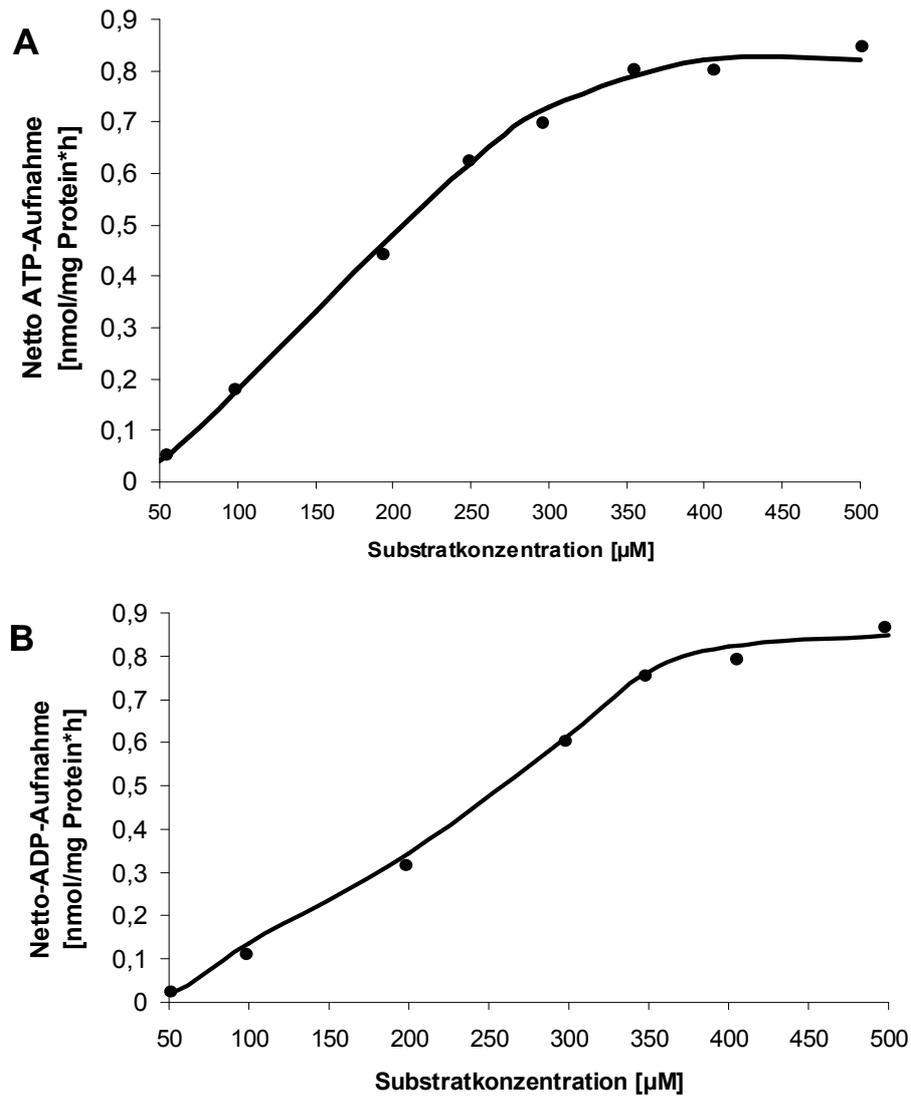


Abbildung 3.6: Bestimmung der biochemischen Charakteristika (K_M ; V_{MAX}) für ATP und ADP von AtER-ANT1 durch heterologe Expression in *E. coli*. Die jeweiligen Aufnahmen wurden im zeitlinearen Bereich von 15 min durchgeführt. A. Ermittlung des K_M -Wertes für ATP; B. Ermittlung der biochemischen Charakteristika für ADP. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils 6 unabhängigen Experimenten, wobei der SE weniger als 8% der Mittelwerte beträgt.

Sowohl die Aufnahme von radioaktiv markiertem ATP als auch die Aufnahme von ADP in Abhängigkeit von der Substratkonzentration zeigt eine typische Michaelis-Menten-Kinetik. Mittels Lineweaver-Burk-Plot konnte für ATP ein K_M von $343,71 \mu\text{M}$ ($\pm 20,44$) und für ADP ein K_M von $327,29 \mu\text{M}$ ($\pm 24,35$) ermittelt werden. Die ermittelten K_M -Werte für beide Substrate sind annähernd identisch. Es handelt sich somit bei AtER-ANT1 um ein niedrig affines Transportprotein. Im Vergleich zu den mitochondrialen AACs mit einem K_M -Wert für ATP und ADP um die $10 \mu\text{M}$ (HAFERKAMP *et al.*, 2002) ist die Affinität bei AtER-ANT1 deutlich geringer für die hier untersuchten Substrate.

Zur Untersuchung des Substratspektrums von AtER-ANT1 wurden Effektorversuche durchgeführt. Dazu wurde der Einfluss von 26 Metaboliten auf die $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP-Aufnahme untersucht. Die Ergebnisse dieser Effektorstudien sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Einfluss verschiedener Metabolite auf die [α^{32} P]-ATP Transportrate von AtER-ANT1. Die ATP-Aufnahme in *E. coli* Zellen, die AtER-ANT1 heterolog exprimieren wurde für 15 min bei einer Substratkonzentration von 200 μ M gemessen. Die zu testenden Metabolite wurden in einem 5fachen Überschuss (1 mM) dem Transportmedium hinzugegeben. Die Daten spiegeln die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten wider, wobei der SE kleiner als 8% der Mittelwerte liegt.

Effektor	Transportrate (%)
Ohne Effektor	100.0
ATP	43.4
ADP	37.5
AMP	99.7
ADP-Glc	94.3
UDP-Glc	102.6
UDP-Gal	105.8
Adenosine	96.8
Adenine	100.9
GTP	98.7
CTP	99.3
UTP	101.4
dATP	100.9
dGTP	102.3
dCTP	97.5
dTTP	100.8
GDP	98.9
IDP	83.8
UDP	93.1
GMP	96.8
IMP	99.1
UMP	98.6
NAD	102.9
NADH	97.5
NADP	92.4
NADPH	98.0
Coenzyme A	97.9

Die Effektorstudien zeigen, dass es sich bei AtER-ANT1 um ein spezifisches Transportprotein für die Substrate ATP und ADP handelt. Lediglich nicht radioaktiv markiertes ATP und ADP führten zu einer Hemmung des [α^{32} P]-ATP-Transportes bei ATP auf 43,4% bzw. bei ADP auf 37,5% der Transportaktivität ohne Effektorzugabe. Alle anderen getesteten Effektoren hatten keinen signifikanten Einfluss auf die [α^{32} P]-ATP-Aufnahme. Dieses enge Substratspektrum deckt sich mit Effektorstudien, die mit mitochondrialen AACs durchgeführt wurden. Auch diese Transportproteine sind spezifisch für ATP und ADP. Zur weiteren Charakterisierung der Transporteigenschaften von AtER-ANT1 wurden Inhibitorstudien durchgeführt. In Tabelle 3.3 sind diese Ergebnisse zusammengefasst. Zum Vergleich des Inhibitorspektrums von AtER-ANT1 mit den klassischen mitochondrialen AACs wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich das Inhibitorspektrum von AtAAC1 analysiert.

Tabelle 3.3: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die [α^{32} P]-ATP Transportrate von AtER-ANT1 und AtAAC1.

Der Transport in *E. coli* Zellen, die zum einen AtER-ANT1 zum anderen AtAAC1 exprimieren wurde über 15 min gemessen. Die [α^{32} P]-ATP Transportrate wurde gemessen bei einer Substratkonzentration von 200 μ M bei AtER-ANT1 oder 10 μ M bei AtAAC1. Die Inhibitoren wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: Bongkrek-Säure (BKA, 10 μ M); Carboxyatractylat (CAT, 1 mM); N-ethylmaleimid (NEM, 1 mM); Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP, 2 mM); Mersalyl (200 μ M); Phenazinmethosulfat (PMS, 500 μ M), Nitrobenzylthioinosin (NBMPR, 100 μ M), Dilazep (200 μ M). Die Daten spiegeln die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten wider, wobei der SE unter 8% der Mittelwerte liegt.

Effektor	Transportrate (%)	
	AtER-ANT1	AtAAC1
Ohne Effektor	100.0	100.0
ADP(5x)	37.5	26.5
BKA	100.9	30.4
CAT	96.8	47.5
NEM	46.2	92.2
PLP	95.9	95.4
AMP-PNP	102.4	98.9
Mersalyl	102.8	93.1
PMS	101.8	96.2
NBMPR	97.3	103.9
Dilazep	97.7	94.1

Wie erwartet ist der pflanzliche mitochondriale AtAAC1 hochsensitiv gegen die Inhibitoren Bongkrek-Säure und Carboxyatractylat (HAFERKAMP *et al.*, 2002). Der ATP-Transport von AtAAC1 konnte mit BKA (10 μ M) auf 30,4% und mit CAT (1 mM) auf 47,5% inhibiert werden. Interessanterweise beeinflussen diese spezifischen Hemmstoffe der mitochondrialen AACs nicht die Transport-Aktivität des in dieser Arbeit zu untersuchenden AtER-ANT1. Ebenfalls unbeeinflusst blieb die Transport-Aktivität des AtER-ANT1 von den Inhibitoren PLP und Mersalyl, die als hochwirksame Inhibitoren der plastidären und peroxisomalen Adeninnukleotid-Transporter bekannt sind (LEROCH *et al.*, 2005, PALMIERI *et al.*, 2001). Lediglich

N-ethylmaleimid, welches aber keinen Einfluss auf die Aktivität von AtAAC1 hat, konnte die Transportrate von AtER-ANT1 auf 46,2% inhibieren. Auch wenn AtER-ANT1 und die mitochondrialen AACs ein gleiches Substratspektrum besitzen, so unterscheiden sie sich stark im Inhibitorspektrum.

Zum Abschluss der biochemischen Charakterisierung von AtER-ANT1 wurde der Transportmodus dieses Proteins über Rücktauschexperimente analysiert. Dazu wurden AtER-ANT1 exprimierende *E. coli* Zellen mit radioaktiv markiertem Substrat vorbeladen und durch exogen appliziertes nicht radioaktiv markiertes Substrat untersucht, ob es zu einem Efflux des zuvor importierten radioaktiv markierten Substrates kommt. Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis der Rücktauschexperimente.

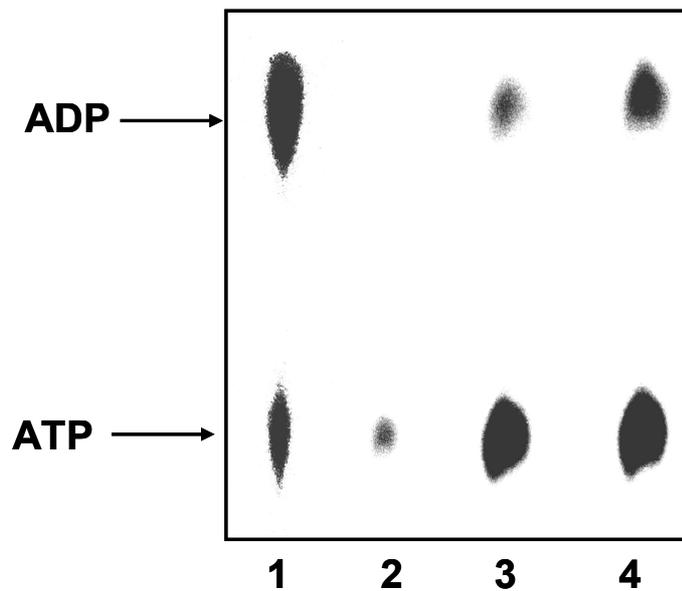


Abbildung 3.7: Dünnschichtchromatographie exportierter Adenin-Nukleotide. *E. coli* Zellen, die *AfER-ANT1* exprimieren wurden mit 50 μM radioaktiv-markiertem $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP vorbeladen. Die vorbeladenen Zellen wurden für 5 min bei Raumtemperatur zu Rücktauschexperimenten eingesetzt. Spur 1: Auftrennung der radioaktiven Komponenten von zerstörten *E. coli* Zellen nach Vorbeladung; Spur 2-4: Auftrennung der radioaktiven Komponenten, die von den *E. coli* Zellen exportiert wurden durch exogen appliziertes Substrat (Spur 2: KPi-Puffer = Kontrolle, Spur 3: 250 μM ATP, Spur 4: 250 μM ADP).

Die Ergebnisse der Rücktauschexperimente zeigen, dass es sich bei dem Transport durch *AfER-ANT1* um einen Gegentauschmechanismus handelt. Werden die *E. coli* Zellen mit radioaktiv markiertem $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP vorbeladen so wird über 60% des ATPs innerhalb von fünf Minuten in radioaktiv markiertes ADP umgesetzt (Abbildung 3.7; Spur 1). Wie in Spur 2 gezeigt, kommt es zu keinem signifikanten Efflux radioaktiv markierter Nukleotide wenn als Rücktauschsubstrat KPi-Puffer angeboten wird. Wird dagegen nicht radioaktiv markiertes ATP oder ADP exogen appliziert, so kommt es in beiden Fällen zu einem starken Efflux von $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP und in geringeren Mengen ebenfalls zu einem Export von $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ADP (Spur 3+4). Abschließend lässt sich sagen, dass *AfER-ANT1* im Vergleich zu den mitochondrialen AACs ATP und ADP im Gegentausch transportiert.

3.1.3 Subzelluläre Lokalisierung des *AfER-ANT1*

Die biochemische Funktion des *AfER-ANT1* als ADP/ATP-Transporter konnte mittels heterologer Expression im *E. coli*-System nachgewiesen werden. Obwohl *AfER-ANT1* im Vergleich zu den klassischen mitochondrialen AACs in *Arabidopsis thaliana* ebenfalls ein ADP/ATP-Transporter darstellt, haben phylogenetische Stammbaumanalysen (siehe Abbildung 3.1) gezeigt, dass dieses Protein nicht direkt in die Gruppe der *AfAACs* eingegliedert wird. Aminosäuresequenzanalysen haben weiter gezeigt, dass sich *AfER-ANT1* besonders durch das Fehlen der N-terminalen Signalsequenz von den klassischen AACs unterscheidet (Abbildung 3.2). Diese Signalsequenz ist essentiell für den korrekten Transport von pflanzlichen Membranproteinen in die innere Mitochondrienmembran (MURCHA *et al.*, 2005). Eine genauere Betrachtung der MCF macht deutlich, dass in diese Gruppe ebenfalls Transportproteine eingegliedert werden, die nicht subzellulär in den Mitochondrien lokalisiert sind (PALMIERI *et al.*, 2001, LEROCH *et al.*, 2005). Mit Hilfe der Computerprogramme Target-P (EMANUELSSON *et al.*, 2000) und

Signal-P (NIELSON *et al.*, 1997) wurde eine subzelluläre Lokalisierung von AtER-ANT1 im sekretorischen Weg vorhergesagt. Aufgrund dieser Analysen, des Fehlens einer N-terminalen Signalsequenz bei AtER-ANT1 und dessen gesonderten Stellung im phylogenetischen Stammbaum der MCF wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die subzelluläre Lokalisierung von AtER-ANT1 detailliert untersucht.

3.1.3.1 Analyse der subzellulären Lokalisierung von AtER-ANT1 mittels GFP-Fusion und transienter Expression in isolierten Tabakprotoplasten

Zur Überprüfung dienten als erstes AtER-ANT1-GFP-Fusionskonstrukte die bereits in der Diplomarbeit von LEROCH (2003) konstruiert wurden. Dabei wurde der Voll-Längenklon von AtER-ANT1 vor das GFP (green fluorescence protein) fusioniert. Das fertige Konstrukt wurde in isolierte Tabakprotoplasten transformiert und die Fluoreszenz durch Verwendung des konfokalen Laserscanning-Mikroskops der Arbeitsgruppe Deitmer (TU Kaiserslautern) ausgewertet. Die Ergebnisse der subzellulären Analysen sind in Abbildung 3.8 gezeigt.

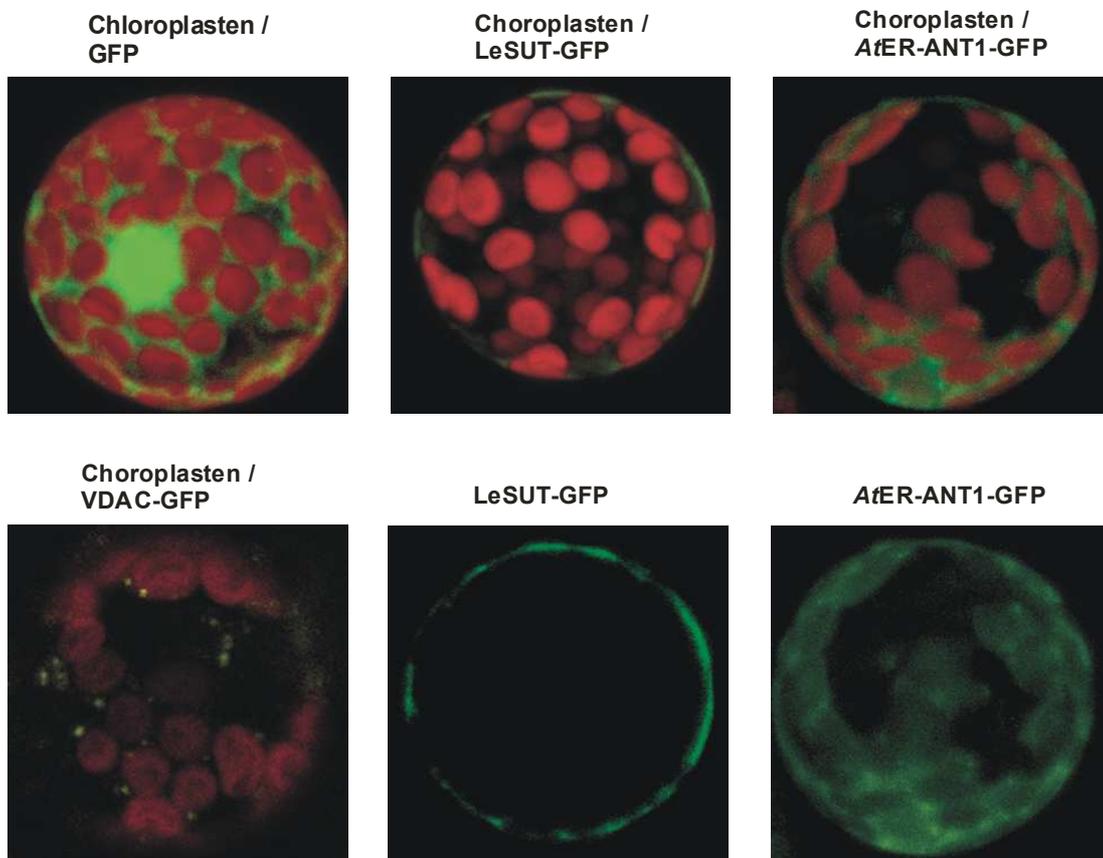


Abbildung 3.8: Transiente Transformation von Tabakprotoplasten mit GFP-Fusions-Konstrukten. Nach Inkubation der Protoplasten für 20 Stunden wurde die Fluoreszenz visualisiert mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Visualisierung der Chloroplasten durch ihre Autofluoreszenz (rot). VDAC: voltage dependent anion channel (Mitochondrienkontrolle); LeSUT: Saccharose-Transporter der Plasmamembran.

Das GFP-Protein alleine ist subzellulär im Kern lokalisiert. Aufgrund seiner Größe von ungefähr 30 kDa kann es weiter durch die Kernporen in das Zytosol wandern. Andere Organell-Membranen können von GFP alleine nicht überquert werden (GREBENOK *et al.*, 1997).

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zeigt eine subzelluläre Lokalisierung von *A*tER-ANT1 im Endoplasmatischen Retikulum. Die Fluoreszenz des transient exprimierten *A*tER-ANT1-GFP-Proteins zeigt ein ausgedehntes Netzwerk, welches typisch für ER-Strukturen in Pflanzen ist (BRANDIZZI *et al.*, 2004). Außerdem unterscheiden sich die Fluoreszenzen von *A*tER-ANT1 zweifellos von allen hier gezeigten Kontrollen (Abbildung 3.8). Eine mögliche Lokalisierung von *A*tER-ANT1 in der Vakuolen-Membran konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, indem die Autofluoreszenz der Chloroplasten gleichzeitig mit der Grünfluoreszenz sichtbar gemacht wurde. Im Tonoplasten, erkennbar in der Chloroplasten-freien Region, konnte keine Fluoreszenz durch *A*tER-ANT1 detektiert werden.

Für weitere Analysen der GFP-Fusionskonstrukte wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert der Firma Zeiss gearbeitet, welches eine höhere Auflösung und somit eine detailliertere Studie der transformierten Tabakprotoplasten ermöglichte. Abbildung 3.9 zeigt die Ergebnisse der transient transformierten Tabakprotoplasten mit diesem Mikroskop.

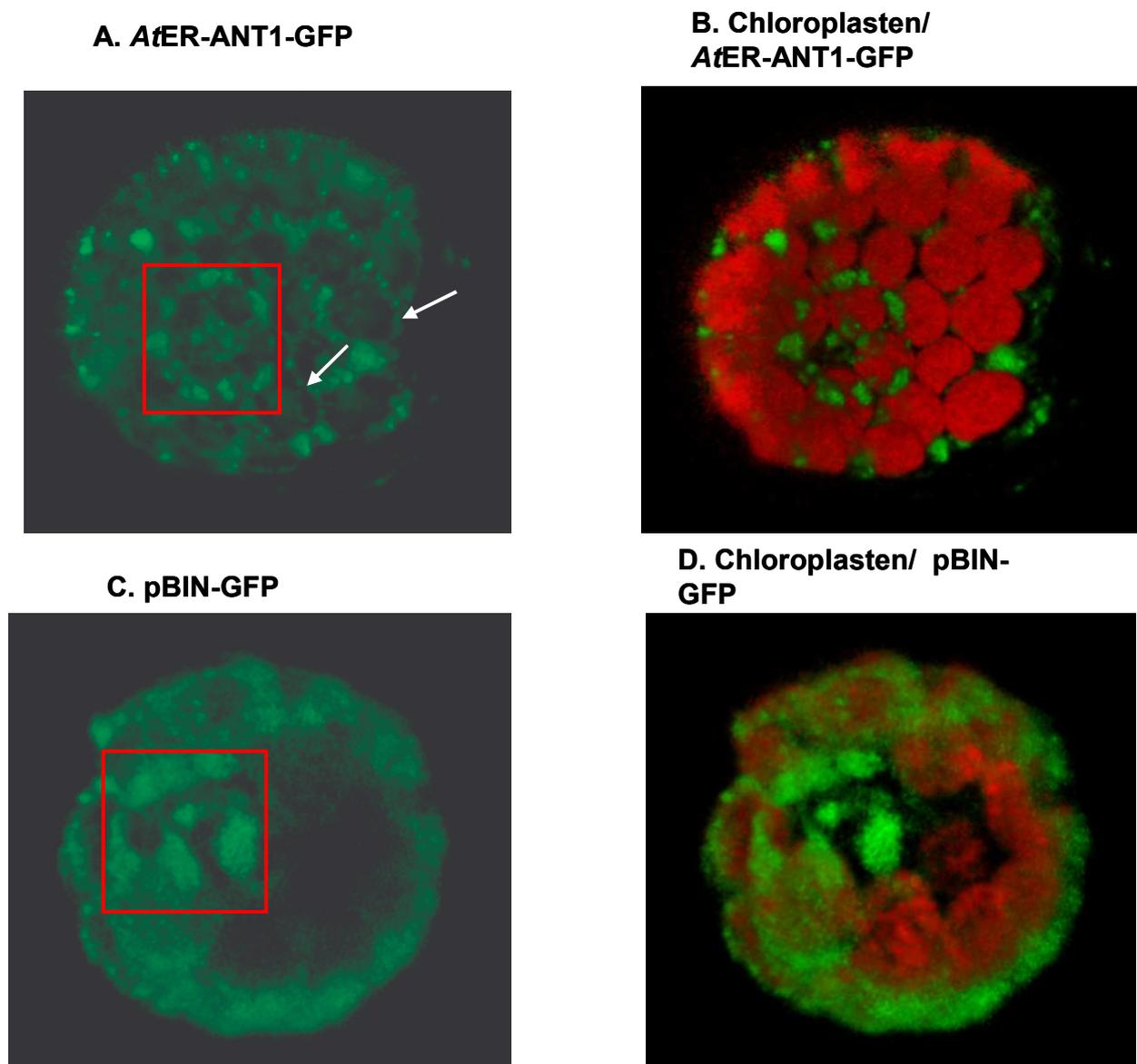


Abbildung 3.9: Transiente Transformation von Tabakprotoplasten mit GFP-Fusions-Konstrukten. Nach Inkubation der Protoplasten für 20 Stunden wurde die Fluoreszenz visualisiert mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert der Firma Zeiss. Visualisierung der Chloroplasten durch ihre Autofluoreszenz (rot). pBIN: pGFP₅-Konstrukt mit ER-Kontrollprotein. Rotes Rechteck: Visualisierung der Kernregion; weiße Pfeile: Erläuterung siehe Text.

Abbildung 3.9 (A) zeigt deutlich, dass die Fluoreszenz von *AfER-ANT1* diffus im Protoplasten verteilt ist. Durch die verbesserte Auflösung des verwendeten Mikroskops kann eine verstärkte Lokalisierung von *AfER-ANT1* in der Umgebung des Kerns beobachtet werden (rotes Rechteck, Abb. 3.9 A). An der Stelle, wo die grüne Fluoreszenz am Stärksten zu sehen ist, befinden sich keine Chloroplasten (Abb.3.9 B). Die weißen Pfeile in Abbildung 3.9 (A) zeigen die netzwerkartige Struktur, die typisch für eine Lokalisierung des Endoplasmatischen Retikulums ist. Weiter wurde mit einem ER-GFP-Fusionsprotein als ER-Kontrolle gearbeitet (pBin), das freundlicherweise von Prof. Antje von Schaewen (Universität Münster) zur Verfügung gestellt wurde. Beim Vergleich der Fluoreszenz von *AfER-ANT1* und pBin fällt auf, dass auch bei pBIN besonders die Umgebung des Kerns stark fluoresziert (Abb. 3.9 A, rotes Rechteck). Ansonsten ist die Fluoreszenz ebenfalls wie bei *AfER-ANT1* (Abbildung 3.8 und 3.9) wolkig im Protoplasten verteilt.

3.1.3.2 Analyse der subzellulären Lokalisierung von *AfER-ANT1* mittels *in vitro*-Translation und Targeting in ER-Mikrosomen

Die Analyse der subzellulären Lokalisierung durch eine Fusion des kompletten Proteins mit dem GFP führt häufig zu einem Fusionsprotein, welches in Bezug auf seine molekulare Masse sehr groß wird. Aufgrund dieser Tatsache besteht die Möglichkeit, dass große Fusionsproteine, die durch das Endoplasmatische Retikulum geschleust werden, eventuell in der Membran des ER stecken bleiben und nicht an ihren tatsächlichen Lokalisierungsort *in vivo* transportiert werden können. Die Fusion von *AfER-ANT1* mit dem GFP ergibt ein Fusionsprotein von rund 60 kDa. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass *AfER-ANT1* in der Membran eines anderen Zellkompartimentes lokalisiert ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Analysen zur subzellulären Lokalisierung durchgeführt.

Eine weitere Methode zur Analyse der Lokalisierung von Membranproteinen stellen *in vitro*-Translationsexperimente dar, bei denen die zu untersuchenden Proteine in einem zellfreien System in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin, welches zur radioaktiven Markierung der Proteine dient, synthetisiert werden. Diese *in vitro*-translatierten Proteine stehen daraufhin Targeting-Experimenten mit isolierten Zellorganellen zur Verfügung. Da bisher keine Methode existiert um pflanzliches ER zu reinigen, wurden für die Targeting-Experimente von *AfER-ANT1* isolierte ER-Mikrosomen aus Hundepankreas, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Zimmermann (Abteilung Medizinische Biochemie, Homburg) zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Als Negativkontrolle diente der mitochondrial lokalisierte *AtAAC1*. In Abbildung 3.10 ist das Ergebnis der *in vitro*-Translationsexperimente mit anschließendem Targeting in ER-Mikrosomen gezeigt.

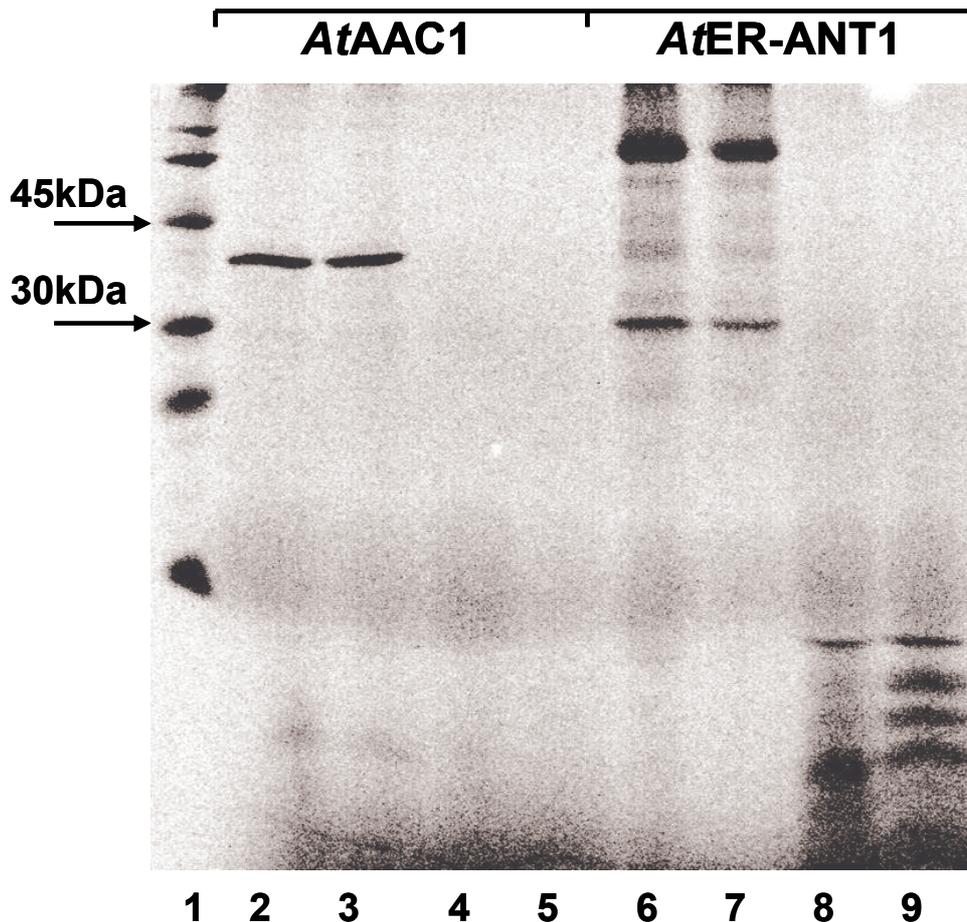


Abbildung 3.10: *In vitro* Translation von *AtAAC1* und *AtER-ANT1* mit anschließendem Targeting in ER-Mikrosomen. Spur 1: Marker; Spur 2-5: *AtAAC1*; Spur 6-9: *AtER-ANT1*; Spur 2+6: *in vitro* Translationsprodukt ohne Targeting; Spur 3+7: *in vitro* Translationsprodukt mit Targeting in ER-Mikrosomen und Saccharosebehandlung; Spur 4+8: *in vitro* Translationsprodukt mit Targeting in ER-Mikrosomen und Triton/Trypsin-Behandlung; Spur 5+9: *in vitro* Translationsprodukt mit Targeting in ER-Mikrosomen und Trypsinbehandlung. Die Proben wurden zur Analyse einer SDS-Page unterzogen. Die Detektion der mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markierten Proteine erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl *AtAAC1* als auch *AtER-ANT1* im zellfreien Retikulozyten-Lysat *in vitro*-translatiert werden (Spur 2+6). Die molekulare Masse beträgt etwa 42 kDa bei *AtAAC1* und rund 32 kDa bei *AtER-ANT1*. Allerdings zeigt sich ebenfalls, dass bei *AtER-ANT1* ein zusätzliches radioaktiv markiertes Produkt entsteht, welches nicht der molekularen Masse von rund 32 kDa entspricht sondern eine Größe von etwa 60 kDa aufweist. Trotz mehrfacher Überprüfung und Neukonstruktion des verwendeten Konstruktes kam es bei der *in vitro* Translation von *AtER-ANT1* stets zu diesem zusätzlichen Produkt. Obgleich es relativ unwahrscheinlich ist, könnte die Möglichkeit bestehen, dass es sich bei diesem 60 kDa Produkt um die dimerisierte Form des *AtER-ANT1* handelt.

Obwohl *AtAAC1* mitochondrial lokalisiert ist, kommt es zu einem Targeting dieses Proteins in die ER-Membran (Spur 3). Auch bei *AtER-ANT1* kann ein Targeting in die Membran der ER-Mikrosomen beobachtet werden (Spur 7). Da *AtAAC1* ebenfalls ein Targetingverhalten in die ER-Mikrosomen zeigt, konnte auf diese Weise noch keine Aussage über die subzelluläre Lokalisierung von *AtER-ANT1* gemacht werden. Um zu untersuchen, ob es zu einem richtigen Membraneinbau bzw. einer Assoziation an die ER-Mikrosomen kommt, wurden die Targeting-Ansätze von *AtAAC1* und *AtER-ANT1* einem

zusätzlichen Trypsinverdau bzw. Trypsin/Triton-Verdau unterzogen. Die Protease Trypsin spaltet dabei ein Protein zwischen den Aminosäuren Lysin und Arginin. Wird ein Protein in eine Membran integriert, so ist dieses vor Trypsinverdau geschützt. Die Protease kann nur an den hydrophilen Bereichen des in die Membran integrierten Proteins angreifen, was zu einer Fragmentierung aber nicht zum kompletten Abbau des Proteins führt. Bei dem Ansatz Trypsin+Triton kommt es zum Herauslösen des integrierten Proteins aus der ER-Membran, so dass Trypsin an allen Lysin/Arginin-Stellen des Proteins angreifen kann. Im Falle von *AtAAC1* scheint es sich bei dem Targeting um eine Assoziation an die ER-Membran zu handeln. Spur 5 zeigt, dass bei Trypsinbehandlung keine Bereiche von *AtAAC1* in der Membran geschützt vorliegen. Die Analysen bezüglich *AtER-ANT1* zeigen andere Ergebnisse. Nach Trypsinbehandlung zeigt sich, dass große Teile des Proteins geschützt sind, die nach Trypsin und Tritonbehandlung fast vollständig abgebaut werden. Die Ergebnisse sprechen also für eine mögliche Integration von *AtER-ANT1* in die ER-Mikrosomen. Bei der Auswertung der Ergebnisse muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass das bei der *in vitro* Translation von *AtER-ANT1* zusätzlich synthetisierte Protein von rund 60 kDa nach der Behandlung mit Trypsin bzw. Trypsin/Triton ebenfalls nicht mehr detektierbar ist. Es lässt sich somit nicht ausschließen, dass die erhaltenen Fragmente (Spur 8+9) von dem großen *in vitro* Translations-Produkt stammen und nicht von *AtER-ANT1*.

3.1.3.3 Analyse der subzellulären Lokalisierung von *AtER-ANT1* mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation und Antikörper-Nachweis

Zur weiteren Überprüfung, ob *AtER-ANT1* tatsächlich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist, wurde im Verlauf dieser Doktorarbeit eine Methode zur Isolierung von ER-Membranen aus Pflanzen über Saccharosedichtegradientenzentrifugation etabliert. Zum Nachweis von *AtER-ANT1* in der ER-Membran wurden dazu transgene *AtER-ANT1*-c-Myc-Tag Pflanzen hergestellt. In diesen Pflanzen wird *AtER-ANT1* konstitutiv durch einen starken 35S-Promotor exprimiert. Das daraus resultierende *AtER-ANT1*-c-Myc-Tag Protein zeichnet sich durch eine zusätzliche c-terminale Sequenzerweiterung von 10 Aminosäuren (Myc-Tag) aus, die dann über einen spezifischen Anti-c-Myc-Tag-Antikörper nachgewiesen werden kann. Die Herstellung des *AtER-ANT1*-c-Myc-Tag-Konstruktes zur Generierung transgener *Arabidopsis* Pflanzen ist im Detail in Abbildung 3.11 dargestellt.

Nach Fertigstellung dieses Konstruktes (pM119) wurde das Plasmid in *Agrobakterien* transformiert. Die Transformation der *Arabidopsis* Pflanzen erfolgte durch Verwendung der floralen Dip-Methode.

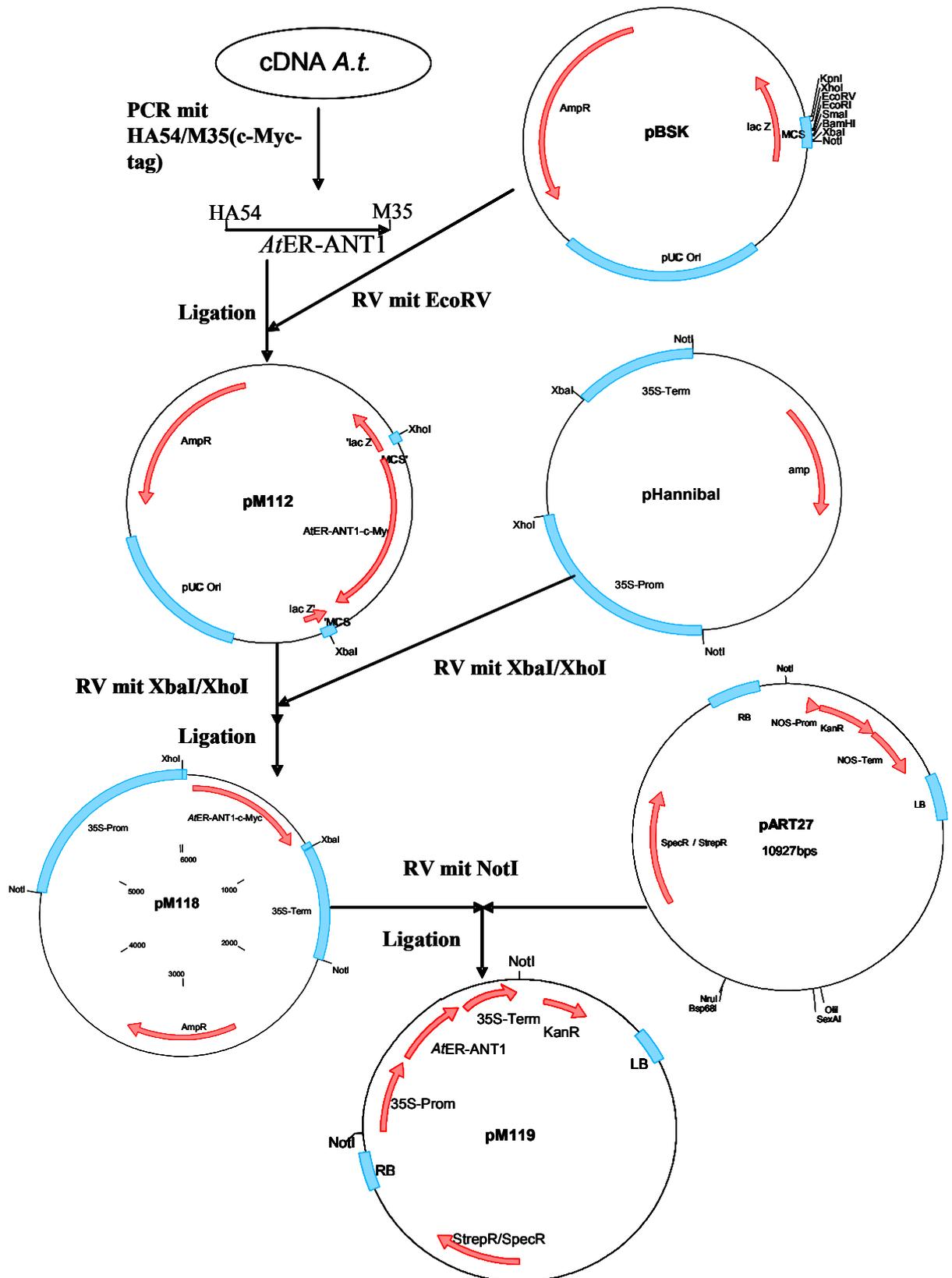


Abbildung 3.11: Klonierungsstrategie zur Herstellung transgener *AtER-ANT1*-c-Myc-tag Pflanzen.

PCR: Polymerasekettenreaktion; RV: Restriktionsverdau; AmpR: Ampicillinresistenz; KanR: Kanamycinresistenz; StrepR: Streptomycinresistenz; SpecR: Spectinomycinresistenz; MCS: "multiple cloning site"; 35S-Prom: 35S-Promotor; 35S-Term: 35S-Terminator; RB: Right Border; LB: Left Border

Pflanzen, die positiv mit dem *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* Konstrukt transformiert wurden, konnten über eine zusätzlich erworbene Kanamycin-Resistenz selektiert werden. Die identifizierten *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* Pflanzen wurden auf ihren Transkriptgehalt bezüglich des zu untersuchenden Gens über quantitative RT-PCR überprüft. Die stärksten Linien wurden anschließend zur Ermittlung des mRNA-Gehaltes einem Northern-Blot mit spezifischer *AtER-ANT1-c-Myc-Tag*-Sonde unterzogen. Dazu wurde jeweils die Gesamt-RNA aus Blattmaterial der *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* Pflanzen isoliert. In Abbildung 3.12 ist das Ergebnis der quantitativen RT-PCR dargestellt.

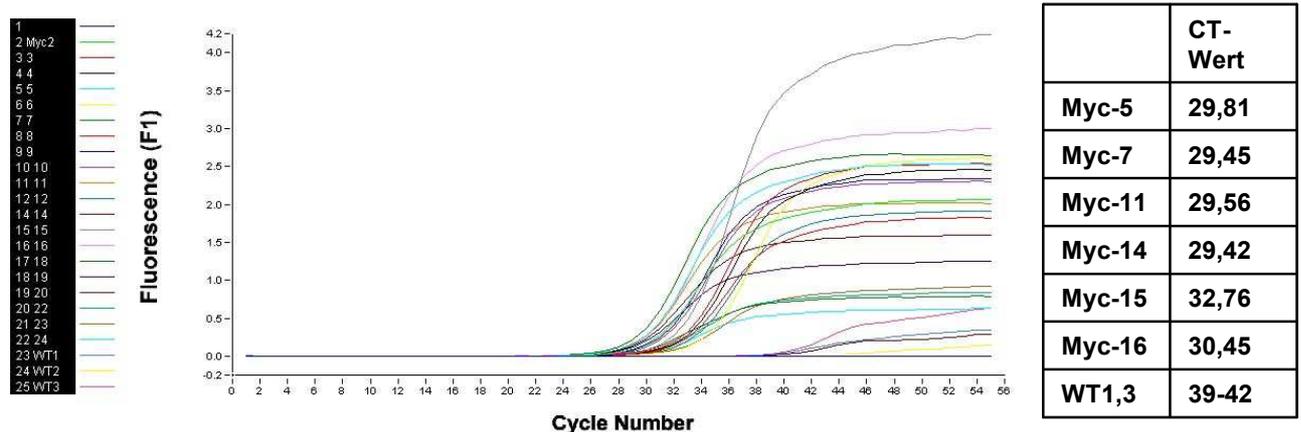


Abbildung 3.12: Quantitative RT-PCR der auf Kanamycin-haltigen Agarplatten erworbenen positiven *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* Pflanzen. X-Achse: Anzahl der Zyklen; Y-Achse: Menge der eingebauten Fluoreszenz; linker Rand der Graphik: Benennung der einzelnen getesteten Pflanzen; Tabelle zeigt die errechneten CT-Werte einzelner Linien.

In Abbildung 3.12 ist der Verlauf der quantitativen RT-PCR von 24 unabhängigen *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* Linien dargestellt. Jede einzelne *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* Pflanze lieferte im Verlauf der RT-PCR unterschiedlich viel PCR-Produkt. In der Tabelle in Abbildung 3.12 sind die CT-Werte der interessantesten *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* Linien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen dargestellt. Dabei gibt der CT-Wert diejenige Zyklus-Zahl an, bei der während der PCR ein PCR-Produkt gebildet wurde. Ein CT-Wert von etwa 40 bedeutet, dass *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* nicht exprimiert wird, was auch bei der Betrachtung der Kurvenverläufe deutlich wird. Die Pflanzen, bei denen besonders viel *AtER-ANT1-c-Myc-Tag*-Transkript während der quantitativen RT-PCR geliefert wird, besitzen einen CT-Wert von 29-32. Da dieses Ergebnis noch keinen endgültigen Aufschluss auf den mRNA-Gehalt von *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* gibt, wurde von den Linien *AtER-ANT1-c-Myc* 7,11,15 und 16 eine Northernblot-Analyse durchgeführt. Dabei diente isolierte RNA von Wildtyppflanzen als Negativkontrolle. Als Sonde wurde speziell der c-terminale Bereich von *AtER-ANT1* inklusive *Myc-Tag* eingesetzt. In Abbildung 3.13 ist das Ergebnis der Northernblot-Analyse gezeigt.

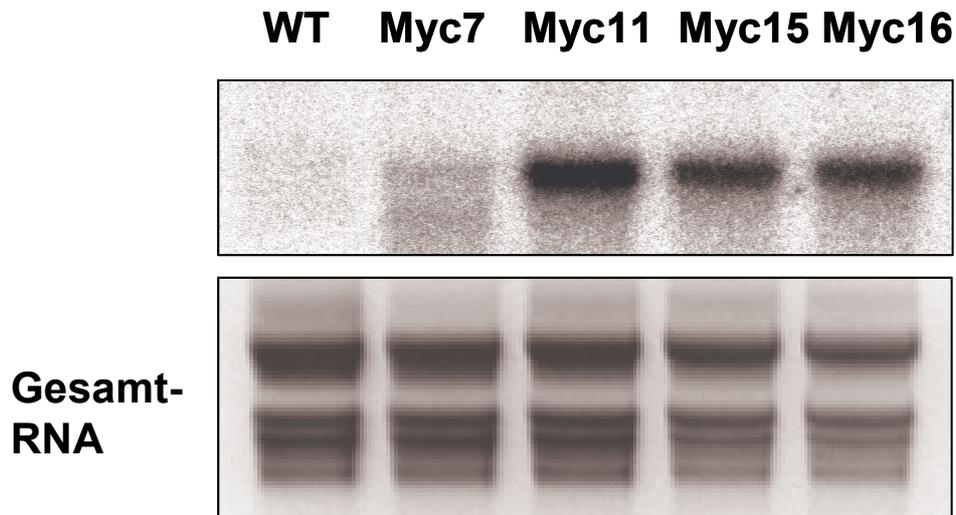


Abbildung 3.13: Northernblot-Analyse der stärksten *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* Linien nach quantitativer RT-PCR. Die RNA wurde in allen getesteten Linien aus grünem Blattmaterial isoliert. Pro Spur wurden 8 µg RNA aufgetragen. Die Bezeichnung der einzelnen Linien ist der Abbildung zu entnehmen.

Anhand der Northernblot-Analyse zeigt sich, dass besonders die Pflanzen *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* 11, 15 und 16 einen stark erhöhten mRNA-Gehalt des Zielgens aufweisen. Bei der Wildtyp-Pflanze hingegen konnte kein Produkt durch die *AtER-ANT1-c-Myc-Tag*-Sonde nachgewiesen werden.

Da der mRNA-Gehalt innerhalb einer Pflanze nicht zwangsläufig Aufschluss über den tatsächlichen Gehalt des korrespondierenden Proteins gibt, wurde im weiteren Verlauf mit den transgenen Linien 11, 15 und 16 eine Westernblot-Analyse durchgeführt, welche in Abbildung 3.14 dargestellt ist.

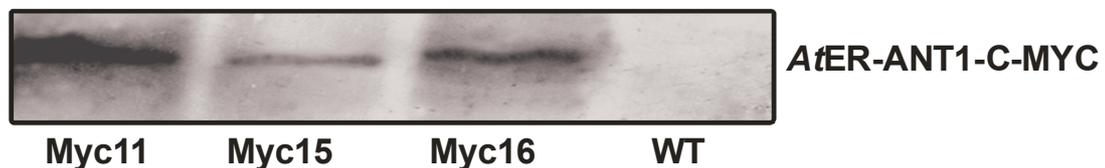


Abbildung 3.14: Westernblot-Analyse der *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* Linien 11, 15 und 16. Zur Analyse wurden Gesamt-Membranen aus den jeweiligen Pflanzen isoliert, über SDS-Page aufgetrennt (50 µg Protein je Spur) und das zu untersuchende Protein unter Einsatz eines spezifischen Anti-c-Myc-Tag-Antikörpers nachgewiesen.

In allen drei untersuchten transgenen Linien kann ein Signal mittels Anti-c-Myc-Tag-Antikörper nachgewiesen werden, wohingegen keine Detektion von *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* in Gesamt-Membranen von Wildtyp-Pflanzen sichtbar ist. Da die untersuchte Linie *AtER-ANT1-c-Myc-Tag* 11 sowohl über Northernblot- als auch über Westernblot-Analyse das stärkste Signal lieferte, wurde im weiteren Verlauf mit Pflanzenmaterial dieser Linie weitergearbeitet.

Zur Analyse der subzellulären Lokalisierung von *AtER-ANT1* wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit eine Methode zur Trennung von ER-Membranen mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation etabliert. Dabei wurden die Saccharosegradienten sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Mg^{2+} durchgeführt. Die Assoziation von Ribosomen an die ER-Membran ist abhängig von der Anwesenheit von Mg^{2+} . Abwesenheit von Mg^{2+} führt zur Dissoziation der Ribosomen von den ER-Membranen. Dadurch werden die ER-Membranen im Saccharosegradienten leichter. Es kommt zu einem

„Shift“ der ER-Membranen von höheren zu niedrigeren Saccharosekonzentrationen (CHEN *et al.*, 2002). Alle anderen zellulären Membranorganellen weisen dieses Mg^{2+} -abhängige Verhalten innerhalb des Saccharosegradienten nicht auf. Zur Überprüfung, ob AtER-ANT1 im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist wurde das Protein der transgenen AtER-ANT1-c-Myc-Tag-Pflanze 11 in den einzelnen Fraktionen der Saccharosedichtegradienten ($\pm Mg^{2+}$) mit Hilfe eines spezifischen Anti-c-Myc-Tag-Antikörpers nachgewiesen. Als Kontrolle für die Lokalisierung des Endoplasmatischen Retikulums innerhalb des Gradienten diente ein spezifischer Antikörper der gegen das ER-Protein Calretikulin gerichtet ist (PAGNY *et al.*, 2000). Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Rebecca Boston (Department of Botany, NC State University, Raleigh) zur Verfügung gestellt. Für die Detektion anderer Kompartimentmembranen wurden ebenfalls spezifische Antikörper eingesetzt. Dabei wurde der Plasmamembran-Antikörper (Mak246 = Anti- H^+ -ATPase) von Dr. Wolfgang Michalke (Institut für Biologie, Universität Freiburg) und der Vakuolen-spezifische Antikörper (VM23) von Prof. Masayoshi Maeshima (Laboratory of Cell Dynamics, Nagoya University, Japan) freundlicherweise für die Analysen zur Verfügung gestellt. Für die Detektion der Mitochondrien wurde der Anti-CoxII-Antikörper verwendet, der spezifisch gegen die in der Mitochondrienmembran lokalisierte Cytochrom-Oxidase gerichtet ist.

Die Lokalisierung der Thylakoidmembranen wurde durch Bestimmung der Chlorophyllkonzentration in den einzelnen Fraktionen ermittelt. Das Ergebnis der subzellulären Analyse von AtER-ANT1 mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation ist in der folgenden Abbildung 3.12 (siehe nächste Seite) dargestellt.

Dabei zeigt die Abbildung 3.12 eindeutig, dass AtER-ANT1 mit dem ER-spezifischen Protein Calretikulin kolokalisiert. Beide Proteine sind im Gradienten mit Mg^{2+} in den Fraktionen 6 und 7 lokalisiert, bei dem Gradienten ohne Mg^{2+} hingegen in den Fraktionen 11 und 12. In Abwesenheit von Mg^{2+} kommt es somit bei beiden Proteinen zu einem typischen ER-„Shift“ um 5 bis 6 Fraktionen. Weiter fällt auf, dass nur AtER-ANT1 und das Calretikulin zu einer derart signifikanten Verschiebung befähigt sind wenn Mg^{2+} im Saccharosegradienten fehlt. Die Mitochondrienmembran zeigt dagegen bei Mg^{2+} -Abwesenheit eine Verschiebung zu hohen Saccharosekonzentrationen. Alle anderen Membranen zum Beispiel die Plasmamembran, Vakuolen- oder Thylakoid-Membran zeigen keinen signifikanten Shift in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Anwesenheit. Weiter konnte für alle anderen Zellorganellen gezeigt werden, dass sie nicht mit AtER-ANT1 weder in An- noch in Abwesenheit von Mg^{2+} kolokalisieren.

Mit Hilfe der Saccharosedichtegradientenzentrifugation konnten somit die erhaltenen Ergebnisse der GFP-Fusion, dass AtER-ANT1 in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist, nochmals *in planta* bestätigt werden.

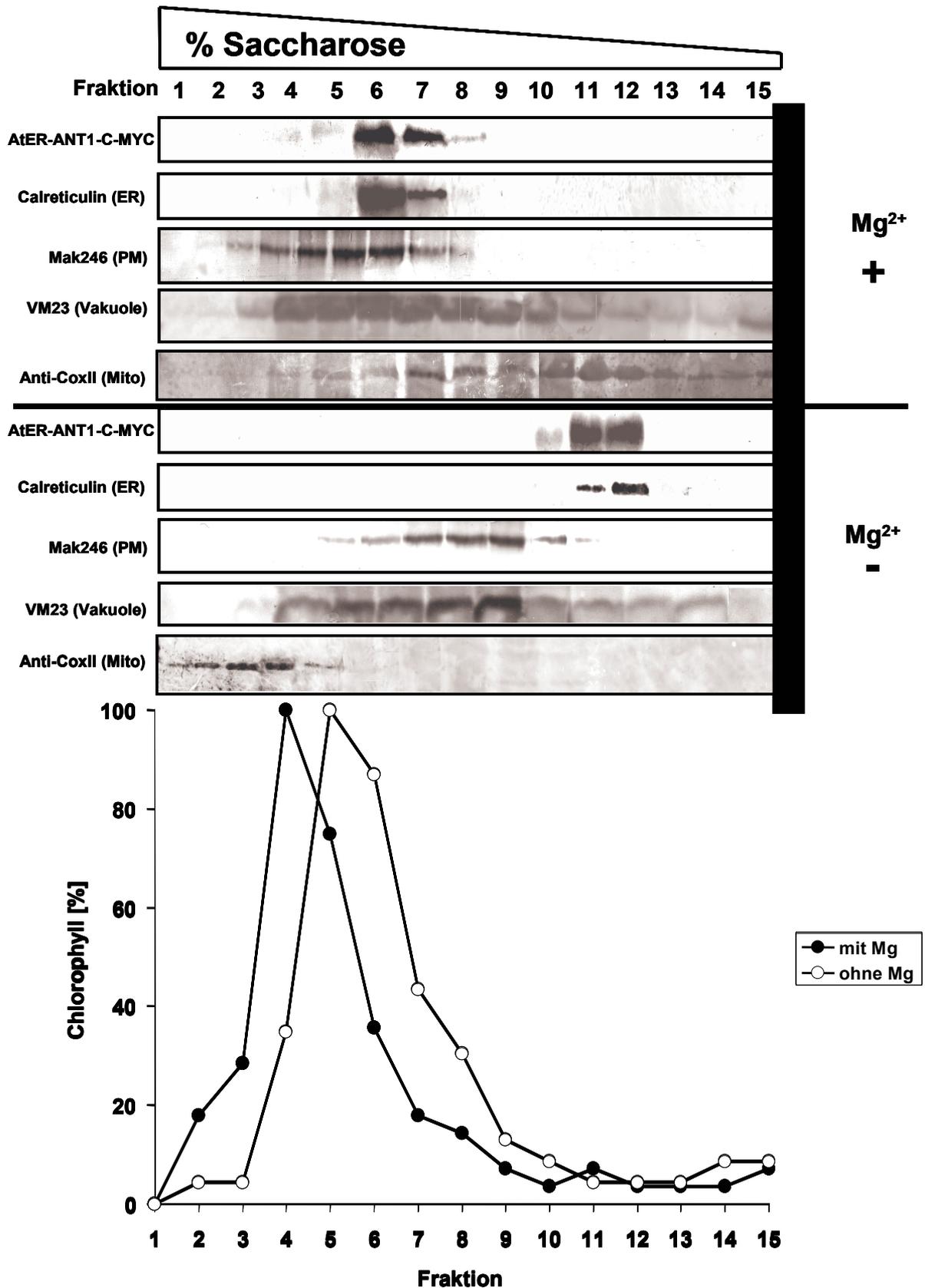


Abbildung 3.12: Saccharosedichtegradientenzentrifugation in An- bzw. Abwesenheit von Mg²⁺. Die Detektion der Proteine erfolgte nach Auftrennung der einzelnen Fraktionen mittels SDS-Page mit anschließendem Immunoblot. Dazu wurden folgende Antikörper verwendet: 1. AtER-ANT1-c-Myc-Tag: Myc-tag spezifischer Antikörper; 2. ER-Membran: Anti-Calretikulin-Antikörper; 3. Plasmamembran: Anti-Mak246-Antikörper (H⁺-ATPase); 4. Vakuole: VM23-Antikörper; 5. Mitochondrien: Anti-CoxII-Antikörper; 6. Plastiden: Detektion über Bestimmung der Chlorophyllkonzentration in den einzelnen Fraktionen.

In der Arbeit von GERHOLD (2004) konnte mit Hilfe des „Geneatlas“ eine erhöhte gewebespezifische Expression von *AtER-ANT1* in den Staubblättern (9561), der Blüte (2576), den Samen (2335) sowie in den Embryonen (4026) im Vergleich zu anderen untersuchten Geweben gezeigt werden. Die erhöhten Transkriptlevel lassen sich unter Einbeziehung neuer Micro-Arrays auch heute noch bestätigen. Micro-Arrays bezüglich der Pollen von *Arabidopsis thaliana* waren zu dieser Zeit noch nicht verfügbar. Seit der Veröffentlichung des Pollentranskriptoms (PINA *et al.*, 2005) sind diese Array-Daten ebenfalls im „Geneatlas“ integriert. Die Betrachtung des vorhandenen Transkriptlevels für *AtER-ANT1* zeigt eine extrem hohe Expression dieses Gens in den Pollen. Es wird eine Signalstärke von gemittelt 99714 erreicht. Die Expressionserhöhung ist damit ca. 100-fach höher als der durchschnittliche Expressionslevel aller anderen Gewebetypen (gemittelt rund 862; ausgenommen Pollen und Staubblätter).

Die Ergebnisse zeigen weiter, dass Internetstudien bezüglich der Expression zwar Hinweise geben, aber die Ergebnisse auch sehr stark davon abhängen, welche Datenchips existieren und wie diese ausgewertet werden. So werden hohe Expressionslevel in lokal begrenzten Zelltypen, wie z.B. Pollen oder Wurzelspitze häufig unterschätzt.

Um diese Hinweise näher bzw. detaillierter zu überprüfen wurde die gewebe- und entwicklungspezifische Expression von *AtER-ANT1* über *AtER-ANT1*-Promotor-GUS-Fusionskonstrukte *in planta* analysiert. Der Vorteil dieser Untersuchungen ist, dass nicht nur ganze Gewebe untersucht werden können, sondern dass zudem verschiedene Zelltypen eines Gewebes analysierbar sind. Zur Analyse wurden 15 unabhängige *AtER-ANT1*-Promotor-GUS-Linien untersucht. Alle überprüften Linien zeigen identische Expressionsmuster, die lediglich in der Intensität der GUS-Färbung variieren. Abbildung 3.14 zeigt die gewebespezifische Expression des *AtER-ANT1*.

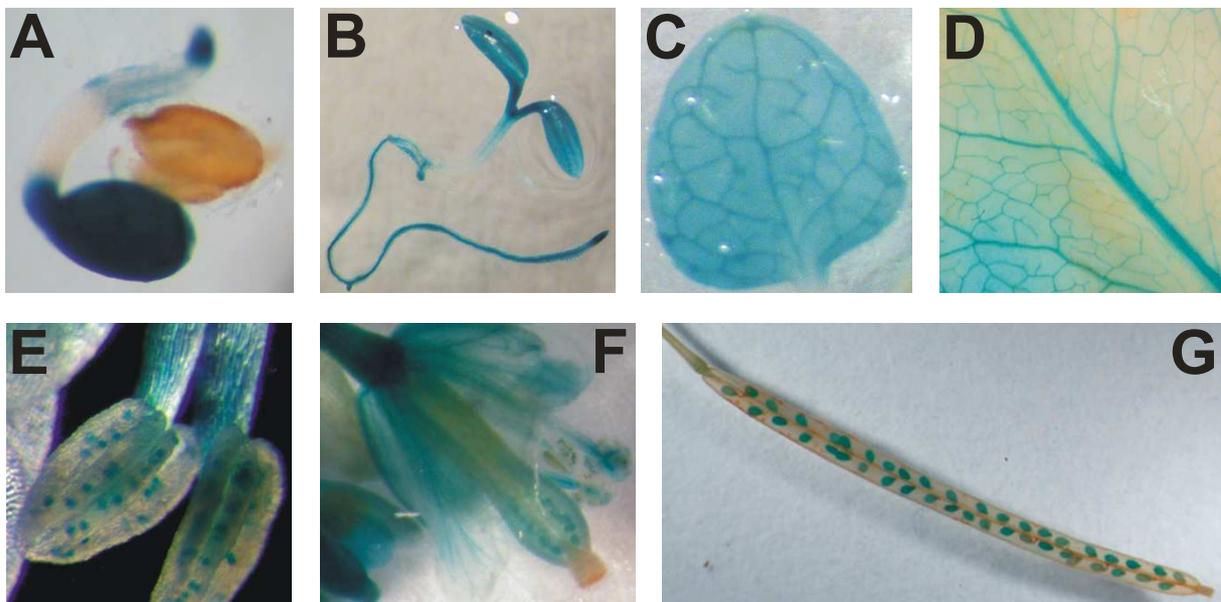


Abbildung 3.14: Histochemische Färbung der GUS-Expression unter Kontrolle des *AtER-ANT1* Promotors in *Arabidopsis thaliana*. A. 2 Tage alter Keimling; B. 4 Tage alter Keimling; C. Junges Blatt einer 2 Wochen alten Pflanze; D. vergrößertes Blatt einer 3 Wochen alten Pflanze; E. Antheren mit Pollen; F. geöffnete Blüte; G. sich entwickelnde Schote

Bei Betrachtung der GUS-Färbungs-Ergebnisse fällt auf, dass eine hohe Expression von *AtER-ANT1* besonders in Geweben mit hoher ER-Aktivität auftritt. Die gefärbten Gewebe besitzen einen hoch aktiven ER-Metabolismus, der wichtig ist für das Zellwachstum, die Zellelongation bzw. für Polysaccharid- und Protein-Sekretion. In zwei Tage alten Keimlingen tritt eine erhöhte Expression in der Wurzelspitze und in den sich entwickelnden Keimblättern auf (Abb. 3.14 A). Bei den 4 Tage alten Keimlingen kann eine starke Expression besonders in der Wurzelspitze, sowie in der meristematischen Zone des Hypokotyls beobachtet werden (Abb. 3.14 B). Die Leitgefäße von sich entwickelnden Blättern, wo die Phloembeladung stattfindet, zeigen eine starke Promotoraktivität (Abb. 3.14 C+D). Ebenfalls eine erhöhte Expression kann in der Blüte, besonders an der Blütenbasis, in den Leitgeweben der Blüte, in den Samenanlagen des Fruchtknotens, in den Staubblättern, sowie in den Pollen der Antheren beobachtet werden (Abb. 3.14 F). Weiter konnte eine sehr starke *AtER-ANT1*-Promotor-Aktivität in sich entwickelnden Arabidopsis Samen (Abb. 3.14 G) detektiert werden, wo das Endoplasmatische Retikulum eine wichtige Funktion im Lipid- und Speicherprotein-Metabolismus erfüllt (VIGOLAS *et al.*, 2003).

3.1.5 Analyse von zwei unabhängigen *AtER-ANT1* Knockout-Linien

Zur weiteren Analyse der physiologischen Rolle von *AtER-ANT1* wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unabhängige Knockout-Linien bezüglich *AtER-ANT1* isoliert und umfangreich untersucht. Dazu wurden zwei unabhängige *AtER-ANT1*::T-DNA *Arabidopsis* Mutanten von der SALK-Bibliothek erworben (Knockout-Linie1: SALK_043626; Knockout-Linie2: SALK_023441). In Abbildung 3.15 ist die T-DNA-Insertion beider Knockout-Linien in das *AtER-ANT1*-Gen schematisch dargestellt.

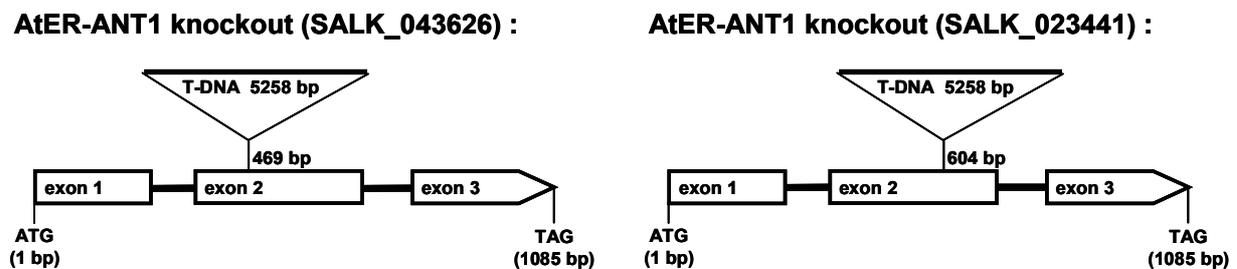


Abbildung 3.15: Stelle der T-DNA-Insertion in zwei unabhängige *AtER-ANT1* Knockout-Linien. KO1: SALK_043626; KO2: SALK_023441.

Bei beiden *AtER-ANT1* Knockout-Linien wurde die T-DNA in Exon 2 inseriert. Im Falle von KO1 bei Basenpaar 469 und bei KO2 in Basenpaar 604. Nach Selbstbestäubung der erhaltenen heterozygoten *AtER-ANT1*::T-DNA Pflanzen wurde nach homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen für beide Linien gesucht. Die homozygoten Knockout-Pflanzen wurden mittels spezifischer Primer und PCR identifiziert. Abbildung 3.16 zeigt das Ergebnis der PCR-Analysen für beide unabhängigen Linien.

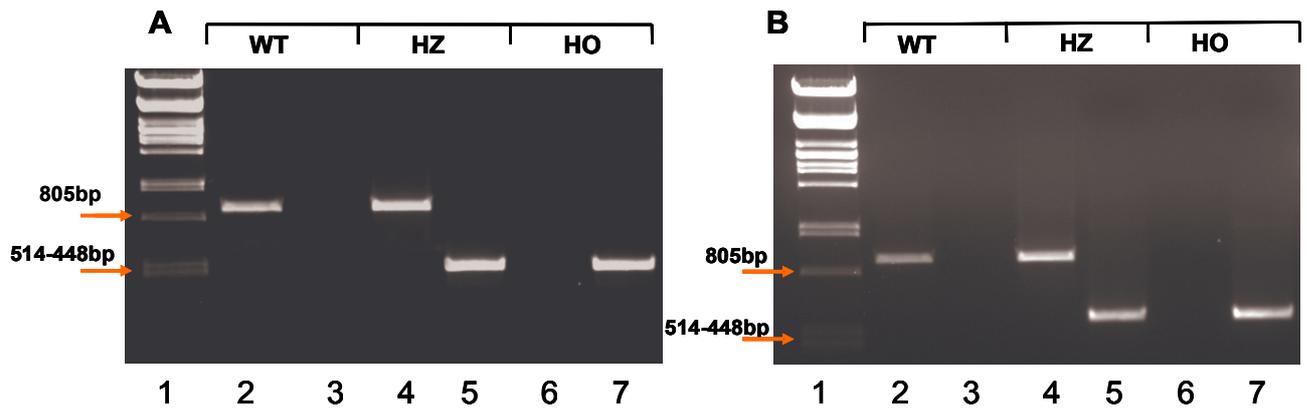


Abbildung 3.16: Knockout-Screening bezüglich *AtER-ANT1* mittels PCR. A. Knockout-Linie 1: SALK_043626; B. Knockout-Linie2: SALK_023441. Spur 1: Marker; Spur 2-3: Wildtyp; Spur 4-5: Heterozygote Pflanze; Spur 6-7: Homozygote Pflanze; Spuren 2+4+6: genspezifische Primerkombination (TLP-4; TRP-4); Spuren 3+5+7: T-DNA-spezifische Primerkombination (TLP-4; LBb-1).

Die genspezifischen Primer TLP-4 und TRP-4 wurden so gewählt, dass sie ein PCR-Produkt von ca. 900 bp liefern. Die Abbildung zeigt, dass für beide Linien homozygote *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen identifiziert werden konnten (A+B: Spur 6+7). Bei diesen Pflanzen konnte aufgrund der T-DNA-Insertion mit einer Größe von ca. 4500 bp unter den spezifischen PCR-Bedingungen kein PCR-Produkt mit der genspezifischen Primerkombination detektiert werden (A+B: Spur 6). Während heterozygote Pflanzen mit beiden Primerkombinationen ein PCR-Produkt lieferten, konnte bei den homozygoten Pflanzen nur mit der T-DNA-spezifischen Primerkombination (TLP-4+LBb1; A+B: Spur7) ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Die T-DNA-spezifischen PCR-Produkte beider Linien unterschieden sich in ihrer Größe um ungefähr 150 bp. Diese Tatsache kann dadurch begründet werden, dass die T-DNA-Insertion bei Linie1 etwa 150 bp stromaufwärts der Insertion von Linie2 liegt (siehe Abbildung 3.15) und es somit bei Linie1 zu einem kleineren PCR-Produkt kommt.

3.1.5.1 Herstellung von *AtER-ANT1* Antisense-Pflanzen

Es gibt Fälle, bei denen das Ausschalten eines Gens dramatische Konsequenzen für die Pflanze hat. So kann eine komplette Deletion eines Gens zur Letalität oder zu sehr dramatischen Phänotypen führen. Eine physiologische Analyse der Auswirkungen einer Gendeletion innerhalb der Pflanze kann so unmöglich werden.

Antisense-Pflanzen stellen Dosis-Mutanten dar, die unterschiedlich reduzierte Transkriptmengen eines Gens aufweisen. Durch das gezielte Verringern der Transkriptmenge eines Gens können so trotzdem physiologische Analysen durchgeführt werden. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden neben *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen zudem *AtER-ANT1* Antisense-Pflanzen konstruiert, um aufgrund drastischer Phänotypen der homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen die physiologische Rolle hinreichend untersuchen zu können. Die Herstellung des Antisensekonstruktes ist in der folgenden Abbildung detailliert dargestellt.

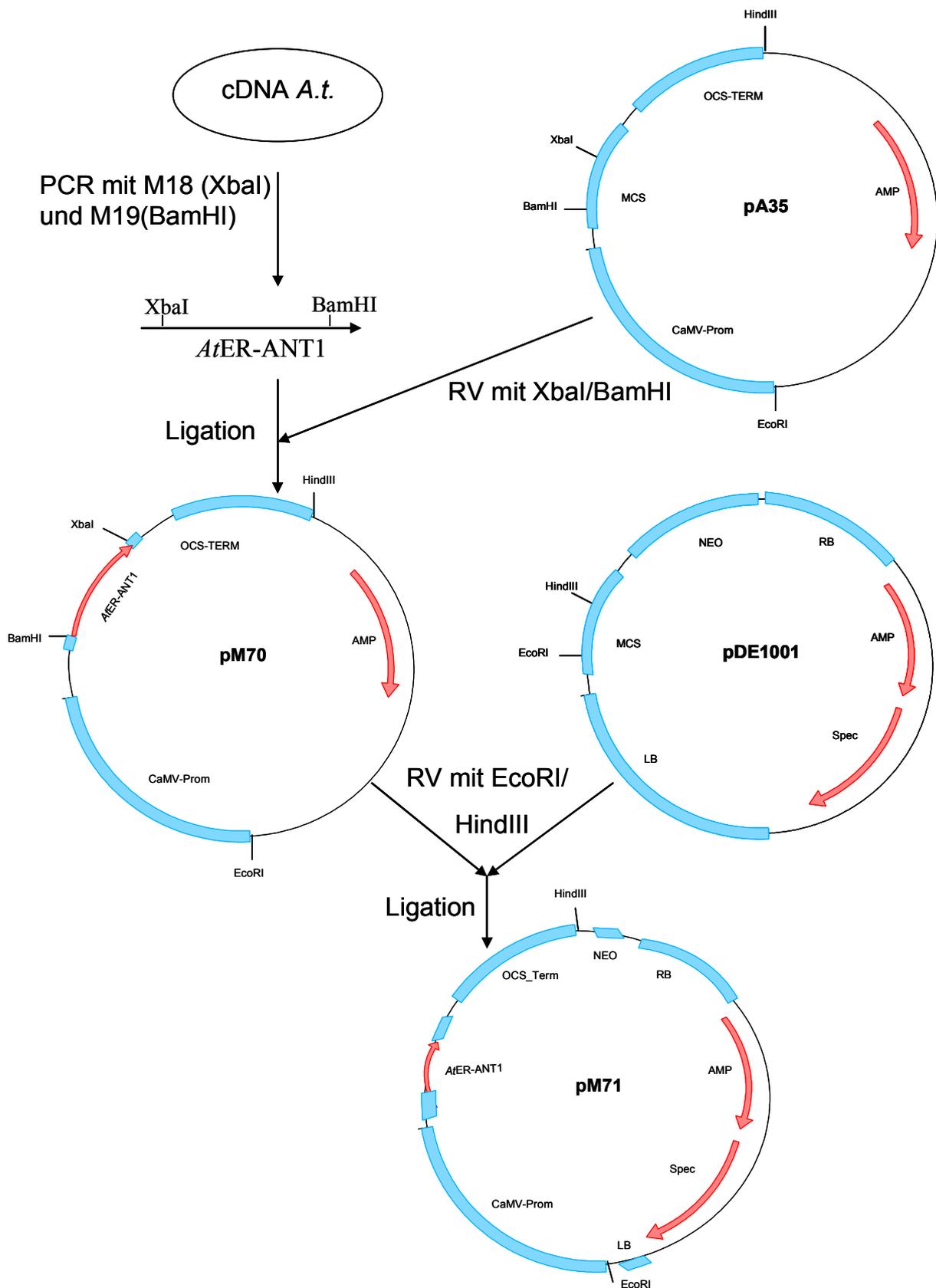


Abbildung 3.17: Herstellung des *AtER-ANT1* Antisense-Konstruktes.

AMP: Ampicillin-Resistenz; Spec: Spectinomycin-Resistenz; CaMV-Prom: Cauliflower-Mosaikvirus-Promotor; OCS: Polyadenylierungssignal aus dem Octopinsynthese-Gen; MCS: Multiple cloning site; Neo: Kanamycin-Resistenz.

Die Pflanzen bei denen das Antisensekonstrukt in das Genom integriert wurde, konnten durch Ausplattieren der transformierten Pflanzensamen auf kanamycinhaltigen MS-8 Agarplatten von nicht transformierten Pflanzen selektiert werden. Zurzeit existieren 20 unabhängige Antisense-Linien bezüglich des *AtER-ANT1* Gens, mit denen weitergearbeitet werden könnte, um die Analyse der homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen zu unterstützen.

3.1.5.2 Phänotyp homozygoter Knockout-Pflanzen bezüglich des *AtER-ANT1*-Gens

Die folgende Abbildung (3.18) zeigt den Phänotyp beider unabhängiger homozygoter *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen bei Anzucht auf Erde im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen.



Abbildung 3.18: Phänotyp von 24 Tage alten Wildtyp-Pflanzen und homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen. Die Pflanzen wurden auf Erde und unter Kurztagbedingungen angezogen.

Abbildung 3.18 zeigt den dramatischen Phänotyp der beiden *AtER-ANT1* homozygoten Knockout-Linien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Die in dieser Abbildung gezeigten Pflanzen wurden unter den gleichen Bedingungen angezogen. Nach drei Wochen Wachstum auf Erde unter Kurztagbedingungen sind beide homozygote Knockout-Linien signifikant in ihrem Wachstum im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen retardiert. Expressionsanalysen von *AtER-ANT1* mittels Promotor-GUS-Fusionskonstrukt zeigten eine starke Expression dieses Gens in den Wurzelspitzen (Abbildung 3.14 A+B), was eine Beteiligung des *AtER-ANT1* an der Wurzelentwicklung vermuten lässt. Zur Analyse des stark retardierten Phänotyps der Knockout-Pflanzen wurde daher im weiteren Verlauf dieser Arbeit das Wurzelwachstum der Knockout-Pflanzen eingehender überprüft. Dazu wurde die Keimung und frühe Entwicklung der *AtER-ANT1* Knockout-Samen unter sterilen Bedingungen auf MS-8 Medium mit unterschiedlichen Agarkonzentrationen (0,5-1,5%) untersucht. Die verschiedenen Agarkonzentrationen sollen hierbei unterschiedliche Bodenbeschaffenheiten nachahmen, was einen Einfluss auf die Penetrationsfähigkeit der Wurzelspitzen hat (siehe Abbildung 3.19).

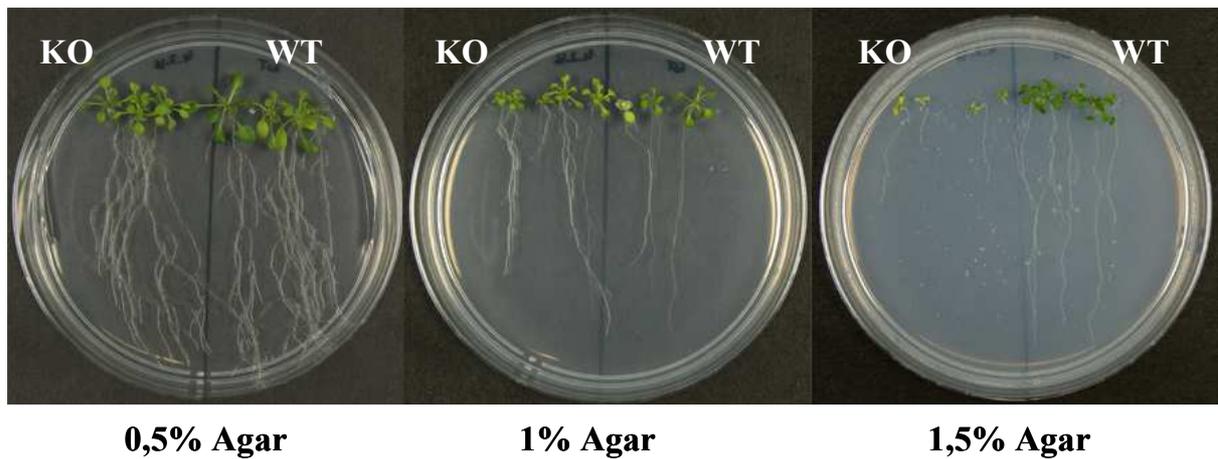


Abbildung 3.19: Analyse des Wurzelwachstums homozygoter *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter sterilen Bedingungen. Pro Platte wurden jeweils 4 sterile Wildtyp- bzw. *AtER-ANT1* Knockout-Samen auf MS-8 Medium mit unterschiedlichen Agarkonzentrationen ausgelegt. WT: Wildtyp; KO: Knockout-Linie2 (Salk_023441).

Das Wurzelwachstum der homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen zeigt im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen eine deutlich schlechtere Wurzelentwicklung bei hohen Agarkonzentrationen (1% und 1,5%). Dies weist auf eine schlechtere Penetration der Wurzelspitzen hin. Eine geringe Agar-Konzentration von 0,5% verbessert dagegen die Wurzelentwicklung der *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen entscheidend.

Resultierend aus diesen neuen Erkenntnissen, wurden alle *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen zunächst für die ersten 12 Tage unter sterilen Bedingungen auf MS-8 Platten mit 0,5% Agar vorkultiviert und anschließend auf Erde umgesetzt.

Durch diese Maßnahme ist es schließlich gelungen, adulte homozygote Knockout-Pflanzen anzuziehen, die auch zur Blüten- und Samenbildung fähig sind. In der folgenden Abbildung sind repräsentative Phänotypen adulter *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen dargestellt.

A



SALK_023441

B



Abbildung 3.20: Phänotyp homozygoter *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen auf Erde. A. SALK_023441: Knockout-Linie 2; Phänotypische Erscheinung einer dreieinhalb Monate alten Knockout-Pflanze nach verbesserter Wurzelentwicklung auf Erde unter Kurztagbedingungen angezogen; B. Blütenstände von Wildtyp (WT)- und Knockout (KO)-Pflanzen im Vergleich.

Trotz Vorinkubation der homozygoten Knockout-Pflanzen auf MS-8 Platten mit 0,5% Agar weisen die *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen einen wesentlich längeren Generationszyklus im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen auf. So beträgt ein Generationszyklus von Wildtyp-Pflanzen ungefähr sechs Wochen, wohingegen erst nach rund vier Monaten homozygote *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen das Adultstadium erreichen. Weitere zwei Monate werden von den Knockout-Pflanzen benötigt, bis eine Samenernte ermöglicht wird. Des Weiteren weisen die Knockout-Pflanzen weiterhin einen dramatischen Phänotyp auf. Im Vergleich zum Wildtyp besitzen diese Pflanzen kleinere Blätter. Außerdem fällt auf, dass die *AfER-ANT1* Knockouts keine ausgeprägte Blattrosette im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen ausbilden. Dies wird besonders im Blütenstadium deutlich (Abbildung 3.20 B). Bei Wildtyppflanzen entspringt der Blütenstand aus dem Zentrum der Blattrosette. Trotz der im Vergleich zum Wildtyp geringen Größe der Knockout-Pflanzen bilden diese sehr viele Blütenstände aus, die alle aus verschiedenen Zentren entspringen. In den Knockout-Pflanzen scheint im Vergleich zum Wildtyp die Apikaldominanz verloren gegangen zu sein. Weiter kann bei der Betrachtung von Abbildung 3.20 beobachtet werden, dass homozygote *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen hellgrün erscheinen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Knockout-Pflanzen weniger Chlorophyll enthalten oder einen erhöhten Chlorophyllabbau aufweisen. Aufgrund dieser Vermutung wurde die Chlorophyllkonzentration im Blattgewebe von *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen bestimmt. Abbildung 3.21 zeigt die ermittelten Werte.

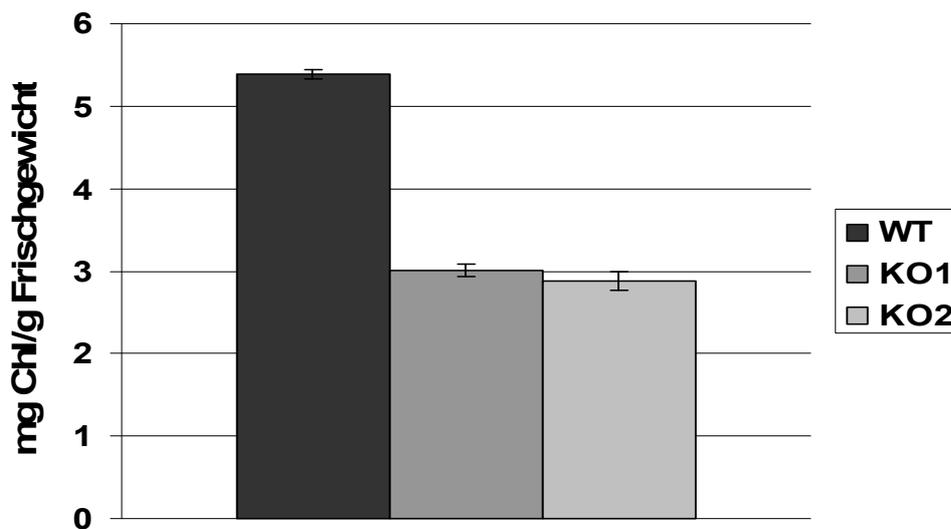


Abbildung 3.21: Bestimmung der Gesamt-Chlorophyllkonzentration in homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen. WT: Wildtyp; KO1: SALK_043626; KO2: SALK_023441; Die Ergebnisse stellen Mittelwerte der Bestimmung von jeweils fünf Pflanzen pro Linie dar.

Die Bestimmung der Gesamt-Chlorophyllkonzentration zeigt, dass beide unabhängige *AfER-ANT1* Knockout-Linien einen um ungefähr 50% reduzierten Chlorophyllgehalt im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen aufweisen. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen, dass die homozygoten *AfER-ANT1* Pflanzen eine stark reduzierte Menge an Chlorophyll in ihren Thylakoidmembranen tragen, was sicherlich die Photosyntheseleistung dieser Pflanzen drosselt.

3.1.5.3 Samenanalysen der homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen

Wie bereits oben beschrieben konnte eine starke Expression von *AfER-ANT1* in den Samen sich entwickelnder Schoten beobachtet werden („Geneatlas“-Analysen Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14 G). In den Samen spielt der Speicherprotein- und Speicherlipidmetabolismus eine überragende Rolle. Demzufolge stellen die Samen ebenfalls ein Gewebe mit hoher ER-Aktivität dar. Um nun zu untersuchen, welchen Einfluss das Fehlen von *AfER-ANT1* auf die Samenentwicklung hat, wurden die Samen der homozygoten *AfER-ANT1*-Pflanzen detailliert untersucht. In Abbildung 3.22 sind die Ergebnisse der Samenanalysen zusammengefasst.

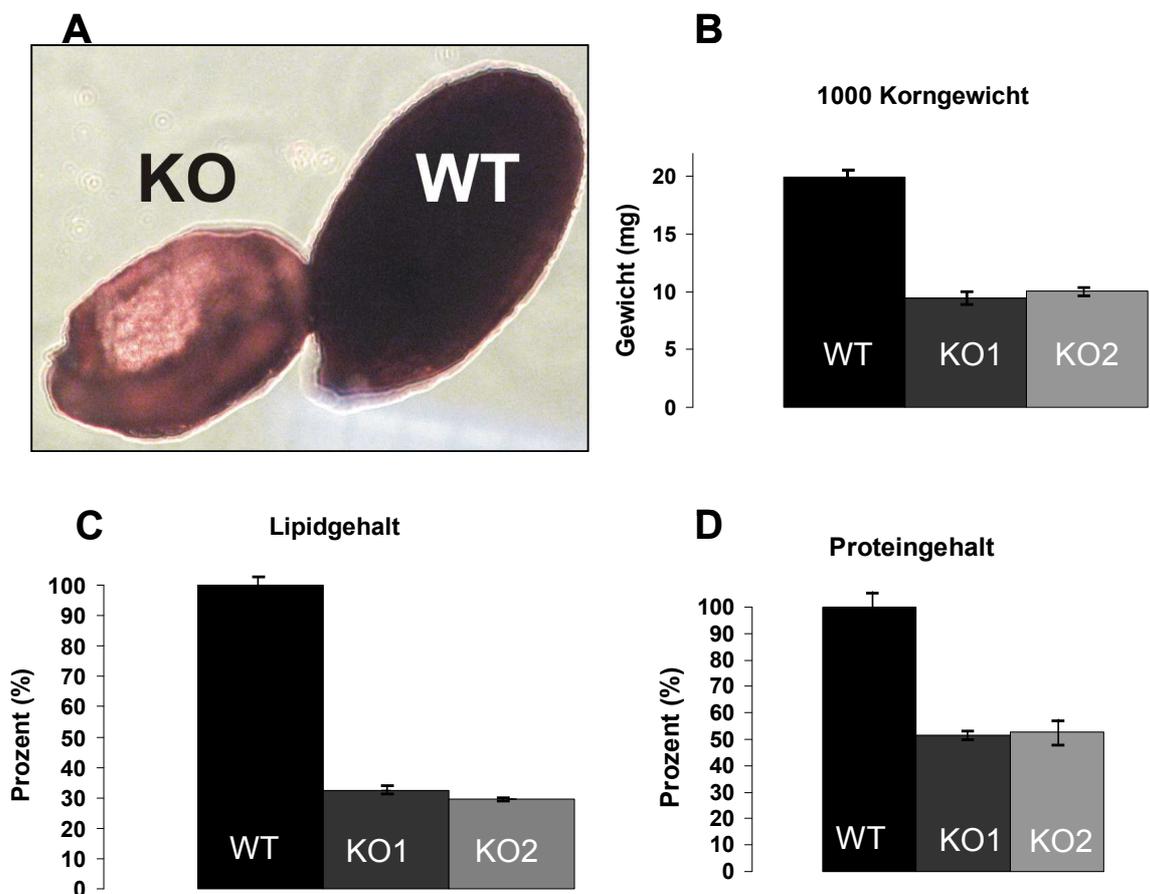


Abbildung 3.22: Samenanalyse von Wildtyp- und *AfER-ANT1* Knockout-Samen. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen (10 Stunden Licht) auf Erde angezogen. Nach Entwicklung einer Blattrosette (ungefähr 4-5 cm Größe), wurde die Lichtphase zur Blühinduktion verlängert (14 Stunden Licht). A. Phänotyp der Wildtyp (WT) und Knockout-Samen (KO; repräsentativ KO2: SALK_023441); Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Mikroskops Axiovert der Firma Zeiss bei einer 40-fachen Vergrößerung; B. Bestimmung des 1000-Korngewichtes von Wildtyp- und Knockout-Samen beider Linien (KO1: SALK_043626; KO2: SALK_023441); C. Bestimmung des Lipidgehaltes von getrockneten Wildtyp, KO1 und KO2 Samen; D. Analyse des Proteingehaltes getrockneter Wildtyp, KO1 und KO2 Samen.

Zur Quantifizierung des 1000-Korngewichtes, des Lipid- und Proteingehaltes, wurden vollständig entwickelte Samen aus den Schoten von Wildtyp- und *AtER-ANT1* Knockout Pflanzen geerntet. Schon in der Morphologie unterschieden sich die Knockout-Samen von Samen der Wildtyp-Pflanzen (Abbildung 3.22 A). Die Knockout-Samen sind in ihrer Größe wesentlich kleiner und erscheinen im Durchlichtmikroskop im Vergleich zu Wildtyp-Samen transparent. Diese Beobachtungen bestätigen sich auch bei der Ermittlung des 1000-Korngewichtes. Die Wildtyp-Samen weisen pro 1000 Samen ein Gewicht von rund 20 mg auf. Die Knockout-Samen beider unabhängiger Linien besitzen ein um circa 50% geringeres Gewicht als die Wildtyp-Samen. Das ermittelte 1000 Korngewicht für Wildtyp-Samen stimmt dabei mit früheren Studien überein (JAKO *et al.*, 2001). Zur Untersuchung der Ursache für das geringe 1000-Korngewicht der Knockout-Samen wurden sowohl der Lipid- als auch der Proteingehalt bestimmt, da Lipide und Proteine die Hauptspeicherstoffe von *Arabidopsis* Samen darstellen. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Knockout-Linien rund 75% weniger Lipid innerhalb der Samen besitzen im Vergleich zu Wildtyp-Samen. Auch bei der Ermittlung des Proteingehaltes kann eine Reduktion bei den Knockout-Samen auf 50% beobachtet werden. Somit unterscheiden sich die Knockout-Samen beider *AtER-ANT1::T-DNA* Linien sowohl im Protein- als auch im Lipid-Gehalt signifikant von Wildtyp-Samen. Der geringe Lipid und Proteingehalt innerhalb der Samen hat sowohl Einfluss auf das 1000-Korngewicht als auch auf die Morphologie der Knockout-Samen. Hinsichtlich der überragenden Rolle des Endoplasmatischen Retikulums im Lipid- und Protein-Metabolismus von Samen sind die erhaltenen Ergebnisse der Samenanalysen von *AtER-ANT1*-Knockout-Pflanzen physiologisch sehr interessant.

3.1.5.4 Metabolitenbestimmung der homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen

Aufgrund des dramatischen Phänotyps, den homozygote *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen bei einer Anzucht auf Erde im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen aufweisen, wurden die homozygoten Pflanzen einer umfassenden Metaboliten-Bestimmung unterzogen. Dazu wurden die Zuckergehalte, Aminosäurekonzentrationen, Nukleotide und einige wichtige Metabolite des primären Stoffwechsels bestimmt. Die Analysen wurden mittels HPLC, Massenspektroskopie, sowie unter Einsatz eines gekoppelten Enzymtests mit anschließender Photometrie während eines Forschungsaufenthaltes am IPK (Institute for Plant Genetics and Crop Plant Research) in Gatersleben mit freundlicher Unterstützung von Dr. Mohammad Hajirezaei durchgeführt. Für die Bestimmung der Metabolite wurden die Pflanzen unter Kurztagbedingungen bis zur Ausbildung einer richtigen Blattrosette (dreieinhalb Monate; bei Wildtyp-Pflanzen vier Wochen) angezogen. Die Ernte des verwendeten Blattmaterials erfolgte in den frühen Morgenstunden.

3.1.5.4.1 Bestimmung der Zuckerkonzentration und des Stärkegehaltes

In Abbildung 3.23 ist die Bestimmung der verschiedenen Zuckergehalte und der Stärkekonzentration von *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp gezeigt.

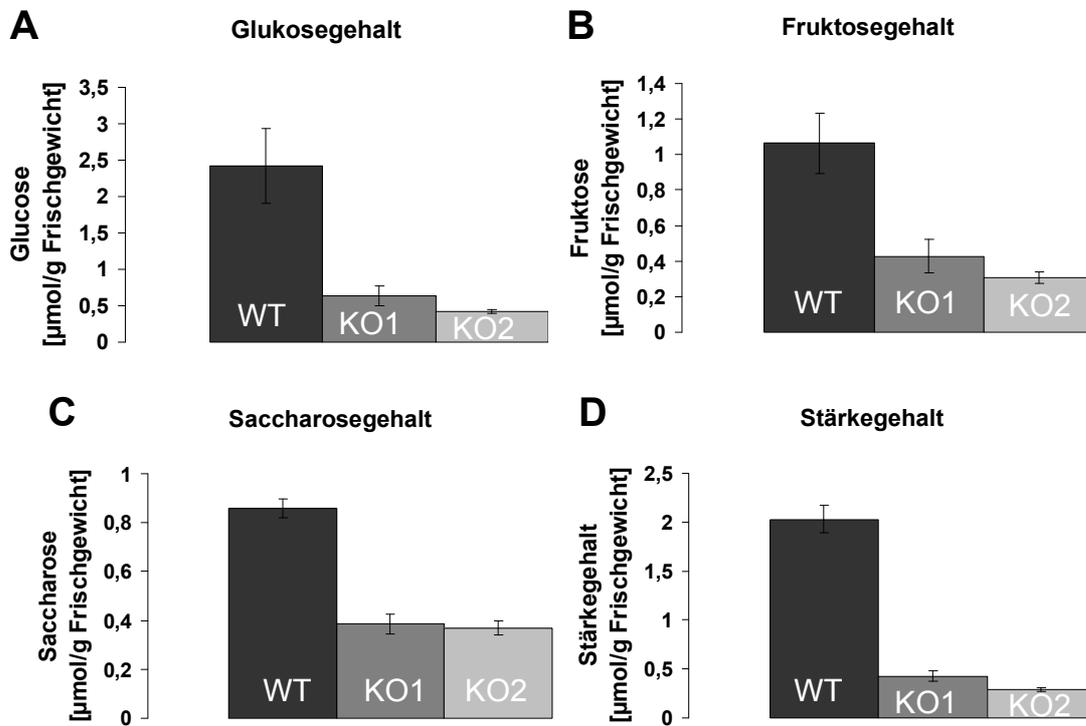


Abbildung 3.23: Bestimmung der Zuckergehalte und Stärkekonzentration in *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines gekoppelten Enzymtests mit anschließender photometrischer Auswertung. A. Glukosegehalt; B. Fruktosegehalt; C. Saccharosegehalt; D. Stärkegehalt. WT: Wildtyp; KO1: SALK_043626; KO2: SALK_023441; Die Ergebnisse stellen Mittelwerte der Bestimmung von jeweils 10 Pflanzen pro Linie dar.

Abbildung 3.23 zeigt, welche dramatischen Konsequenzen das Ausschalten des *AfER-ANT1* auf die Zuckerkonzentrationen innerhalb der Pflanzen hat. Beide unabhängige *AfER-ANT1* Knockout-Linien weisen signifikant reduzierte Glukose- und Fruktose-Konzentrationen auf. Weiter lässt sich beobachten, dass die gemessenen Konzentrationen von Saccharose und Stärke in den homozygoten Knockout-Pflanzen ebenfalls sehr stark reduziert sind. Der Saccharosegehalt ist im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen auf ungefähr 50% reduziert und beim Stärkegehalt kann in beiden *AfER-ANT1*-Knockout-Linien eine 75%ige Reduktion beobachtet werden.

3.1.5.4.2 Bestimmung der Nukleotidkonzentration

Da es sich bei *AfER-ANT1* um einen ATP/ADP-Transporter handelt, war zudem der Gehalt von Adeninnukleotiden innerhalb der Knockout-Pflanzen von Interesse. Die Bestimmung der Nukleotidkonzentration erfolgte mit Hilfe der HPLC. Dabei wurden die Gehalte der Nukleotide ATP, ADP und AMP in *AfER-ANT1* Knockout- und Wildtyp-Pflanzen ermittelt. Die folgende Abbildung zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

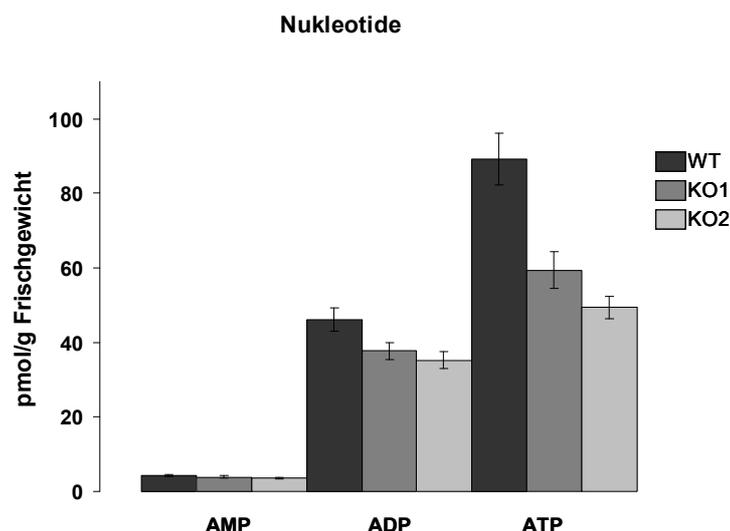


Abbildung 3.24: Bestimmung verschiedener Adeninnukleotid-Gehalte in homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. WT: Wildtyp; KO1: SALK_043626; KO2: SALK_023441; Die Ergebnisse stellen Mittelwerte der Bestimmung von jeweils 10 Pflanzen pro Linie dar. AMP: Adenosinmonophosphat; ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat.

Im Vergleich zu den ermittelten Zuckerdaten, weisen die beiden homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Linien bezüglich der Adenin-Nukleotide geringere Änderungen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen auf. Auffällig kann bei ATP eine Reduktion der Konzentration um circa 30% bei den *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen beobachtet werden. Der AMP- und ADP-Gehalt ist im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen nicht signifikant verändert.

3.1.5.4.3 Bestimmung einiger Metabolite des primären Stoffwechsels

Weiter wurden einige Metabolite des primären Stoffwechsels in *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Die Analysen erfolgten mittels HPLC und Massenspektroskopie. Tabelle 3.4 fasst diese Ergebnisse zusammen.

Tabelle 3.4: Bestimmung der Konzentration von Metaboliten des primären Stoffwechsels in homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Die Bestimmung der Metabolite erfolgte mittels HPLC und Massenspektroskopie. WT: Wildtyp; KO1: SALK_043626; KO2: SALK_023441; Die Ergebnisse stellen Mittelwerte der Bestimmung von jeweils 10 Pflanzen pro Linie dar.

Metabolit	WT	KO1	KO2
	pmol/g Frischgewicht		
UDP-Glukose	113,1 (± 4,8)	173,1 (± 9,4)	180,2 (± 6,7)
ADP-Glukose	21,7 (± 1,1)	35,1 (± 1,2)	31,8 (± 2,2)
Glukose-6-Phosphat/ Fruktose-6-Phosphat	55,9 (± 5,8)	62,9 (± 3,7)	60,1 (± 2,3)
3-PGA	56,8 (± 5,2)	97,3 (± 7,5)	92,4 (± 5,8)
Malat	5539,8 (± 264,1)	7183 (± 214,1)	6831 (± 146,3)
Pyruvat	234,5 (± 24,1)	431,3 (± 23,6)	412,7 (± 15,3)

Die Bestimmung einiger wichtiger Metabolite des Primärstoffwechsels zeigt, dass alle hier bestimmten Metabolite innerhalb der *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen mit Ausnahme von Glukose-6-Phosphat erhöht vorliegen. Besonders signifikant ist die Erhöhung der 3-PGA- und Pyruvat-Konzentration in den Knockout-Pflanzen. Die gemessenen Werte sind jeweils im Vergleich zum Wildtyp verdoppelt.

3.1.5.4.4 Analyse der Aminosäurekonzentration

Zur detaillierten Analyse wurden zudem die Gehalte von 18 Aminosäuren innerhalb der *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zu *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen bestimmt. In Tabelle 3.5 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen gezeigt.

Tabelle 3.5: Bestimmung der Aminosäurekonzentration in homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mittels HPLC-Analyse. WT: Wildtyp; KO1: SALK_043626; KO2: SALK_023441; Blau hervorgehoben: Signifikante Reduktion innerhalb der Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp; Rot hervorgehoben: Signifikante Erhöhung innerhalb der Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte der Bestimmung von jeweils 10 Pflanzen pro Linie dar.

Aminosäure	WT	KO1	KO2
	nmol/g Frischgewicht		
Aspartat	101,5 (± 3,53)	45,4 (± 3,3)	41,8 (± 2,3)
Glutamat	361,8 (± 14,2)	216 (± 20,2)	184 (± 16,7)
Serin	245,8 (± 18,3)	370 (± 22,1)	354 (± 12,6)
Asparagin	83,2 (± 3,4)	111,4 (± 12,3)	115,3 (± 8,3)
Glycin	22,2 (± 1,5)	1271,8 (± 28,3)	1362,2 (± 54,7)
Glutamin	181,8 (± 11,8)	137,3 (± 6,8)	106,2 (± 13,3)
Threonin	80,9 (± 3,8)	31,8 (± 3,7)	43,9 (± 4,2)
Arginin	7,9 (± 0,85)	15,5 (± 2,01)	16,7 (± 1,76)
Alanin	34,8 (± 2,9)	21,1 (± 2,5)	20,7 (± 1,3)
Prolin	48,5 (± 4,21)	48,5 (± 5,6)	36,5 (± 2,3)
Tyrosin	4,6 (± 0,6)	4,5 (± 0,4)	3,9 (± 0,3)
Valin	18,6 (± 1,3)	14,9 (± 1,9)	13,9 (± 1,4)
Methionin	1,5 (± 0,14)	1,2 (± 0,14)	1,5 (± 0,21)
Isoleucin	7,2 (± 0,51)	8,3 (± 0,54)	7,8 (± 0,56)
Lysin	4,59 (± 0,5)	4,43 (± 0,51)	3,72 (± 0,66)
Leucin	4,75 (± 0,70)	4,9 (± 0,68)	5,32 (± 0,71)
Phenylalanin	15,2 (± 1,1)	15,1 (± 0,5)	11,7 (± 0,54)

Bei der Betrachtung der Tabelle fällt auf, dass die homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen bei einigen Aminosäuren signifikante Konzentrationsveränderungen im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Dabei zeigt sich eine signifikante Reduktion der Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Glutamin, Threonin und Alanin. Hingegen kann bei den Aminosäuren Serin, Arginin und Glycin eine signifikante Erhöhung der Konzentration beobachtet werden. Alle anderen hier gemessenen Aminosäuren waren im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant verändert. Besonders dramatisch ist die Änderung der Glycin-Konzentration innerhalb der homozygoten Knockout-Pflanzen. Beide unabhängigen Linien weisen eine circa 120-fache

Erhöhung der Glycinkonzentration im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen auf. Eine derart drastische Erhöhung bzw. Erniedrigung konnte bei keiner der anderen gemessenen Aminosäuren beobachtet werden.

3.1.5.4.5 Nähere Analyse der drastischen Erhöhung der Glycinkonzentration in *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen

Um Gründe für diesen starken Glycinanbau näher zu analysieren, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit verschiedene Transportmessungen durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob *AfER-ANT1* nicht nur ATP und ADP transportiert, sondern eine zweite Funktion als Glycin-Transporter besitzt.

3.1.5.4.5.1 Analyse der Glycinaufnahme von *AfER-ANT1* mittels heterologer Expression in *E. coli*

Als erstes wurde hierzu im *E. coli*-System untersucht, ob nicht radioaktiv markiertes Glycin bzw. Serin einen Einfluss auf die ATP-Transportaktivität hat. Dazu wurden Effektorstudien an intakten *E. coli* Zellen, die *AfER-ANT1* heterolog exprimieren, durchgeführt. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Abbildung 3.25 gezeigt.

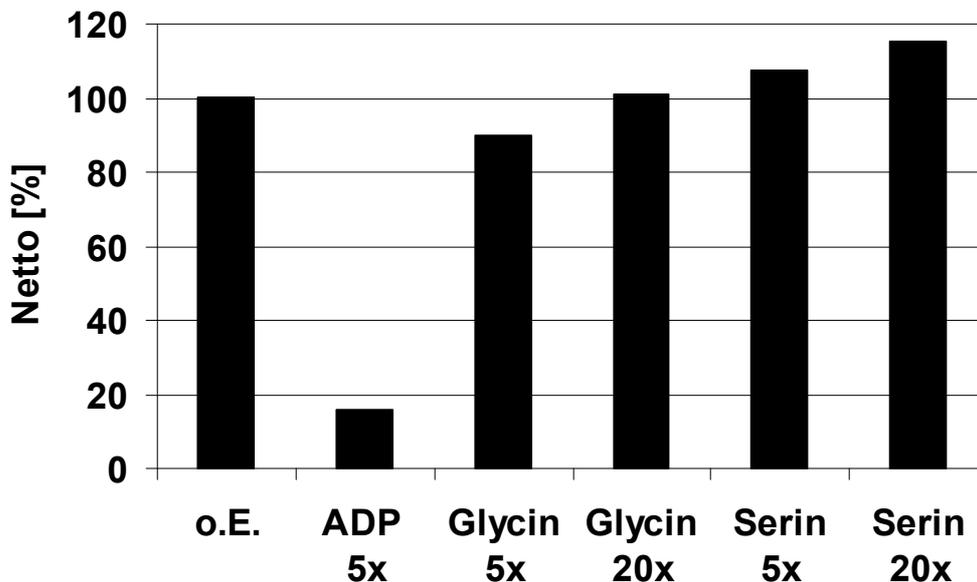


Abbildung 3.25: Glycin- bzw. Serin-Effekt auf die [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP-Aufnahme bei *AfER-ANT1* exprimierenden *E. coli* Zellen. o.E.: ohne Effektor; Die Aufnahmen wurden im zeitlinearen Bereich (20 min) bei einer Endkonzentration von 200 μM durchgeführt. Dabei wurden die Effektoren in einem 5-fachen bzw. 20-fachen Überschuss zum Transportmedium hinzugefügt. Die Daten spiegeln die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten wider, wobei der SE kleiner als 8% der Mittelwerte beträgt.

Abbildung 3.25 zeigt eindeutig, dass weder Glycin noch Serin die [$\alpha^{32}\text{P}$]-Aufnahme von *AfER-ANT1* exprimierenden *E. coli* Zellen beeinflusst. Mit Hilfe dieser Experimente kann Glycin bzw. Serin allerdings noch nicht eindeutig als Substrat von *AfER-ANT1* ausgeschlossen werden. Es besteht weiter die Möglichkeit, dass diese Substrate und ATP ein unterschiedliches Bindezentrum besitzen, so dass sich die verschiedenen Substrate bei einem Transport nicht beeinflussen würden.

Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden Aufnahmeexperimente mit radioaktiv markiertem Glycin bzw. Serin an intakten *E. coli* Zellen, die *AfER-ANT1* heterolog exprimieren, durchgeführt. In Abbildung 3.26 sind die Ergebnisse dieser Studien zu sehen.

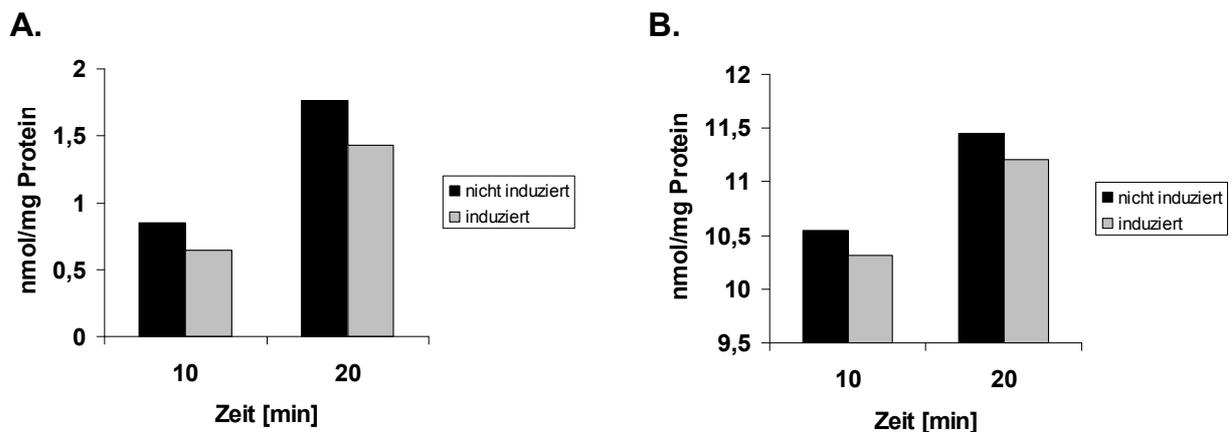


Abbildung 3.26: Aufnahme von [^{14}C]-Glycin und [^{14}C]-Serin in *AfER-ANT1* exprimierende *E. coli* Zellen.

A. Glycin-Aufnahme; B. Serin-Aufnahme; Sowohl die Glycin- als auch die Serin-Aufnahme wurde bei einer Endkonzentration von 25 μM durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle dienten nicht induzierte *E. coli*-Zellen.

Die Aufnahmeexperimente zeigen eindeutig, dass weder radioaktiv markiertes Glycin noch Serin in *E. coli* Zellen, die *AfER-ANT1* heterolog exprimieren, aktiv transportiert wird. Somit scheint weder Glycin noch Serin ein Transportsubstrat von *AfER-ANT1* zu sein.

3.1.5.4.5.2 Analyse der Glycinaufnahme an isolierten Mitochondrien von *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen und Wildtyp-Pflanzen

Um zu testen, ob die Glycin-Aufnahme in die Mitochondrien der *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen inhibiert ist, wurden Mitochondrien sowohl aus Wildtyp- als auch aus homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen isoliert. Anschließend wurde die radioaktive Glycin- und ATP-Aufnahme an den jeweiligen, intakten Mitochondrien gemessen. In Abbildung 3.27 sind diese Ergebnisse dargestellt.

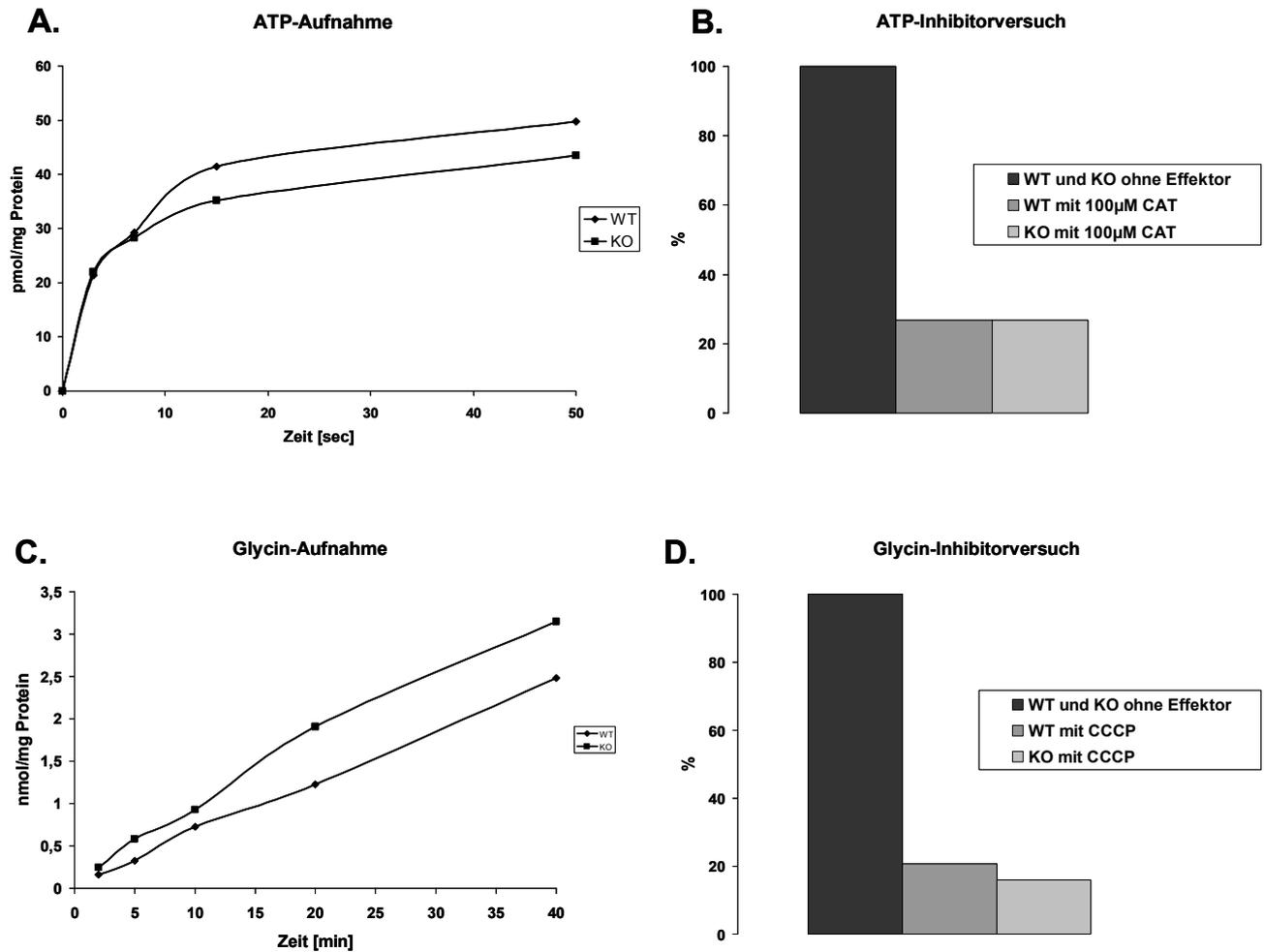


Abbildung 3.27: Aufnahme von radioaktiv markiertem ATP und Glycin in isolierte Mitochondrien von homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien. A. radioaktive ATP-Aufnahme an intakten Mitochondrien aus homozygoten *AtER-ANT1* Knockout- und Wildtyp-Pflanzen. Die Aufnahme wurde für die angegebenen Zeiten bei einer Endkonzentration von 1 µM durchgeführt. B. ATP-Inhibitorversuch: Es wurde die ATP-Transportaktivität an intakten Mitochondrien von *AtER-ANT1* Knockout- und Wildtyp-Pflanzen gemessen und die Wirkung von 100 µM Carboxyatractylat (CAT) bestimmt. Die Aufnahme erfolgte über eine Zeit von 15 Sekunden. C. radioaktive Glycin-Aufnahme an intakten Mitochondrien aus homozygoten *AtER-ANT1* Knockout- und Wildtyp-Pflanzen. Die Aufnahme wurde für die angegebenen Zeiten bei einer Endkonzentration von 20 µM durchgeführt. D. Glycin-Inhibitorversuch: Es wurde die Glycin-Transportaktivität an intakten Mitochondrien von *AtER-ANT1* Knockout- und Wildtyp-Pflanzen gemessen und die Wirkung von 50 µM CCCP bestimmt. Die Daten spiegeln die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten wider, wobei der SE weniger als 7% beträgt.

Abbildung 3.27 zeigt eindeutig, dass die Mitochondrien aus homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen trotz Deletion des *AtER-ANT1* Gens zu einem Glycin- und ATP-Transport befähigt sind. Sowohl die Glycin- als auch die ATP-Aufnahmen sind in isolierten Mitochondrien aus homozygoten *AtER-ANT1*-Knockout-Pflanzen nahezu identisch im Vergleich zu Aufnahmeraten in Wildtyp-Mitochondrien. Außerdem kann beobachtet werden, dass sich der ATP-Transport durch die Zugabe von Carboxyatractylat auf rund 25% sowohl bei *AtER-ANT1* Knockout-Mitochondrien als auch bei Wildtyp-Mitochondrien inhibieren lässt (Abbildung 3.27 B). Die Zugabe von CCCP bei der Glycinaufnahme führt zudem zu einer Reduktion des Glycin-Transportes bei isolierten Mitochondrien sowohl aus *AtER-ANT1*

Knockout-Pflanzen als auch aus Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.27 D). Das Ausschalten des *A_tER-ANT1* Gens hat somit keinerlei Einfluss auf die Glycin- bzw. ATP-Aufnahme in die Mitochondrien. Weiter lässt sich festhalten, dass *A_tER-ANT1* kein Glycin-Transporter der Mitochondrien ist. Der dramatische Glycinanstau kann also nicht auf diese Weise erklärt werden. Zur näheren Analyse des Glycin-Effektes wurden die homozygoten Knockout-Pflanzen nun weiter physiologisch untersucht.

3.1.5.4.5.3 Wachstumsanalyse der homozygoten *A_tER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter hoch CO₂-Bedingungen

Da während der Photorespiration eine erhebliche Menge an Glycin anfällt, das unter Beteiligung der Mitochondrien und Peroxisomen zu Serin decarboxyliert wird, wurden die *A_tER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter hoch CO₂-Bedingungen (5%) angezogen. Dieses Experiment sollte Aufschluss darüber geben, ob der stark im Wachstum retardierte Phänotyp der Knockout-Pflanzen durch einen reduzierten Glycin-Stoffwechsel (und damit Glycinanstau) beeinflusst wird.

In Abbildung 3.28 ist der Phänotyp der homozygoten *A_tER-ANT1* Knockout-Pflanzen, angezogen unter hoch CO₂-Bedingungen im Vergleich zu normalen CO₂-Bedingungen, gezeigt.

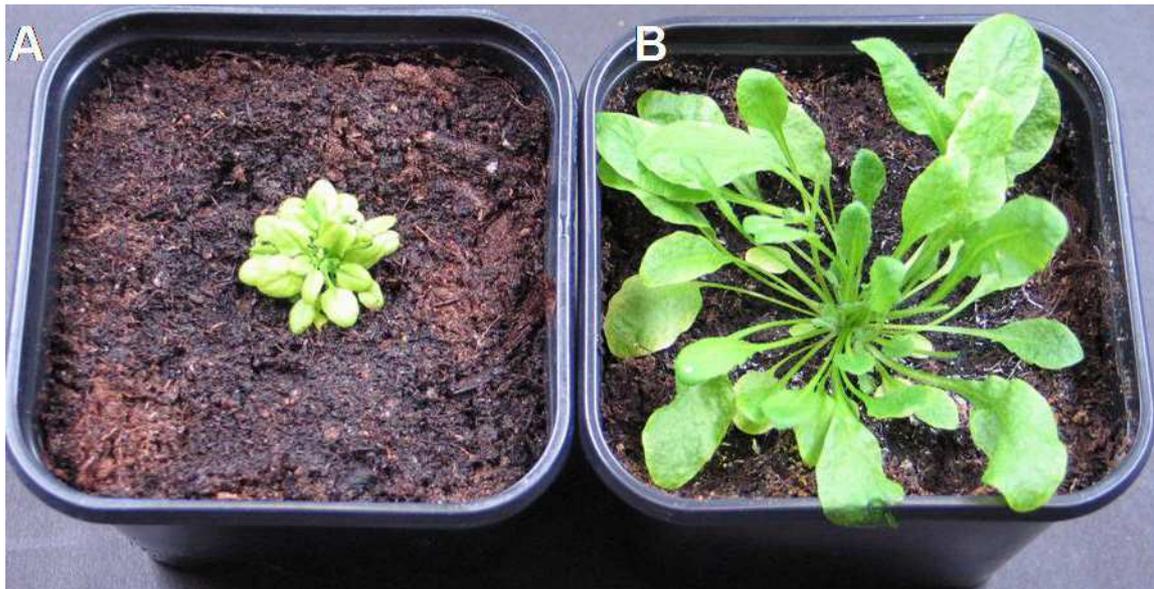


Abbildung 3.28: Phänotyp homozygoter *A_tER-ANT1* Pflanzen bei Anzucht unter hoch CO₂-Bedingungen. A. homozygote *A_tER-ANT1* Pflanze bei normaler CO₂-Konzentration im Kurztag angezogen; B. homozygote *A_tER-ANT1* Pflanze unter hoch CO₂ bei Kurztagbedingungen angezogen. A+B: KO2: SALK_023441.

Beide homozygote *A_tER-ANT1* Knockout-Linien wurden zuerst 12 Tage in Sterilkultur auf MS-8 Medium mit geringer Agarkonzentration (0,5%) angezogen, um wie bereits dargestellt eine gute Wurzelentwicklung zu gewährleisten. Daraufhin wurden die Pflanzen auf Erde umgesetzt und bei Kurztagbedingungen entweder mit ambienster CO₂-Konzentration oder hoher CO₂-Konzentration weitere sechs Wochen wachsen gelassen. Bei Betrachtung der Abbildung 3.28 fällt auf, dass sich die homozygoten *A_tER-ANT1* Knockout-Linien unter hoch CO₂-Bedingungen stark im Phänotyp von Knockouts unterscheiden, die unter normalen CO₂-Bedingungen angezogen wurden. Die Pflanzen sind

im Vergleich wesentlich größer und können wieder eine richtige Blattrosette mit großen Blättern ausbilden. Die homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen gleichen auch in der Generationszeit den Wildtyp-Pflanzen, die ebenfalls unter diesen Bedingungen angezogen wurden. Der dramatische Phänotyp, der unter ambienten CO₂-Bedingungen auftritt, scheint unter hoch CO₂-Bedingungen komplett aufgehoben zu sein. Das Ausschalten des *AtER-ANT1* hat demnach unter anderem große sekundäre Auswirkungen auf den pflanzlichen Photorespirationsstoffwechsel zur Folge.

3.1.5.4.6 Metabolitenbestimmung unter hoch CO₂-Bedingungen

Aufgrund des starken phänotypischen Einflusses von hoch CO₂-Bedingungen auf das Wachstum der *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen, wurde eine erneute Metabolitenbestimmung der beiden *AtER-ANT1* Knockout-Linien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen durchgeführt. Dazu wurden die Pflanzen wie bereits oben beschrieben unter hoch CO₂-Bedingungen angezogen und das Blattmaterial zur Analyse nach etwa 3 Wochen Wachstum vormittags geerntet. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls in Kooperation mit Dr. Mohammad Hajirezaei am IPK in Gatersleben durchgeführt.

3.1.5.4.6.1 Bestimmung der Saccharose- und Stärkekonzentration

Neben der Bestimmung der Saccharose- und Stärkekonzentration wurden außerdem die Zuckerkonzentrationen innerhalb der homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter hoch CO₂-Bedingungen bestimmt. Da die Bestimmung der Zucker Glukose und Fruktose zu starke Schwankungen aufweisen, müssen diese Analysen nochmals wiederholt werden, um eindeutige Aussagen über die bestehenden Zuckerlevel machen zu können. Die Bestimmung der Saccharose- und Stärkekonzentration ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

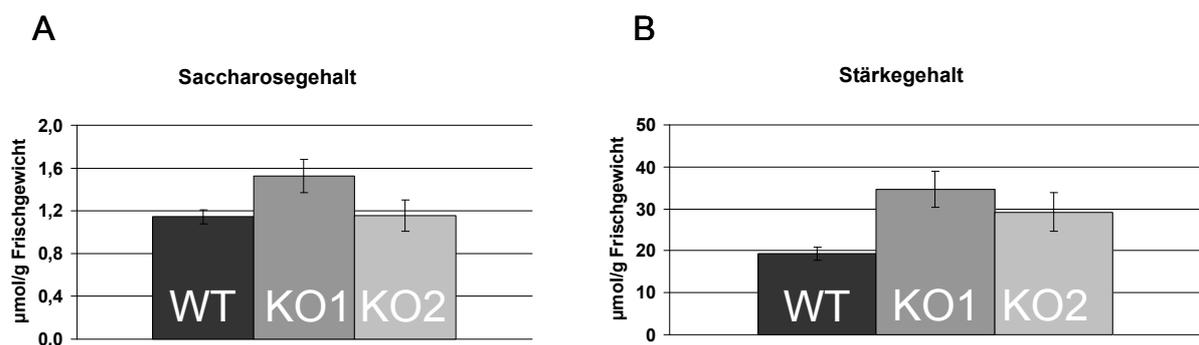


Abbildung 3.30: Bestimmung des Saccharose- und Stärke-Gehaltes in *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter hoch CO₂-Bedingungen. A. Bestimmung der Saccharosekonzentration; B. Bestimmung des Stärkegehaltes. WT: Wildtyp; KO1: SALK_043626; KO2: SALK_023441; Die Ergebnisse stellen Mittelwerte der Bestimmung von jeweils 5 Pflanzen pro Linie dar.

Die Bestimmung der Saccharosekonzentration zeigt, dass im Gegensatz zu ambienten CO₂-Bedingungen die Saccharosekonzentration innerhalb der *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter hoch CO₂ annähernd identisch ist im Vergleich zum Wildtyp. Die Reduktion des Saccharosegehaltes lässt sich somit durch Anzucht der Pflanzen unter hoch CO₂ aufheben. Bei der Ermittlung der Stärkekonzentration lässt sich das Gleiche beobachten. Unter normalen CO₂-Bedingungen war die Stärkekonzentration innerhalb der Knockout Pflanzen drastisch reduziert (75%). Im Gegensatz dazu werden unter hoch CO₂-Bedingungen sogar leicht erhöhte Stärkewerte innerhalb der Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp erreicht.

3.1.5.4.6.2 Bestimmung der Nukleotidkonzentration von ATP und ADP sowie den Gehalt an ADP-Glukose

Im weiteren Verlauf der Analysen wurde erneut die Konzentration der Nukleotide ATP und ADP sowie die ADP-Glukose-Konzentration in *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Der Gehalt der übrigen Metabolite des primären Stoffwechsel, die unter ambienten CO₂-Bedingungen gemessen wurden, steht derzeit noch aus. Das Ergebnis der oben genannten Metabolite ist in Abbildung 3.29 gezeigt.

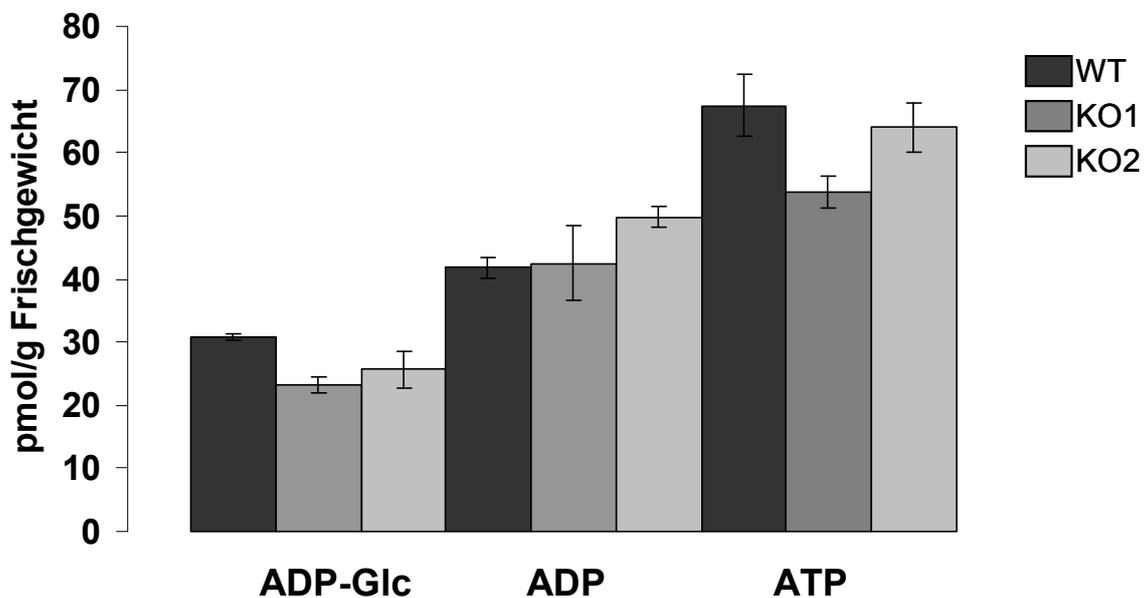


Abbildung 3.29: Bestimmung der Nukleotidkonzentration von ADP und ATP sowie des ADP-Glukosegehaltes in *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen bei Anzucht unter hoch CO₂-Bedingungen. WT: Wildtyp; KO1: SALK_043626; KO2: SALK_023441; Die Ergebnisse stellen Mittelwerte der Bestimmung von jeweils 5 Pflanzen pro Linie dar. ADP-Glc: Adenosindiphosphat-Glukose; ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat.

Die hier ermittelten Daten zeigen, dass sich die Konzentration von ADP-Glukose, ADP und ATP in *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter hoch CO₂-Bedingungen nicht signifikant von Wildtyp-Pflanzen, - ebenfalls unter hoch CO₂ angezogen -, unterscheidet. Der erhöhte ADP-Glukose Pool, der bei ambienten CO₂-Bedingungen beobachtet werden konnte, ist bei einem Wachstum unter hoch CO₂ im Vergleich zum

Wildtyp nicht verändert. Bei ADP kann sowohl unter normal als auch unter hoch CO₂ keine Veränderung im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen beobachtet werden. Zudem scheint sich der ATP-Gehalt unter hoch CO₂ den Wildtyp-Daten anzugleichen. Im Vergleich zu ambienten CO₂-Bedingungen kann keine signifikante Reduktion der ATP-Konzentration bei den homozygoten *AfER-ANT1* Knockout Pflanzen ermittelt werden.

3.1.5.4.6.3 Bestimmung der Aminosäurekonzentration unter hoch CO₂-Bedingungen

Abschließend wurden im Rahmen dieser Analysen die Aminosäurekonzentrationen innerhalb der *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp unter hoch CO₂-Bedingungen bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tabelle 3.6: Bestimmung der Aminosäurekonzentration in homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp unter hoch CO₂-Bedingungen. Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mittels HPLC-Analyse. WT: Wildtyp; KO1: SALK_043626; KO2: SALK_023441; Blau hervorgehoben: Signifikante Reduktion innerhalb der Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp; Rot hervorgehoben: Signifikante Erhöhung innerhalb der Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte der Bestimmung von jeweils 5 Pflanzen pro Linie dar.

Aminosäure	WT	KO1	KO2
	nmol/g Frischgewicht		
Aspartat	170 (± 5,2)	164 (± 15,5)	188 (± 19,7)
Glutamat	267 (± 8,3)	273 (± 31,9)	279 (± 41,2)
Serin	48,1 (± 0,34)	121 (± 23,9)	109,4 (± 25,4)
Asparagin	36,3 (± 4)	39,7 (± 11,6)	38,4 (± 9,1)
Glycin	4,4 (± 0,4)	26,5 (± 6,4)	24,6 (± 3,7)
Glutamin	135,8 (± 7,8)	107,9 ± 3,3)	112,8 (± 20,2)
Threonin	41,6 (± 1,7)	63,6 (± 7,9)	60,2 (± 12)
Arginin	2,7 (± 0,58)	3,1 (± 0,56)	2,6 (± 0,46)
Alanin	34,8 (± 0,97)	67,7 (± 10)	69,4 (± 7,7)
Prolin	9,3 (± 0,95)	15,3 (± 3,1)	14,2 (± 1,7)
Tyrosin	1,3 (± 0,12)	2,1 (± 0,13)	2,2 (± 0,35)
Valin	6,9 (± 0,18)	9,5 (± 1,6)	9,1 (± 1,9)
Methionin	0,7 (± 0,04)	0,6 (± 0,29)	0,5 (± 0,04)
Isoleucin	2,0 (± 0,09)	2,9 (± 0,4)	2,3 (± 0,5)
Lysin	2,9 (± 0,03)	3,2 (± 0,4)	2,9 (± 0,5)
Leucin	12,6 (± 1,9)	2,0 (± 0,2)	1,8 (± 0,2)
Phenylalanin	10,4 (± 1,7)	2,4 (± 0,2)	2,2 (± 0,1)

Die Ergebnisse zeigen, dass sich der Aminosäurestoffwechsel innerhalb der homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter hoch CO₂-Bedingungen dem der Wildtyp-Pflanzen anzugleichen scheint. Die Konzentrationen für Aspartat, Glutamat und Glutamin waren unter ambienten CO₂-Bedingungen signifikant im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen reduziert. Unter hoch CO₂-Bedingungen hingegen können bei diesen Aminosäuren keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden.

Bei den Aminosäuren Threonin und Alanin hingegen kommt es zu einem interessanten Effekt. Unter ambienten CO₂-Bedingungen waren diese Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Unter hoch CO₂-Bedingungen hingegen wurde eine um circa 50%ige Erhöhung der Konzentration für beide Aminosäuren ermittelt. Bei den Aminosäuren Serin und Glycin kann unter hoch CO₂-Bedingungen weiterhin eine signifikante Erhöhung beobachtet werden. Dabei fällt auf, dass die Serin-Konzentration sich unter hoch CO₂ weiter erhöht hat (300%ige Erhöhung) im Vergleich zu normalen CO₂-Bedingungen (50%ige Erhöhung). Die dramatische Erhöhung der Glycin-Konzentration, die bei *AfER-ANT1* Knockout Pflanzen unter normalen CO₂-Bedingungen ermittelt wurde (120-fache Erhöhung), reduziert sich bei einem Wachstum der Pflanzen unter hoch CO₂ stark, ist jedoch immer noch 6-fach erhöht. Abschließend lässt sich ebenfalls beobachten, dass die Aminosäuren Leucin und Phenylalanin in den Knockout-Pflanzen unter hoch CO₂-Bedingungen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen signifikant reduziert vorliegen. Unter normalen CO₂-Bedingungen waren diese Aminosäuren hingegen nicht verändert.

Der dramatische Phänotyp der homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen lässt sich nur indirekt durch das Ausschalten des *AfER-ANT1* Gens erklären. Das Ausschalten dieses Gens führt zu dramatischen pleiotropen Stoffwechselveränderungen, die sich besonders im Bereich der Photorespiration auswirken. So kommt es unter ambienten CO₂-Bedingungen zu einem dramatischen Anstau von Glycin. Dieser Anstau bewirkt seinerseits drastische Veränderungen innerhalb der Pflanze, die sich in einem dramatischen Phänotyp der Pflanzen widerspiegeln. Bei einer Anzucht der homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter hoch CO₂-Bedingungen kommt es zu einer reduzierten Photorespiration, wodurch die Menge an Glycin verringert wird. Die Reduktion der Photorespiration bewirkt seinerseits eine Erhöhung der Netto-Photosyntheseleistung, die sich wiederum in einer erhöhten Produktion von ATP und NADPH widerspiegelt. Dies führt zu einer „Normalisierung“ des Stoffwechsels innerhalb der Pflanze, so dass sogar der dramatische Phänotyp aufgehoben wird.

3.2 Charakterisierung des ANT1 aus *Oryza sativa*

In Kapitel 3.1 wurde der im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte ATP/ADP-Transporter AtER-ANT1 phylogenetisch, biochemisch und physiologisch charakterisiert. In Kapitel 3.2 der vorliegenden Dissertation wird ein Homolog zu diesem Protein aus der monokotyledonen Pflanze *Oryza sativa* phylogenetisch und biochemisch im Detail untersucht werden.

3.2.1 Phylogenetische Analyse des OsER-ANT1

Das Transportprotein OsER-ANT1 wird phylogenetisch wie sein Homolog aus *Arabidopsis thaliana* in die Gruppe der MCF (mitochondrial carrier family) eingegliedert. Um detaillierte Aussagen bezüglich der Phylogenie machen zu können, wurde mittels der Programme ClustalX/W und Genedoc ein Aminosäurealignment erstellt, das die nahe phylogenetische Verwandtschaft des OsER-ANT1 zu dem bereits charakterisierten AtER-ANT1 zeigt. Das Aminosäurealignment ist in Abbildung 3.31 gezeigt.

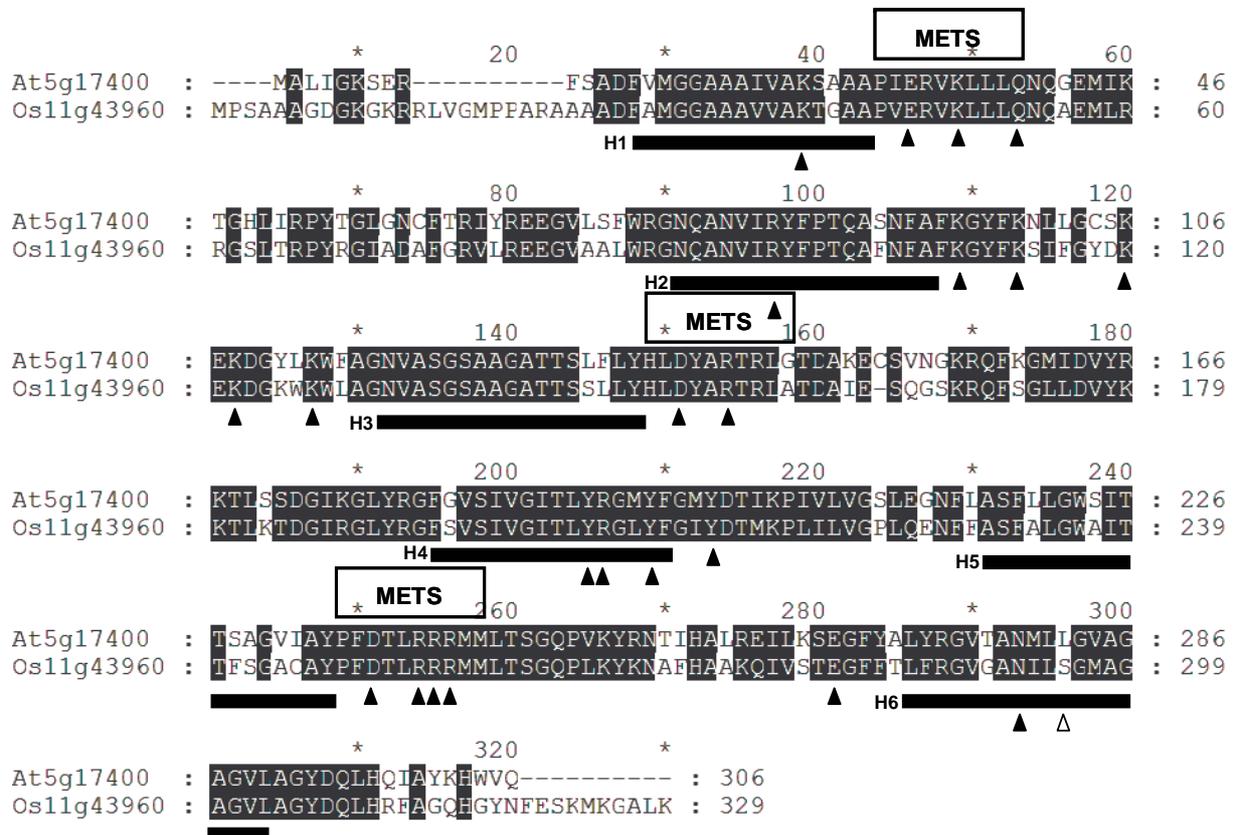


Abbildung 3.31: Aminosäurealignment von AtER-ANT1 und OsER-ANT1. Identische oder ähnliche Aminosäuren bei den untersuchten Transportproteinen sind schwarz, nicht konservierte Aminosäuren weiß dargestellt. Die schwarzen Balken H1-H6 zeigen die sechs putativen hydrophoben Membran-durchspannenden Transmembrandomänen. METS: konservierte „Mitochondrial energy transfer signature“ (METS = P-x-[DE]-x-[LIVAT]-[RK]-x-[LRH]-[LIVMFY]-[QGAI VM]), die nach den Transmembrandomänen H1, H3 und H5 folgen. Aminosäuren, die mit einem Dreieck gekennzeichnet sind, stellen wichtige Aminosäuren für die Funktion der mitochondrialen AACs dar. Dabei sind Aminosäuren, die mit schwarz-gefüllten Dreiecken gekennzeichnet sind, ebenfalls in AtER-ANT1 und OsER-ANT1 konserviert, wohingegen ungefüllte Dreiecke Unterschiede zu den mitochondrialen AACs zeigen. AtER-ANT1 (At5g17400); OsER-ANT1 (Os11g43960).

Abbildung 3.31 zeigt, dass OsER-ANT1 auf Aminosäureebene sehr homolog zu dem bereits charakterisierten AtER-ANT1 ist. Interessanterweise besitzt OsER-ANT1 ebenfalls kein N-terminales Transitpeptid, welches für die klassischen mitochondrialen AACs notwendig ist um diese korrekt in die Mitochondrien zu transportieren (MURCHA *et al.*, 2005). Die in Kapitel 3.1.1 detailliert beschriebenen Aminosäuremotive, die eine biochemische Funktion von Proteinen als ATP/ADP-Transporter nahe legen (NELSON *et al.*, 1993, PEBAY-PEYROULA *et al.*, 2003), sind wie bei AtER-ANT1 auch in dem Homolog aus *Oryza sativa* stark konserviert. Es wurde bereits beschrieben, dass sich AtER-ANT1 bezüglich dieser wichtigen Motive lediglich in einer einzigen Aminosäure von den klassischen AACs unterscheidet. Dabei wurde das R294 bei *S.cerevisiae* (bei Rind R279) durch die Aminosäure L282 in AtER-ANT1 ausgetauscht. Interessanterweise ist genau diese Aminosäure ebenso bei dem Transportprotein aus *Oryza sativa* verändert. Hier wurde das entsprechende Arginin gegen ein Serin (S 295) substituiert. Weiter fällt auf, dass alle bisher untersuchten mitochondrialen AACs das stark konservierte Aminosäuremotiv „RRRMMM“ besitzen. Sowohl bei OsER-ANT1 als auch bei AtER-ANT1 kann eine Abweichung dieses Sequenzmotives zu „RRRMML“ beobachtet werden.

Zur weiteren Verdeutlichung des hohen Verwandtschaftsgrades wurde ebenfalls der prozentuale Anteil identischer und ähnlicher Aminosäuren zwischen OsER-ANT1, AtER-ANT1 und den klassischen mitochondrialen AACs aus *Arabidopsis thaliana* ermittelt. In Tabelle 3.7 werden diese Analysen zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 3.7: Anteil ähnlicher bzw. identischer Aminosäuren zwischen OsER-ANT1, AtER-ANT1 und den mitochondrialen AtAAC1-3. Zur Ermittlung der Werte wurden die Aminosäuresequenzen ohne N-terminale Signalsequenz verwendet. Die Werte wurden mit Hilfe der Programme ClustalX und Genedoc ermittelt. Der Anteil identischer (bzw. ähnlicher) Aminosäuren wurde jeweils in Prozent angegeben.

	AtER-ANT1	AtAAC1	AtAAC2	AtAAC3
OsER-ANT1	64% (79%)	48% (63%)	49% (62%)	47% (62%)

Die Tabelle zeigt eindeutig, dass auch ohne die N-terminale Signalsequenz OsER-ANT1 am stärksten homolog zu AtER-ANT1 ist mit 64% identischen und 79% ähnlichen Aminosäuren. Die Homologie zu den drei klassischen mitochondrialen AACs ist mit 48% identischen und 62% ähnlichen Aminosäuren erheblich geringer.

Zur weiteren Charakterisierung des OsER-ANT1 wurde die biochemische Funktion dieses Transportproteins detailliert analysiert.

3.2.2 Biochemische Charakterisierung des OsER-ANT1

Zur biochemischen Charakterisierung des OsER-ANT1 wurden in dieser Arbeit, analog zu AtER-ANT1, Konstrukte für eine heterologe Expression dieses Gens in *E. coli* hergestellt (siehe Kapitel 3.1.2.1). Im Gegensatz zu AtER-ANT1 wurde für OsER-ANT1 nur das Konstrukt mit c-terminalem Histag konstruiert und für die heterologe Expression in *E. coli* eingesetzt.

Die folgende Abbildung 3.32 erbringt den Nachweis, dass OsER-ANT1 in die *E. coli*-Membran eingebaut wird.

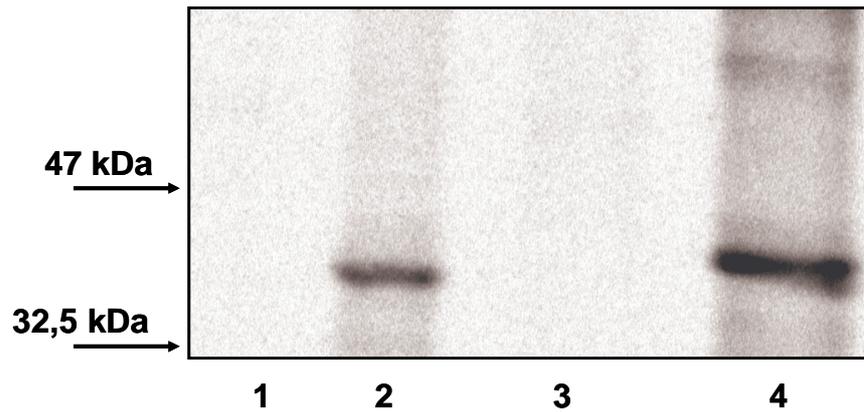


Abbildung 3.32: Nachweis des Einbaus von OsER-ANT1 in die *E. coli*-Membran mittels Methionin-Assay.

Spur 1: nicht-induzierte *E. coli* Zellen Gesamtprotein (Kontrolle); Spur 2: induzierte *E. coli* Zellen Gesamtprotein; Spur 3: nicht-induzierte *E. coli* Zellen Membranfraktion (Kontrolle); Spur 4: induzierte *E. coli* Zellen Membranfraktion; Spur 1+3: 50 µg Protein; Spur 2+4: 5 µg Protein

In Abbildung 3.32 kann eindeutig die Insertion des OsER-ANT1 in die *E. coli*-Membran (Spur 4) detektiert werden. Eine Proteindetektion bei einer molekularen Masse von circa 37 kDa stimmt dabei mit dem theoretisch ermittelten Wert von 36,6 kDa sehr gut überein. Bereits im Gesamtextrakt der *E. coli* Zellen kann das Protein mittels Methioninassay detektiert werden (Spur 2), wohingegen bei den nicht induzierten *E. coli* Zellen weder im Gesamtextrakt noch in der Membranfraktion eine Detektion von radioaktiv markiertem OsER-ANT1 beobachtet werden kann. Im weiteren Verlauf wurden diese *E. coli* Zellen, die OsER-ANT1 heterolog exprimieren, für eine biochemische Charakterisierung dieses Proteins verwendet. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu AtER-ANT1 und den klassischen mitochondrialen AACs wurde als erstes untersucht, ob es sich bei OsER-ANT1 ebenfalls um einen ATP/ADP-Transporter handelt.

Die Abbildung 3.33 zeigt die Aufnahme von $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP und $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ADP in Abhängigkeit von der Zeit.

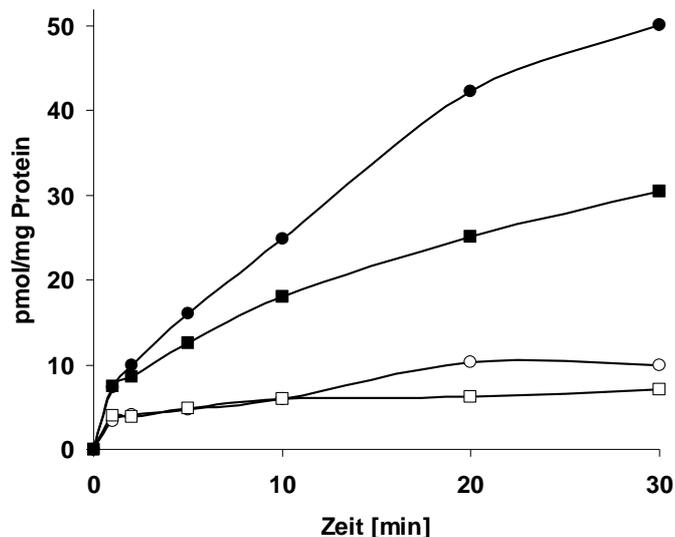


Abbildung 3.33: Zeitabhängige Adeninnukleotid-Aufnahme in intakte *E. coli* Zellen. Erläuterung siehe nächste Seite.

IPTG-induzierte *E. coli* Zellen, die das OsER-ANT1 codierende Plasmid tragen, wurden mit 10 μM [$\alpha^{32}\text{P}$]-ADP (■) oder [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP (●) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Nicht induzierte *E. coli* Zellen, die ebenfalls das OsER-ANT1 codierende Plasmid tragen, wurden als Kontrolle verwendet (□, ADP und ○, ATP). Die Ermittlung der Aufnahmezeiten basiert auf jeweils 4 unabhängigen Experimenten. Der SE beträgt weniger als 8% der Mittelwerte.

Abbildung 3.33 zeigt, dass es sich bei OsER-ANT1 ebenfalls um einen ATP/ADP-Transporter handelt. Sowohl für ATP als auch für ADP kann eine Aufnahme der Substrate in Abhängigkeit von der Zeit in OsER-ANT1 exprimierende *E. coli* Zellen beobachtet werden. Dabei scheint der Transport von ATP geringfügig höher zu sein als der Transport von ADP. Weiter konnte gezeigt werden, dass nicht induzierte *E. coli* Zellen, die ebenfalls das OsER-ANT1 codierende Plasmid tragen, nicht zu einer Aufnahme von radioaktiv markierten Adeninukleotiden in der Lage sind.

Zur weiteren Analyse dieses Transportproteins wurden die biochemischen Transportaffinitäten (K_M , V_{MAX}) des OsER-ANT1 ermittelt (siehe Abbildung 3.34).

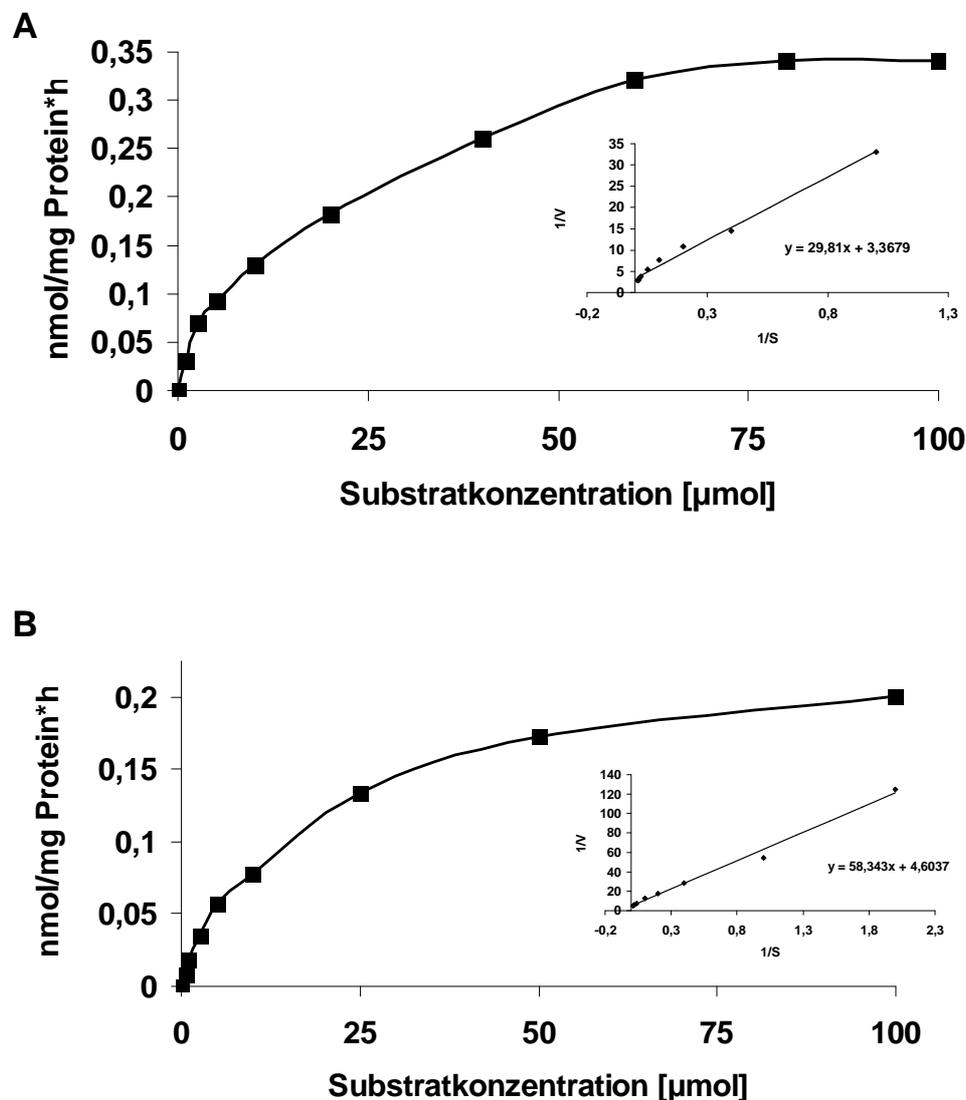


Abbildung 3.34: Bestimmung der biochemischen Charakteristika (K_M ; V_{MAX}) für ATP und ADP von OsER-ANT1 durch heterologe Expression in *E. coli*. A. Ermittlung der biochemischen Charakteristika für ATP; B. Ermittlung der biochemischen Charakteristika für ADP. S: Substratkonzentration; V: Aufnahmezeit [nmol/mg Protein*h]; Die Ermittlung der K_M und V_{MAX} -Werte erfolgte mittels Lineweaver-Burk-Plot; Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils 5 unabhängigen Experimenten, wobei der SE weniger als 5% der Mittelwerte beträgt.

Die Bestimmung der biochemischen Charakteristika des OsER-ANT1 erfolgte für ATP und ADP im zeitlinearen Bereich von 15 Minuten. In der Abbildung ist jeweils die Nettoaufnahme für ATP und ADP gezeigt. Dabei konnte für ATP ein K_M -Wert von 8,85 μM und ein V_{MAX} von 0,296 nmol/mg Protein*h ermittelt werden. Die durch heterologe Expression des OsER-ANT1 ermittelten Werte für ADP liegen im annähernd gleichen Bereich, wobei hier ein K_M von 12,67 μM und ein V_{MAX} -Wert von 0,217 nmol/mg Protein*h analysiert werden konnte. Die Betrachtung der Kurvenverläufe für ATP und ADP zeigen für beide Substrate eine typische Michaelis-Menten Kinetik. Weiter zeigt sich für OsER-ANT1 eine deutlich höhere Affinität für ATP und ADP im Vergleich zum AfER-ANT1 (ATP und ADP: ca. 300 μM). Interessanterweise liegen die K_M -Werte etwa im Bereich der K_M -Werte, die für die klassischen mitochondrialen AACs ermittelt wurden (HAFERKAMP *et al.*, 2002).

Zur näheren Untersuchung der Transporteigenschaften des OsER-ANT1 wurde im Folgenden die Substratspezifität mit Hilfe von Effektorstudien analysiert (siehe Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Einfluss verschiedener Metabolite auf die [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP Transportrate von OsER-ANT1. Die Aufnahme in *E. coli* Zellen, die OsER-ANT1 heterolog exprimieren, wurde für 15 min gemessen. Die ATP-Aufnahme wurde bei einer Substratkonzentration von 10 μM ermittelt. Die zu testenden Metabolite wurden in einem 5-fachen Überschuss (50 μM) dem Transportmedium hinzugegeben. Die Daten spiegeln die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten wider, wobei der SE kleiner als 5% der Mittelwerte ist.

Effektor	Transportrate (%)
Ohne Effektor	100.0
ATP	32.8
ADP	34.4
AMP	95.6
ADP-Glc	101.7
UDP-Glc	103.7
UDP-Gal	104.2
Adenosin	96.1
Adenin	101.7
GTP	97.5
CTP	102.1
UTP	105.4
dATP	100.1
dGTP	94.4
dCTP	103.3
dTTP	93.3
GDP	100.4
IDP	101.2
UDP	98.2
GMP	103.7
IMP	97.7
UMP	99.7
NAD	101.1
NADH	100.5
NADP	96.5
NADPH	103.9
Coenzym A	104.7

In Tabelle 3.8 zeigt sich, dass OsER-ANT1 ein spezifischer ATP/ADP-Transporter ist, der im Rahmen der hier getesteten möglichen Effektoren ausschließlich die Substrate ATP und ADP zu transportieren vermag. Ein 5-facher Überschuss an nicht radioaktiv markiertem ATP führt zu einer Reduktion der Aufnahme von radioaktiv markiertem ATP auf ungefähr 32,8%. Im Falle von ADP kann eine Reduktion der [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP-Aufnahme auf circa 34,4% beobachtet werden. Alle anderen Metabolite, die als mögliche Substrate getestet wurden, haben auf die Transportaktivität keinen signifikanten Einfluss, so dass sie als weitere mögliche Substrate ausgeschlossen werden können.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse über die enge Substratspezifität des OsER-ANT1 decken sich mit dem engen Substratspektrum, welches sowohl für AtER-ANT1 als auch für die klassischen mitochondrialen AACs ermittelt werden konnte.

Als nächster Punkt der biochemischen Charakterisierung wurde das Inhibitorspektrum des OsER-ANT1 detailliert untersucht. In Tabelle 3.9 sind diese Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP Transportrate von OsER-ANT1, AtER-ANT1 und AtAAC1. Der Transport in *E. coli* Zellen, die OsER-ANT1, AtER-ANT1 oder AtAAC1 exprimieren wurde über 15 min gemessen. Die [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP Transportrate wurde gemessen bei einer Substratkonzentration von 10 μM bei OsER-ANT1 und bei AtAAC1, im Falle von AtER-ANT1 bei 200 μM . Die Inhibitoren wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: Bongkrek-Säure (BKA, 10 μM); Carboxyatractylat (CAT, 1 mM); N-ethylmaleimid (NEM, 1 mM); Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP, 2 mM); Mersalyl (200 μM); Phenazinmethosulfat (PMS, 500 μM), Nitrobenzylthioinosin (NBMPR, 100 μM), Dilazep (200 μM). Die Daten spiegeln die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten wider, wobei der SE kleiner als 8% der Mittelwerte beträgt.

Effektor	Transportrate (%)		
	OsER-ANT1	AtER-ANT1	AtAAC1
Ohne Effektor	100.0	100.0	100.0
ADP(5x)	31.2	37.5	26.5
BKA	100.9	100.9	30.4
CAT	100.2	96.8	47.5
NEM	59.8	46.2	92.2
PLP	103.8	95.9	95.4
AMP-PNP	92.9	102.4	98.9
Mersalyl	97.3	102.8	93.1
PMS	101.2	101.8	96.2
NBMPR	103.7	97.3	103.9
Dilazep	99.2	97.7	94.1

Die Analyse des Inhibitorspektrums von OsER-ANT1 zeigt sehr interessante Ergebnisse. OsER-ANT1 ist genau wie AtER-ANT1 komplett insensitive gegen die klassischen Hemmstoffe der mitochondrialen AACs (BKA und CAT). Die mitochondrialen AACs lassen sich durch BKA auf ungefähr 30% ihrer Transportaktivität hemmen und durch CAT wird eine Inhibierung auf circa 48% erreicht. Dagegen liegt die Transportaktivität von OsER-ANT1 und AtER-ANT1 bei diesen Hemmstoffen annähernd bei 100%. Weiter fällt bei der Betrachtung der Ergebnisse auf, dass die ATP-Transportaktivität des OsER-ANT1 durch NEM stark inhibiert werden kann (rund 60%). Diese Analysen decken sich mit den Ergebnissen der Inhibitorstudien von AtER-ANT1. Auch bei diesem Homolog konnte NEM als starker Inhibitor identifiziert werden, wohingegen NEM auf die klassischen mitochondrialen AACs keinerlei Einfluss hat.

Zum Abschluss der biochemischen Charakterisierung des OsER-ANT1 durch heterologe Expression in *E. coli* wurde ebenfalls der Transportmechanismus über Rücktauschexperimente analysiert. In Abbildung 3.35 ist das Ergebnis dieser Experimente gezeigt.

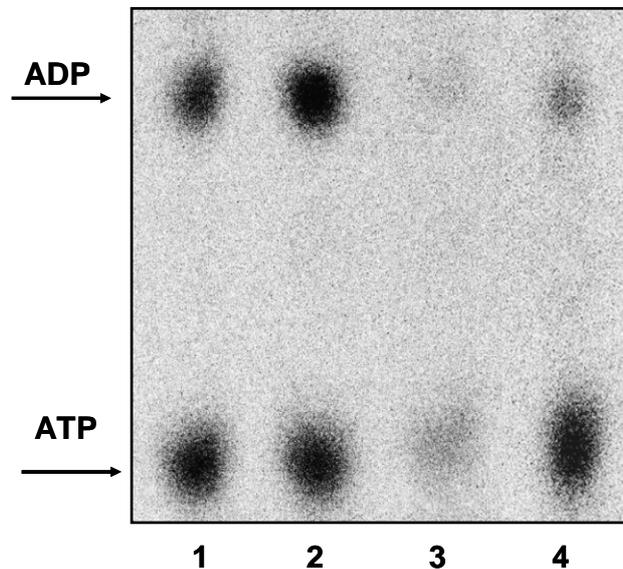


Abbildung 3.35: Dünnschichtchromatographie exportierter Adenin-Nukleotide. *E. coli* Zellen, die OsER-ANT1 exprimieren wurden mit 50 μM radioaktiv-markiertem [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP vorbeladen. Die vorbeladenen Zellen wurden für 2 min bei Raumtemperatur zu Rücktauschexperimenten eingesetzt. Spur 4: Auftrennung der radioaktiven Komponenten von aufgeschlossenen *E. coli* Zellen nach Vorbeladung; Spur 1-3: Auftrennung der radioaktiven Komponenten, die von den *E. coli* Zellen durch exogen appliziertes Substrat exportiert wurden (Spur 1: 250 μM ATP; Spur 2: 250 μM ADP; Spur 3: KPi-Puffer = Kontrolle).

Die Abbildung zeigt eindeutig, dass es sich bei OsER-ANT1 um einen Transporter handelt, der ATP und ADP im Gegentauschmechanismus transportiert. Sowohl die exogene Gabe von nicht radioaktiv markiertem ATP und ADP führt zu einem Efflux von radioaktiv markiertem ATP und ADP (Spur 1 + 2). Wird hingegen KPi-Puffer als Rücktauschsubstrat angeboten, so kommt es zu keinem signifikanten Efflux von radioaktiv markierten Nukleotiden (Spur 3). Der Zellaufschluss nach Vorbeladung der *E. coli* Zellen mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP zeigt, dass ungefähr 10% des radioaktiv markierten ATP innerhalb der *E. coli* Zellen während der zwei Minuten Vorbeladungszeit zu [$\alpha^{32}\text{P}$]-ADP umgewandelt wird.

Diese Ergebnisse decken sich mit der Analyse der Transportmechanismen von AtER-ANT1 sowie den klassischen mitochondrialen AACs, die ebenfalls ATP und ADP im Gegentausch transportieren.

3.2.3 Subzelluläre Lokalisierung des OsER-ANT1

Im Rahmen der Dissertation ist es bisher noch nicht gelungen, den Vollängenklon des OsER-ANT1 für ein GFP-Fusionskonstrukt zur subzellulären Lokalisierung mittels PCR zu amplifizieren. Die Nukleotidsequenz des OsER-ANT1 ist im Vergleich zu anderen Transportproteinen sehr GC-haltig und besitzt somit zahlreiche repetitive Sequenzbereiche, was zu Sekundärstrukturen während der PCR-Reaktionen führt. Dadurch bilden sich nach Klonierung der erhaltenen PCR-Produkte eine Reihe unterschiedlicher Klone heraus, die alle bisher entweder zusätzliche Sequenzen bzw. fehlende Sequenzbereiche aufwiesen. Aufgrund dieser Schwierigkeiten konnte die subzelluläre Lokalisierung des OsER-ANT1 bisher noch nicht näher analysiert werden.

3.3 Redundanz mitochondrialer AAC-Isoformen in *Arabidopsis thaliana*

Durch Sequenzierung des kompletten *Arabidopsis thaliana* Genoms konnten bereits 5 putative mitochondriale AAC-Isoformen entdeckt werden (LEROCH, 2003). Dabei konnte für die AAC-Isoformen 1-3 gezeigt werden, dass es sich bei diesen Transportproteinen um mitochondrial lokalisierte ATP/ADP-Transporter handelt (HAFERKAMP *et al.*, 2002). Bei AAC4, oder *AtER-ANT1*, konnte in der hier vorliegenden Dissertation nachgewiesen werden, dass dieser Transporter biochemisch ein ATP/ADP-Transporter darstellt, der aber im Gegensatz zu den mitochondrialen AACs in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Auf *AtER-ANT1* wird in diesem Kapitel nicht mehr näher eingegangen, da die Charakterisierung bereits detailliert in Kapitel 3.1 beschrieben wurde. Neben *AtER-ANT1* gibt es dennoch eine weitere putative AAC-Isoform in *Arabidopsis thaliana* (AAC5).

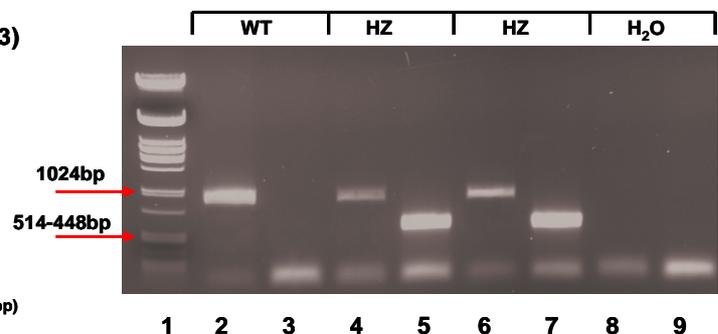
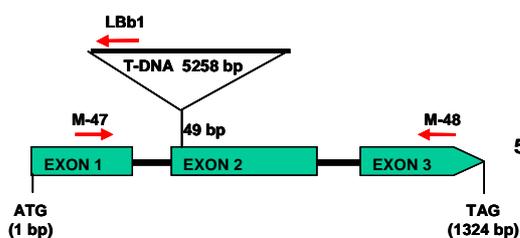
In diesem Teilabschnitt sollte die physiologische Relevanz der einzelnen AAC-Isoformen durch entsprechende Knockout-Analysen überprüft werden. Dazu wurden die Samen von geselbsteten heterozygoten Pflanzen entweder von der SALK- oder GABY-Bibliothek erworben und auf Erde ausgesät. Weiter wurde versucht, homozygote Knockout-Pflanzen der jeweiligen AAC-Isoformen zu züchten. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Kurztagbedingungen, wobei das Blattmaterial für das Knockout-Screening der einzelnen Linien jeweils nach etwa drei Wochen Anzucht geerntet wurde.

3.3.1 Knockout-Linien bezüglich des *AtAAC1*-Gens

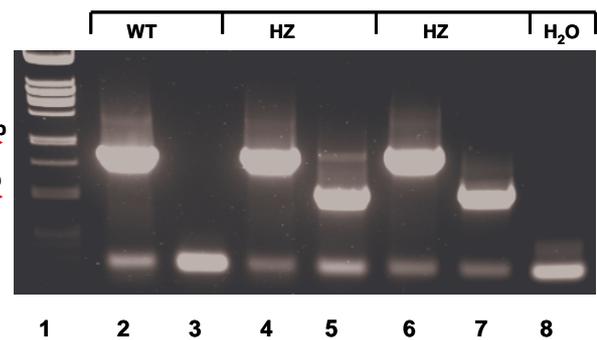
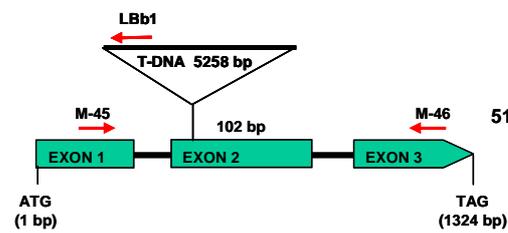
Für *AtAAC1* existieren zurzeit drei unabhängige Knockout-Linien. Zur Generierung homozygoter *AtAAC1*-Knockout-Pflanzen wurden heterozygote Pflanzen geselbstet und die geernteten Samen wieder auf Erde ausgesät. Die angezogenen Pflanzen wurden durch die Verwendung spezifischer *AtAAC1*-Primer und PCR auf Homozygotie untersucht. In der folgenden Abbildung ist zum einen die Stelle der T-DNA-Insertion bei den jeweiligen Linien zum anderen das Screening nach homozygoten *AtAAC1* Knockout-Pflanzen durch PCR gezeigt.

A.

AAC1 (*A.t.*) Knockout-Linie 1 (SALK-003003)



B.

AAC1 (*A.t.*) Knockout-Linie2 (SALK-014636)

C.

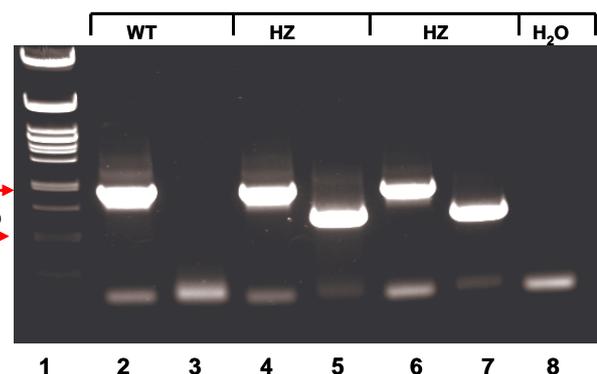
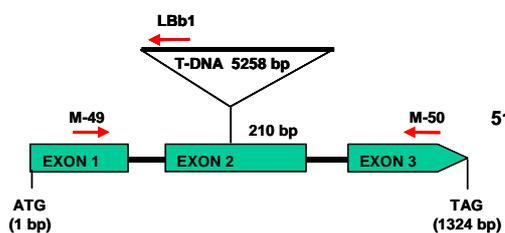
AAC1 (*A.t.*) Knockout-Linie3 (SALK-106494)

Abbildung 3.36: Schema der T-DNA-Insertion in drei unabhängigen *AtAAC1* Knockout-Linien sowie Screening der Pflanzen mittels PCR. A. Knockout-Linie 1 (SALK_003003) mit den genspezifischen Primern M-47 und M-48; B. Knockout-Linie 2 (SALK_014636) mit den genspezifischen Primern M-45 und M-46; C. Knockout-Linie 3 (SALK_106494) mit den genspezifischen Primern M-49 und M-50; Spur 1: Marker; Spur 2+4+6: genspezifische Primerkombination; Spur 3+5+7: T-DNA-spezifische Primerkombination mit LbB-1 als T-DNA-spezifischer Primer; Spur 8+9: H₂O-Kontrolle

Insgesamt wurden pro Linie jeweils 30 Pflanzen von geselbsteten heterozygoten Pflanzen einer PCR-Analyse unterzogen. Die Abbildung stellt dabei nur einen Teil des jeweiligen Screenings dar. Wie in Abbildung 3.36 ersichtlich ist es bei dem Screening von allen drei unabhängigen Linien mittels PCR nicht gelungen homozygote *AtAAC1*-Pflanzen zu identifizieren. Bei den PCR-Analysen konnten bei allen drei Linien lediglich Wildtyp-Pflanzen sowie heterozygote Knockout-Pflanzen bezüglich des *AtAAC1*-Gens detektiert werden. Scheinbar sind Pflanzen, bei denen AAC1 komplett ausgeschaltet ist, letal. Dieses Ergebnis scheint eine herausragende Rolle des *AtAAC1* im Stoffwechsel der Pflanzen zu indizieren. Weiter kann davon ausgegangen werden, dass das Ausschalten des *AtAAC1*-Gens nicht von den anderen existierenden mitochondrialen ATP/ADP-Transportern, AAC2 und AAC3, kompensiert werden kann.

3.3.2 Identifizierung einer Knockout-Linie bezüglich des *AtAAC2*-Gens

Im Falle von *AtAAC2* existiert bislang erst eine T-DNA Linie. Diese Linie wird nicht von der SALK- sondern von der GABY-Bibliothek zur Verfügung gestellt. In Abbildung 3.37 ist die Stelle der T-DNA-Insertion in das *AAC2* Gen mit anschließendem Screening geselbsteter heterozygoter Pflanzen gezeigt.

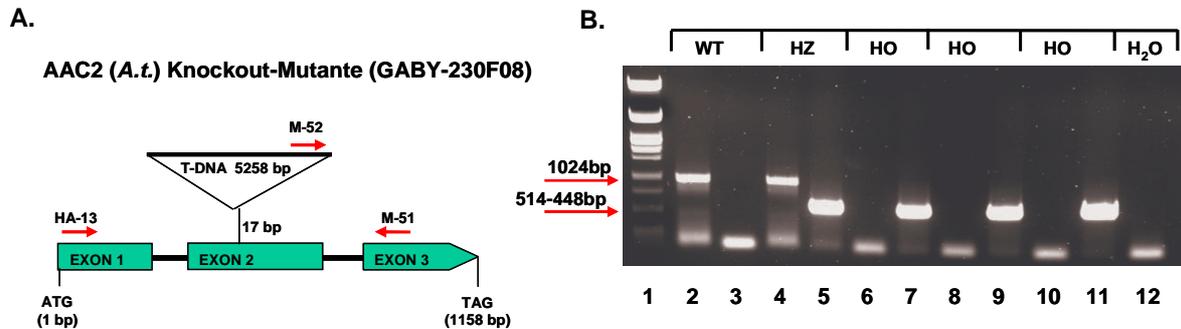


Abbildung 3.37: Schema der T-DNA-Insertion in das *AtAAC2* Gen sowie Screening der Pflanzen nach homozygoten Knockouts mittels PCR. A. Schema der T-DNA-Insertion; B: Screening nach homozygoten *AtAAC2* Knockout-Pflanzen mit den genspezifischen Primern HA-13 und M-51 sowie dem T-DNA-spezifischen Primer M-52; Spur 1: Marker; Spur 2+4+6+8+10: genspezifische Primerkombination; Spur 3+5+7+9+11: T-DNA-spezifische Primerkombination; Spur 12: H₂O-Kontrolle.

Im Gegensatz zu *AtAAC1* war es im Falle von *AtAAC2* möglich homozygote Knockout-Pflanzen bezüglich des *AtAAC2*-Gens zu identifizieren (Spur 6-11). Diese Pflanzen entwickeln sich unter normalen Wachstumsbedingungen (auf Erde und bei Kurztag) genau wie Wildtyp-Pflanzen. Das Ausschalten des *AtAAC2*-Gens führt somit unter diesen ambienten Wachstumsbedingungen zu keinem direkt sichtbaren Phänotyp. Im Vergleich zu *AtAAC1* scheint *AtAAC2* eine eher untergeordnete Rolle im pflanzlichen Stoffwechsel zu spielen.

3.3.3 Analyse einer Knockout-Linie bezüglich des *AtAAC3*-Gens

Für das *AtAAC3*-Gen existiert ebenfalls eine T-DNA-Linie. Diese wurde für Analysen von der SALK-Bibliothek geliefert. Auch für diese Linie wurde versucht, homozygote Knockout-Pflanzen bezüglich des *AtAAC3* Gens zu identifizieren. In der folgenden Abbildung wird die T-DNA-Insertion in das *AtAAC3* Gen sowie das darauf folgende Screening nach homozygoten Knockout-Pflanzen gezeigt.

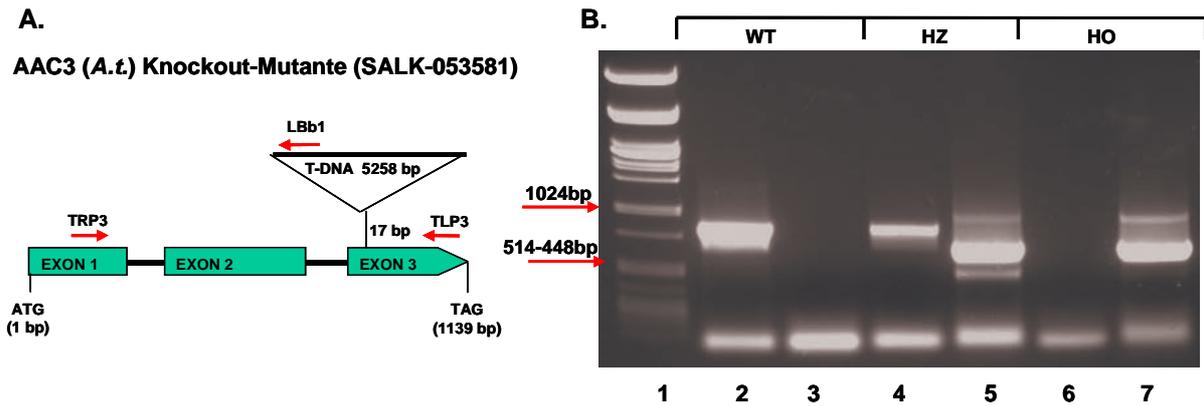


Abbildung 3.38: Schema der T-DNA-Insertion in der *AtAAC3* Knockout-Linie (SALK_053581) sowie Screening der Pflanzen mittels PCR. A. Schema der T-DNA-Insertion in das *AtAAC3* Gen; B: Screening nach homozygoten *AtAAC3* Knockout-Pflanzen mit den genspezifischen Primern TLP-3 und TRP-3 sowie dem T-DNA-spezifischen Primer Lbb-1; Spur 1: Marker; Spur 2+4+6: genspezifische Primerkombination; Spur 3+5+7: T-DNA-spezifische Primerkombination.

Die Betrachtung der Abbildung zeigt eindeutig, dass auch bei AAC3 homozygote *AtAAC3* Knockout-Pflanzen identifiziert werden konnten. Auch diese Pflanzen sind wie die homozygoten *AtAAC2* Knockout-Pflanzen nicht letal. Die homozygoten *AtAAC3*-Knockout-Pflanzen weisen weiter bei einer Anzucht der Pflanzen unter ambienten Wachstumsbedingungen keinerlei sichtbaren morphologischen Phänotyp auf.

Obwohl *AtAAC1*, 2 und 3 alles mitochondriale ATP/ADP-Transporter sind zeigen die Analysen der Knockout-Pflanzen die herausragende Stellung des AAC1 im pflanzlichen Stoffwechsel. *AtAAC1* scheint dabei das Haupttransportprotein zu sein, wohingegen AAC2 und AAC3 möglicherweise eher entwicklungs- oder gewebespezifische Funktionen besitzen.

3.3.4 Analyse einer Knockout-Linie bezüglich des *AtAAC5*-Gens und Herstellung von AAC5-Promotor-GUS-Fusionskonstrukten

Wie bereits oben erwähnt existiert eine fünfte AAC-Isoform. Über eine heterologe Expression in *E. coli* und Komplementationsexperimente mit spezifischen AAC-Hefe-Mutanten konnte die biochemische Funktion dieses AAC5 bisher nicht geklärt werden (LEROCH, 2003). Subzelluläre Lokalisierungsstudien mittels GFP-Fusion zeigten, dass AAC5 möglicherweise in den Mitochondrien lokalisiert ist (LEROCH, 2003).

Zur weiteren Charakterisierung dieses Proteins wurde in dieser Arbeit versucht, homozygote *AtAAC5*-Knockout-Pflanzen zu züchten. Von der SALK-Bibliothek existiert bisher erst eine Linie, bei der die T-DNA-Insertion nicht direkt im Exonbereich integriert. Die Insertion der T-DNA findet hier 47 bp hinter dem Stop-Codon der codierenden Sequenz statt. Dies verhindert aber in der Regel eine korrekte Termination der mRNA, was einen Abbau zur Folge hat. In Abbildung 3.39 ist ein Schema der Insertion gezeigt, sowie das Screening geselbsteter heterozygoter *AtAAC5*-Pflanzen mittels PCR.

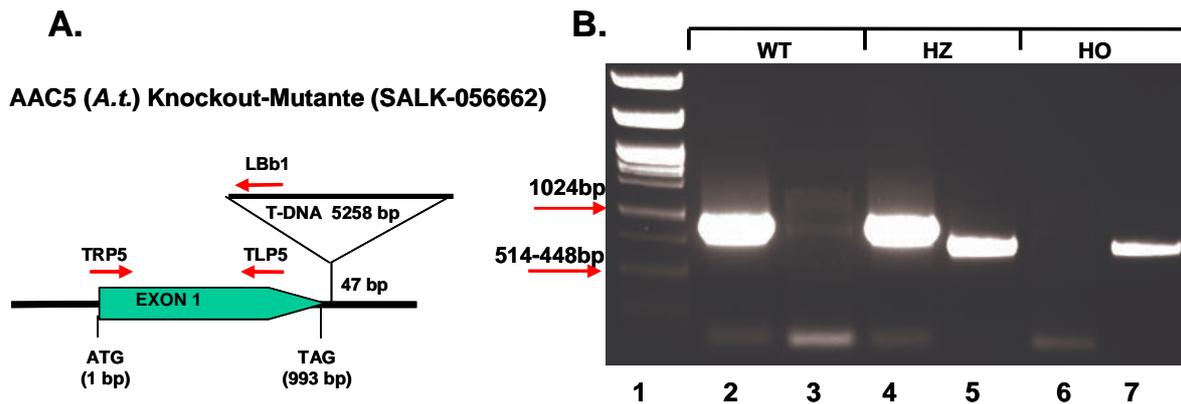


Abbildung 3.39: T-DNA-Insertion in das *AtAAC5*-Gen mit anschließendem Screening nach homozygoten *AtAAC5*-Knockout-Pflanzen. A. Schema der T-DNA-Insertion; B: Screening nach homozygoten *AtAAC5* Knockout-Pflanzen mit den genspezifischen Primern TLP-3 und TRP-3 sowie dem T-DNA-spezifischen Primer LBb-1; Spur 1: Marker; Spur 2+4+6: genspezifische Primerkombination; Spur 3+5+7: T-DNA-spezifische Primerkombination.

Auch im Falle von *AtAAC5* konnten homozygote Knockout-Pflanzen isoliert werden. Auch diese Pflanzen besitzen im Vergleich zum Wildtyp bei einer Anzucht auf Erde und unter Kurztagbedingungen keinerlei auffälligen Phänotyp. Da die Insertion nicht direkt im Gen stattfindet, sollte allerdings unbedingt noch über eine zweite Methode (z.B. Northern-Blot; quantitative RT-PCR) nachgeprüft werden, ob die Insertion tatsächlich zu einer signifikanten Reduktion des *AtAAC5* Transkriptes führt.

Um die physiologische Funktion des *AtAAC5* näher zu charakterisieren, wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit ein AAC5-Promotor-GUS-Fusionskonstrukt für die Analyse der entwicklungs- und gewebespezifischen Expression generiert. Die transgenen *AtAAC5*-Promotor-GUS-Pflanzen wurden durch eine integrierte Basta-Resistenz selektiert und befinden sich zurzeit in der Anzucht. Nach Selbstung dieser Pflanzen und Samenernte können die transgenen *AtAAC5*-Promotor-GUS-Pflanzen erneut ausgesät werden. Diese stehen daraufhin zu Untersuchungen bezüglich der gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression des *AtAAC5* mittels histochemischer Färbung zur Verfügung. Die Herstellung des Plasmidkonstruktes für die Generierung der transgenen *AtAAC5*-Promotor-GUS-Pflanzen ist im Detail in Abbildung 3.40 dargestellt.

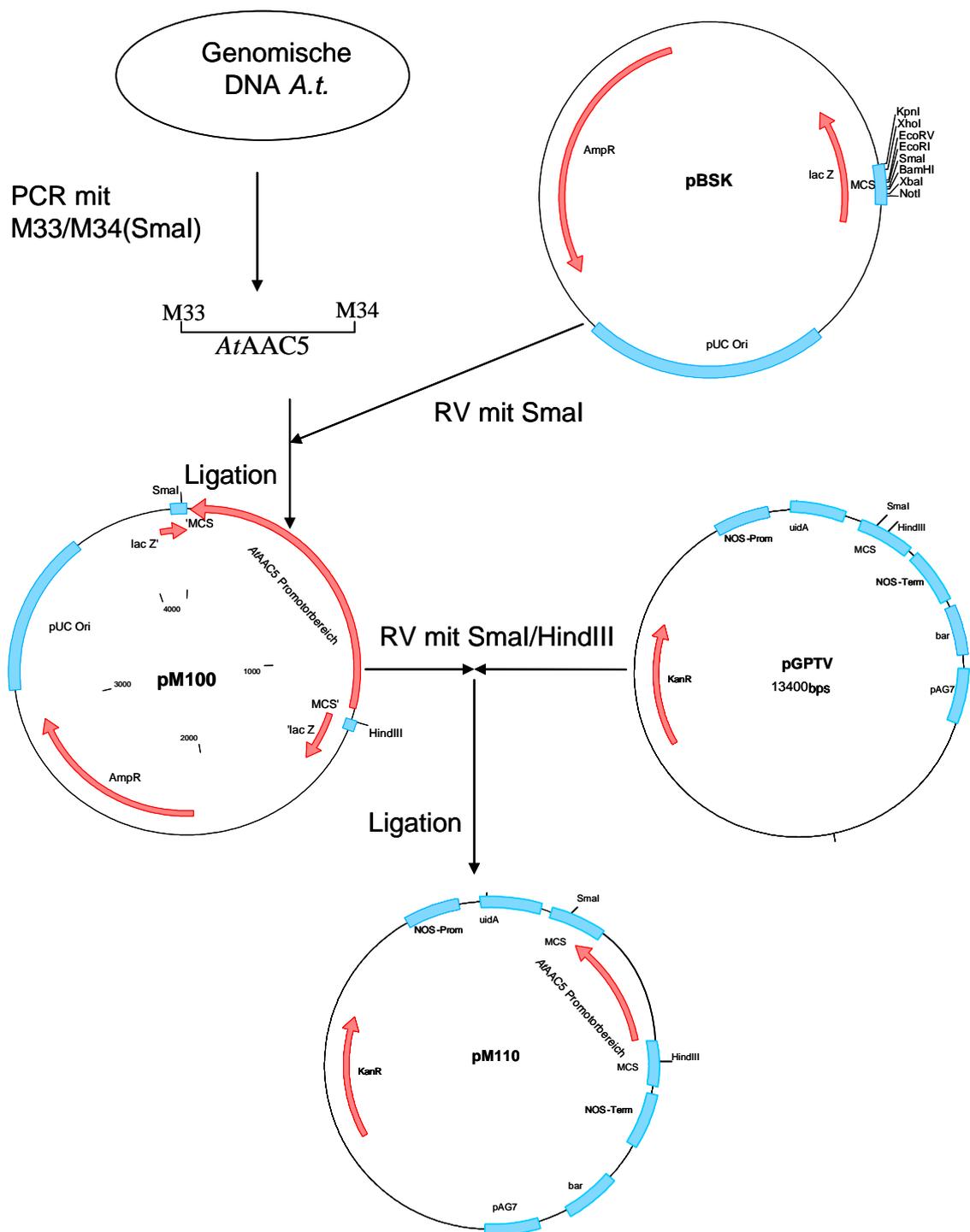


Abbildung 3.40: Klonierungsstrategie zur Herstellung transgener AAC5-Promotor-GUS-Pflanzen.

AmpR: Ampicillinresistenz; KanR: Kanamycinresistenz; MCS: multiple cloning site; NOS-Prom: NOS-Promotor; NOS-Term: NOS-Terminator; bar: Phosphinothricin-Acetyl-Transferase; uidA: β -Glucuronidase-Gen; pAG7: Polyadenylierungsstelle von Gen7

In der blauen Box in Abbildung 3.41 sind die klassischen mitochondrialen ATP/ADP-Transporter aus den verschiedensten Organismen dargestellt. Ebenfalls befindet sich in dieser Gruppe ein hydrogenosomaler ATP/ADP-Transporter aus dem Protisten *Neocallimastix*, der aufgrund seiner biochemischen Charakteristika - die mit Hilfe des *E. coli*-Systems bestimmt wurden - phylogenetisch in die Gruppe der mitochondrialen AACs eingruppiert werden kann (VONKEN *et al.*, 2002). Weiter existiert in diesem phylogenetischen Stammbaum eine Gruppe von ATP/ADP-Transportern aus Hydrogenosomen des anaeroben Flagellaten *Trichomonas*, die phylogenetisch alternative ATP/ADP-Transporter tragen (orange Box; TJADEN *et al.*, 2004). Das mitochondriale Transportprotein aus *Entamoeba histolytica* befindet sich phylogenetisch im Stammbaum zwischen den klassischen AACs und dem alternativen ATP/ADP-Transporter aus *Trichomonas* (blaue Box). *EhANT1* wird dabei zu der Brittle-Familie eingegliedert, wobei es sich bei diesen Transportproteinen um plastidär lokalisierte Proteine handelt (LEROCH *et al.*, 2005).

3.4.2 Biochemische Charakterisierung des ANT1 aus *Entamoeba histolytica*

Zur biochemischen Charakterisierung des ANT1 aus *Entamoeba histolytica* wurde das Transportprotein heterolog in *E. coli* exprimiert. Das Konstrukt für die heterologe Expression wurde bereits während der Diplomarbeit von LEROCH (2003) hergestellt. Im Rahmen der Diplomarbeit wurden außerdem Aufnahmeexperimente an intakten *E. coli*-Zellen durchgeführt, wobei der *E. coli* Stamm BL21 verwendet wurde. Die Aufnahmeexperimente mit diesen *E. coli* Zellen erwiesen sich als sehr schwierig, da es häufig zu einer Rekombination und somit zu keiner Expression des zu untersuchenden Proteins kam. Aufgrund dessen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Retransformation des Konstruktes in einen anderen *E. coli* Expressionsstamm durchgeführt. Dabei handelt es sich um den Stamm C43. Die Expression des Proteins in diesem Stamm und auch die daran durchgeführten Aufnahmeexperimente waren signifikant stabiler, so dass die gesamte biochemische Charakterisierung des ANT1 mit diesem *E. coli* Stamm durchgeführt wurde. In Abbildung 3.42 ist die zeitabhängige Adeninnukleotid-Aufnahme im *E. coli* Stamm C43 durch *EhANT1* gezeigt.

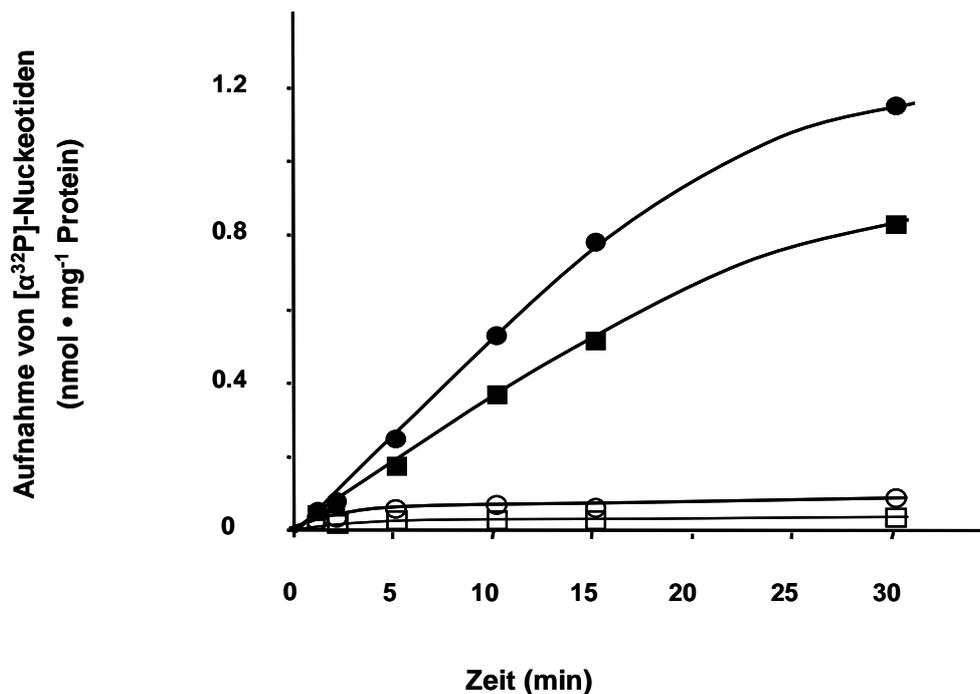


Abbildung 3.42: Zeitabhängige Adeninnukleotid-Aufnahme in intakte *E. coli* Zellen. Erläuterungen siehe nächste Seite.

IPTG-induzierte *E. coli* Zellen, die das *EhANT1* codierende Plasmid tragen, wurden mit 500 μM [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP (■) oder [$\alpha^{32}\text{P}$]-ADP (●) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Nicht induzierte *E. coli* Zellen, die ebenfalls das ANT1 codierende Plasmid tragen, wurden als Kontrolle verwendet (□, ATP und ○, ADP). Die Ermittlung der Aufnahmeraten basiert auf jeweils drei unabhängigen Experimenten. Der SE beträgt weniger als 8% der Mittelwerte.

Die Abbildung zeigt eine eindeutige zeitabhängige Aufnahme sowohl für ATP als auch für ADP in *EhANT1* exprimierende *E. coli* Zellen. Bei den nicht induzierten *E. coli* Zellen können hingegen für beide Substrate keine signifikanten Aufnahmeraten ermittelt werden. Ein Vergleich der Aufnahmeraten zeigt, dass für ADP leicht erhöhte Transportaktivitäten im Vergleich zu ATP gemessen wurden. Die Aufnahmen sind sowohl für ATP als auch für ADP in einem Bereich von bis zu 15 Minuten zeitlinear. Zur weiteren Analyse des mitochondrialen Transportproteins wurden die biochemischen Charakteristika (K_M , V_{MAX}) für den ATP- und ADP-Transport bestimmt (siehe Abbildung 3.43).

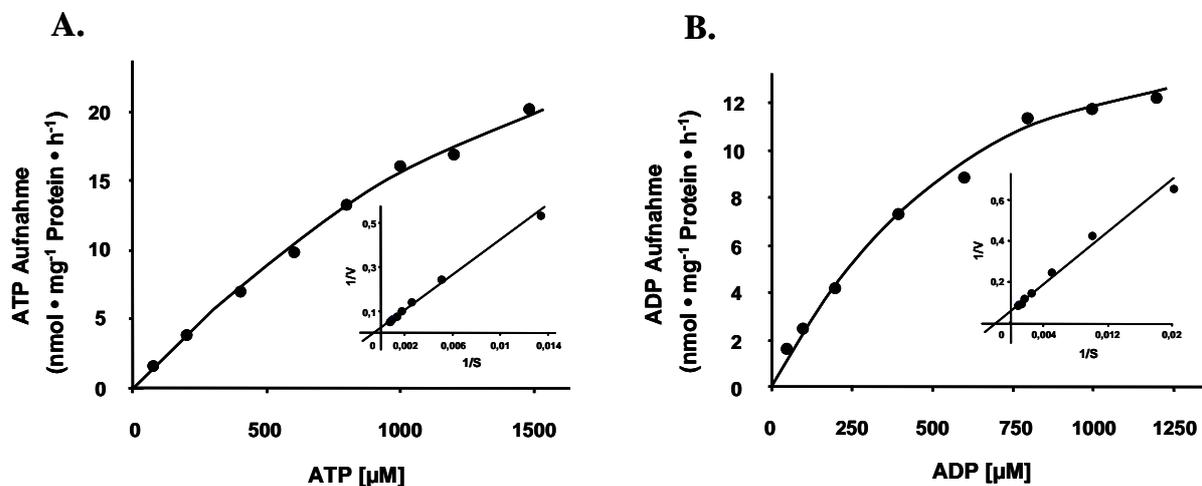


Abbildung 3.43: Bestimmung der biochemischen Charakteristika (K_M ; V_{MAX}) für ATP und ADP von *EhANT1* durch heterologe Expression in *E. coli*. A. Ermittlung der biochemischen Charakteristika für ATP; B. Ermittlung der biochemischen Charakteristika für ADP. S: Substratkonzentration; V: Aufnahmerate [nmol/mg Protein•h]; Die Ermittlung der K_M und V_{MAX} -Werte erfolgte mittels Lineweaver-Burk-Plot; Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils 5 unabhängigen Experimenten, wobei der SE weniger als 5% der Mittelwerte beträgt.

In Abbildung 3.43 sind jeweils die Netto-Aufnahmen für ATP und ADP in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gezeigt. Die Ermittlung der biochemischen Daten bezüglich *EhANT1* erfolgte im zeitlinearen Bereich von 15 Minuten. Dabei konnte für ATP ein K_M von 1170 μM und für ADP ein K_M -Wert von 502 μM bestimmt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass *EhANT1* für ADP signifikant affiner ist als für ATP. Weiter lässt sich sagen, dass es sich insgesamt bei ANT1 aus *Entamoeba histolytica* um ein niedrig affines Transportprotein handelt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ebenfalls die Abhängigkeit der Transportaffinität von dem Entkoppler CCCP untersucht. Mit dem stabileren *E. coli*-C43-System konnte hier keine Abhängigkeit des ATP und ADP-Transportes vom Membranpotential beobachtet werden. In der folgenden Tabelle sind die K_M -Werte der klassischen AACs und alternativen ATP/ADP-Transportern vergleichend gegenübergestellt.

Tabelle 3.10: K_M Werte für ATP und ADP verschiedener heterolog in *E. coli* exprimierter Adeninnukleotid-Transporter bei unterschiedlichen energetisierten Bedingungen. K_M -Wert ist in nmol/mg Protein*h angegeben. Bei CCCP-Behandlung wurden die *E. coli* Zellen mit 100 μ M CCCP für zwei Minuten entkoppelt. Die Aufnahmeexperimente wurden durchgeführt wie früher beschrieben (HAFERKAMP *et al.*, 2002; TJADEN *et al.*, 2004). AAC2 *A.t.*: mitochondrialer ATP/ADP-Transporter aus *Arabidopsis thaliana*; AAC1 *N.spec.*: hydrogenosomaler, klassischer AAC aus *Neocallimastix*; HMP31 *T.g.*: alternativer hydrogenosomaler ATP/ADP-Transporter aus *Trichomonas gallinae*; EhANT1: alternativer mitochondrialer ATP/ADP-Transporter aus *Entamoeba histolytica*.

	AAC2 <i>A.t.</i>	AAC1 <i>N.spec.</i>	HMP31 <i>T.g.</i>	EhANT1
KM ADP (-CCCP)	14	165	64	502
KM ADP (+CCCP)	8	155	42	Unverändert
KM ATP (-CCCP)	22	2325	134	1170
KM ATP (+CCCP)	6	226	47	Unverändert

Die Betrachtung der Tabelle 3.10 zeigt, dass es anhand der Bestimmung der K_M -Werte alleine sehr schwierig ist, ein Transportprotein phylogenetisch einzuordnen. Alle in der Tabelle gezeigten ATP/ADP-Transporter besitzen sehr unterschiedliche K_M -Werte und CCCP-Abhängigkeiten. Bereits bei den klassischen AACs gibt es hier Unterschiede. So ändert sich bei AAC2 *A.t.* der K_M für ATP und ADP in Abhängigkeit vom Energetisierungszustand. Bei dem klassischen AAC aus *Neocallimastix* hingegen ändert sich lediglich die ATP-Transportaffinität in Abhängigkeit von der Energetisierung. Weiter zeigt sich bei dem ATP/ADP-Transporter aus *Entamoeba histolytica* im Vergleich eine sehr geringe Affinität für ADP und ATP im energetisierten Zustand. Weiter konnte, wie bereits oben erwähnt, keine Affinitätsänderung für beide Substrate in Abhängigkeit von CCCP beobachtet werden.

Zur weiteren biochemischen Charakterisierung des mitochondrialen Transportproteins aus *Entamoeba histolytica* wurde das Substratspektrum des ANT1 mittels Effektorstudien an intakten *E. coli* C43 Zellen untersucht. Zum Vergleich sind ebenfalls die Daten für die klassischen AACs und für einen alternativen hydrogenosomalen ATP/ADP-Transporter gezeigt.

Tabelle 3.11: Effekte verschiedener Metabolite auf die ADP-Aufnahme in *E. coli* Zellen, die unterschiedliche Adeninnukleotid-Transporter exprimieren. Die Aufnahmeexperimente wurden durchgeführt wie früher beschrieben (HAFERKAMP *et al.*, 2002; TJADEN *et al.*, 2004). Dabei wurde bei EhANT1 die Aufnahme bei 500 μ M über eine Zeit von 15 min gemessen. AAC2 *A.t.*: mitochondrialer ATP/ADP-Transporter aus *Arabidopsis thaliana*; AAC1 *N.spec.*: hydrogenosomaler, klassischer AAC aus *Neocallimastix*; HMP31 *T.g.*: alternativer hydrogenosomaler ATP/ADP-Transporter aus *Trichomonas gallinae*; EhANT1: alternativer mitochondrialer ATP/ADP-Transporter aus *Entamoeba histolytica*; Daten schwarz hervorgehoben: gemeinsame Effektoren bei allen untersuchten Transportproteinen; Rot hervorgehobene Daten zeigen Unterschiede des EhANT1 zu den anderen Transportproteinen.

Effektor	Transportrate in %			
	AAC2 <i>A.t.</i>	AAC1 <i>N.spec.</i>	HMP31 <i>T.g.</i>	EhANT1
Ohne Effektor	100.0	100.0	100.0	100.0
ADP	21.6	6.8	18.3	32.6
ATP	36.6	48.8	49.5	42.6
AMP	104.7	96.4	83.7	58.1
UTP	99.2	104.5	91.6	90.3
CTP	113.7	100.0	87.3	95.0

Effektor	AAC2 <i>A.t.</i>	AAC1 <i>N.spec.</i>	HMP31 <i>T.g.</i>	<i>EhANT1</i>
GTP	115.5	100.8	90.2	92.1
UMP	110.3	106.4	103.9	101.2
NADH	100.2	103.4	87.1	91.8
dATP	90.0	88.3	94.6	49.8
dTTP	100.8	98.1	100.4	111.3
dGTP	87.5	91.3	82.4	97.1
dCTP	89.0	99.7	95.8	106.5
UDP-Glc	111.3	90.0	112.4	91.4
ADP-Glc	109.2	94.2	96.2	92.4
Coenzym A	95.8	97.4	96.3	92.8

Alle hier untersuchten ATP/ADP-Transportproteine zeigen in den Effektorstudien, dass sowohl ADP als auch ATP einen starken Effekt auf die ADP-Transportaktivität hat. Weiter fällt auf, dass nicht radioaktiv markiertes ADP bei allen Transportern die ADP-Aufnahme stärker hemmt als ATP. Bei den klassischen AACs und dem alternativen hydrogenosomal ATP/ADP-Transporter aus *Trichomonas gallinae* konnten nur ATP und ADP als Substrate identifiziert werden. Alle anderen hier getesteten Metabolite hatten keinen signifikanten Einfluss auf die ADP-Transportrate. Es handelt sich somit bei diesen Transportern um Proteine mit einem sehr spezifischen und engen Substratspektrum. Bei ANT1 aus *Entamoeba histolytica* konnten weitere mögliche Transportsubstrate neben ATP und ADP identifiziert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl AMP als auch dATP mögliche Substrate dieses Transportproteins sind. Nicht radioaktiv markiertes AMP konnte dabei die ADP-Transportrate auf 58,1% inhibieren und die Zugabe von dATP im Überschuss ergab eine Hemmung der ADP-Transportaktivität auf 49,8%. Somit unterscheidet sich der ANT1 aus *Entamoeba histolytica* von den bereits charakterisierten klassischen AACs und den alternativen hydrogenosomal ATP/ADP-Transportern stark im Substratspektrum. Die phylogenetische Stammbaumanalyse (Abbildung 3.44) hat gezeigt, dass der *EhANT1* phylogenetisch zu der Brittle-Familie eingruppiert wird. Dabei konnte bereits für das Brittle-Protein aus *Solanum tuberosum* gezeigt werden, dass dieses Transportprotein ebenfalls ATP, ADP und AMP als Substrate besitzt (LEROCH *et al.*, 2005).

Zur abschließenden biochemischen Charakterisierung des *EhANT1* wurden Inhibitorstudien bezüglich der *EhANT1* Transportaktivität durchgeführt. Zum besseren Vergleich wurde auch der Effekt der verwendeten Inhibitoren auf die klassischen AACs und den alternativen hydrogenosomal ATP/ADP-Transporter HMP31 aus *Trichomonas gallinae* bestimmt. In Tabelle 3.12 sind diese Ergebnisse illustriert.

Tabelle 3.12: Effekte verschiedener Inhibitoren auf die ADP-Aufnahme in *E. coli* Zellen, die unterschiedliche Adeninnukleotid-Transporter exprimieren. Die Aufnahmeexperimente wurden durchgeführt wie früher beschrieben (HAFERKAMP *et al.*, 2002; TJADEN *et al.*, 2004). Dabei wurde bei *EhANT1* die Aufnahme bei 500 μM über eine Zeit von 15 min gemessen. AAC2 *A.t.*: mitochondrialer ATP/ADP-Transporter aus *Arabidopsis thaliana*; AAC1 *N.spec.*: hydrogenosomaler, klassischer AAC aus *Neocallimastix*; HMP31 *T.g.*: alternativer hydrogenosomaler ATP/ADP-Transporter aus *Trichomonas gallinae*; *EhANT1*: alternativer mitochondrialer ATP/ADP-Transporter aus *Entamoeba histolytica*; Die Inhibitoren wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Bongkrek-Säure (BKA, 10 μM); Carboxyatractylat (CAT, 1 mM); N-ethylmaleimid (NEM, 1 mM); Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP, 2 mM); Mersalyl (200 μM).

Inhibitor	Transportrate in %			
	AAC2 <i>A.t.</i>	AAC1 <i>N.spec.</i>	HMP31 <i>T.g.</i>	<i>EhANT1</i>
Ohne Inhibitor	100.0	100.0	100.0	100.0
BKA	17.4	64.2	98.2	101.2
CAT	38.6	100.9	99.1	97.8
NEM	65.6	105.9	92.7	33.3
PLP	104.6	54.5	98.8	40.9
Mersalyl	100.4	95.7	100.7	98.9

Die Inhibitorstudien zeigen, dass die klassischen AACs sensitiv gegen Bongkrek-Säure (BKA) sind. Bei dem Inhibitor Carboxyatractylat (CAT) kann dagegen eine Inhibierung der Transportaktivität nur bei dem pflanzlichen AAC (AAC2 *A.t.*) beobachtet werden. Die alternativen ATP/ADP-Transporter (HMP31 *T.g.* und *EhANT1*) hingegen sind sowohl für BKA als auch für CAT komplett insensitive. Bei *EhANT1* kann dafür eine starke Inhibierung der ADP-Transportaktivität mit den Inhibitoren NEM und PLP gezeigt werden. NEM hemmt den ADP-Transport auf 33,3% und PLP auf 40,9%. NEM scheint auch den pflanzlichen AAC (AAC2 *A.t.*) zu inhibieren. Auf alle anderen Transportproteine hat NEM keinen signifikanten Einfluss. Im Falle von PLP kann neben der Inhibierung von *EhANT1* auch der hydrogenosomale AAC aus *Neocallimastix* signifikant gehemmt werden.

Die ermittelten Daten zeigen, dass alle hier im Vergleich untersuchten Transportproteine sehr verschiedene Substrataffinitäten, Substratspektren und Inhibitorspektren aufweisen, die auf eine unterschiedliche Evolution der ATP/ADP-Transporter mit sehr spezifischen biochemischen und physiologischen Eigenschaften hindeuten.

4. Diskussion

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit lag in einer umfassenden Charakterisierung der AAC-Isoform *AtER-ANT1* aus *Arabidopsis thaliana* (Kapitel 4.1). Zur biochemischen Charakterisierung des *AtER-ANT1* wurden zahlreiche Aufnahmestudien durchgeführt, wobei hierzu das Transportprotein heterolog im *E. coli*-System exprimiert wurde. Zudem konnte durch den Einsatz verschiedener Methoden die subzelluläre Lokalisierung des *AtER-ANT1* detailliert überprüft werden. Zum einen wurde die transiente Expression des Proteins in Tabakprotoplasten mittels *AtER-ANT1*-GFP-Fusionskonstrukt analysiert. Zum anderen wurden *in vitro*-Translationsexperimente mit anschließendem Targeting in ER-Mikrosomen durchgeführt. Zur Analyse der subzellulären Lokalisierung des *AtER-ANT1 in planta* konnten im Rahmen der Arbeit transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, die *AtER-ANT1* überexprimieren, hergestellt werden. Die Detektion des Proteins *in planta* wurde durch einen am Protein fusionierten c-terminalen Myc-Tag gewährleistet, der unter Einsatz eines spezifischen Antikörpers innerhalb der Pflanze nachweisbar ist. Neben gewebespezifischen und entwicklungsabhängigen Expressionsanalysen des *AtER-ANT1* über Promotor-GUS-Fusionskonstrukte konnten Einblicke in die physiologische Einbindung des *AtER-ANT1* in den pflanzlichen Stoffwechsel durch ausführliche Studien an homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen gewonnen werden. Desweiteren wurde in dieser Arbeit das zu *AtER-ANT1* homologe Transportprotein ER-ANT1 aus der monokotyledonen Pflanze *Oryza sativa* biochemisch charakterisiert und Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten dieses Proteins zu *AtER-ANT1* näher analysiert.

Der zweite Teil der Diskussion beschäftigt sich mit der Redundanz verschiedener mitochondrialer AAC-Isoformen in *Arabidopsis thaliana*. Dazu wurde in der Arbeit mit *Arabidopsis thaliana* Knockout-Pflanzen bezüglich der verschiedenen AAC-Isoformen gearbeitet, wobei das Ziel die Isolierung homozygoter Knockout-Pflanzen der verschiedenen Isoformen war (Kapitel 4.2).

Der letzte Abschnitt der vorliegenden Arbeit stellte die biochemische Charakterisierung eines mitochondrialen ATP/ADP-Transporters aus dem Protisten *Entamoeba histolytica* im *E. coli*-Expressionssystem dar (Kapitel 4.3). Dabei sollte die Analyse der biochemischen Eigenschaften des *EhANT1* Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zu bereits charakterisierten mitochondrialen und hydrogenosomalen ATP/ADP-Transportproteinen herausstellen.

4.1 *AtER-ANT1* und *OsER-ANT1*: ATP/ADP-Transporter in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums

Ein Transport von ATP über die Membran des Endoplasmatischen Retikulums von eukaryotischen Zellen konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden. Dabei wurde ein ATP-Transport sowohl über die ER-Membran aus Rattenleber als auch über isolierte ER-Mikrosomen aus Hefe biochemisch gemessen. Das dazu korrespondierende Protein (bzw. Gen), welches den ATP-Transport katalysiert, konnte auf molekularem Level allerdings bis heute nicht identifiziert werden (ABEIJON *et al.*, 1997; KOCHENDÖRFER *et al.*, 1999; MAYINGER *et al.*, 1995). Dennoch ist das Vorhandensein eines Adeninnukleotid-Transporters in

der Membran des Endoplasmatischen Retikulums absolut essentiell, um das ER-Lumen mit ausreichenden Mengen an ATP für die komplexen Stoffwechselreaktionen zu versorgen.

Das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums und der Golgi-Apparat stellen die zellulären Kompartimente dar, in denen Reaktionen wie die Glykosylierung, Sulfatierung und Phosphorylierung von sekretorischen und membrangebundenen Proteinen, Proteoglykanen, Lipiden und Fettsäuren stattfinden (HIRSCHBERG *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 2000). Diese komplexen Prozesse benötigen eine ausreichende Menge an ATP im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums. Weiter werden im ER-Lumen große Mengen an ATP für den posttranslationalen Proteinimport benötigt. Dabei stellt der Proteintransfer in die Translokationspore mit anschließendem Import des Proteins in das ER-Lumen den energieverbrauchenden Schritt dar. Das zur Hsp70 Familie gehörende Chaperon BiP spielt beim Import von Proteinen durch den Translokationskanal eine entscheidende Rolle und benötigt aufgrund seiner ATPase-Eigenschaften große Mengen an ATP (PANZER *et al.*, 1995; BODSKY & SCHECKMAN, 1993; MATLACK *et al.*, 1998). Zudem existieren weitere ATP-abhängige Chaperone, die innerhalb des ER-Lumens für eine korrekte Faltung der Proteine sorgen. Außerdem sind diese für die Verteilung der ER- oder Sekretionsproteine bis zum Erreichen ihrer subzellulären Bestimmungsorte innerhalb der Zelle verantwortlich (LYMAN & SCHECKMAN, 1997; SCHATZ & DOBBERSTEIN, 1996). Der Protein-Transport zwischen ER und Golgi-Apparat ist in gleichem Maße ATP-abhängig, wobei luminales ATP für fundamentale Transportprozesse benötigt wird. Als Beispiel kann die Regeneration von GTP angeführt werden, welches die antreibende Kraft der GTPasen repräsentiert (BRANDIZZI *et al.*, 2002).

4.1.1 Biochemische Charakterisierung der Transportproteine *AfER-ANT1* und *OsER-ANT1*

Die Transportproteine *AfER-ANT1* und *OsER-ANT1* sind phylogenetisch Vertreter der MCF (mitochondrial carrier family), und werden in eine gemeinsame Gruppe mit den pflanzlichen, mitochondrialen AACs eingegliedert (PICAULT *et al.*, 2004; <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>; Abb.3.1).

In der vorliegenden Dissertation ist es gelungen, die biochemische Funktion des *AfER-ANT1* sowie des homologen Transportproteins aus *Oryza sativa* (*OsER-ANT1*) mittels heterologer Expression im *E. coli*-System zu klären. Das heterologe *E. coli*-Expressionssystem hat sich bereits für die biochemische Analyse von bakteriellen, plastidären und mitochondrialen ATP/ADP-Transporter bewährt (TJADEN *et al.*, 1998; TJADEN *et al.*, 1999; HAFERKAMP *et al.*, 2002). Detaillierte Analysen an klassischen mitochondrialen AACs aus Hefe und Rind zeigten eine Reihe von wichtigen Aminosäuresequenzmotiven, die für eine Aktivität der Proteine als ATP/ADP-Transporter essentiell sind (NELSON *et al.*, 1993; PEBAY-PEYROULA *et al.*, 2003). Interessanterweise sprechen Aminosäuresequenzanalysen von *AfER-ANT1* und *OsER-ANT1* durch die starke Konservierung dieser Aminosäurereste bzw. -motive sehr für eine Funktion dieser Proteine als ATP/ADP-Transporter (Abb. 3.2; Abb. 3.31). Die heterologe Expression von *AfER-ANT1* und *OsER-ANT1* in *E. coli* zeigte, dass diese Proteine eine hohe Substratspezifität für ATP und ADP aufweisen (Tabelle 3.2; Tabelle 3.7) und somit in die Gruppe der eukaryotischen Adeninnukleotid-Transporter eingegliedert werden können. Die Bestimmung der Transportaffinitäten für ATP und ADP ergab bei *AfER-ANT1* für beide Substrate annähernd identische K_M -Werte um ungefähr 300 μM (Abb. 3.6). Bei *OsER-ANT1* konnte durch eine heterologe Expression des Proteins in *E. coli* gezeigt

werden, dass es sich bei diesem Transportprotein um einen hoch affinen ATP/ADP-Transporter handelt. Dabei konnte für ATP ein K_M -Wert von ungefähr 9 μM und für ADP ein K_M -Wert um etwa 13 μM ermittelt werden (Abb. 3.34). Das Transportprotein aus *Oryza sativa* ist demzufolge für ATP und ADP etwa 30-fach affiner als der ATP/ADP-Transporter aus *Arabidopsis thaliana*. Die K_M -Werte des OsER-ANT1 liegen in einem Bereich, der ebenso für die klassischen mitochondrialen AACs ermittelt werden konnte (HAFERKAMP *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte beim Nukleotid-Transport über die ER-Membran von Hefemikrosomen ebenso ein K_M -Wert für ATP von etwa 10 μM beobachtet werden (MAYINGER *et al.*, 1995). Nun stellt sich die Frage, weshalb sich die ermittelten K_M -Werte von OsER-ANT1 und AtER-ANT1 derart unterscheiden. Studien belegen, dass in eukaryotischen Zellen die ATP-Konzentration im Zytosol zwischen 1,0 und 4,6 mM beträgt (LARSSON *et al.*, 1997; THEOBALD *et al.*, 1997; TRAUT, 1994). Der größte Teil des ATP liegt dabei in einem Komplex mit Mg^{2+} vor, wohingegen nur etwa 5-10% der ATP-Menge als freies ATP vorkommt. Eine ATP-Transportaffinität von etwa 300 μM würde somit gewährleisten, dass genügend ATP in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums transportiert werden kann. Obwohl ein ATP-Transporter in der Membran des ER mit einem K_M von 300 μM denkbar ist, könnte die für AtER-ANT1 ermittelte niedrige Affinität anderweitig begründet werden.

Wie bereits in Kapitel 3.1.2.2 näher erläutert musste zur biochemischen Charakterisierung des AtER-ANT1 das heterologe *E. coli*-Expressionssystem stark optimiert werden. Die Anzucht der *E. coli*-Zellen musste in sehr nährstoffreichem Medium stattfinden. Außerdem konnte ein aktiver Transport durch AtER-ANT1 erst nach zwei Stunden Induktion der *E. coli*-Zellen gemessen werden. Diese Beobachtungen indizieren, dass höchst wahrscheinlich ein großer Anteil des in die Membran integrierten AtER-ANT1 Proteins nicht optimal und damit einhergehend nicht funktionell eingebaut wurde (Abbildung 3.4). Die biochemischen Eigenschaften des AtER-ANT1 im *E. coli*-System könnten daher quantitativ beeinflusst sein, was in veränderten Affinitäten zu den Substraten ATP und ADP resultieren könnte. Das homologe OsER-ANT1 Protein wurde dagegen nach heterologer Expression unter Standardbedingungen problemlos und funktionell in die *E. coli*-Membran eingebaut (Abbildung 3.32). Dies wurde bereits zuvor mehrfach an anderen eukaryotischen Transportproteinen beschrieben, die im *E. coli*-System ähnliche biochemische Charakteristika aufwiesen wie in den jeweiligen Organismen *in vivo* (TJADEN *et al.*, 1998; HAFERKAMP *et al.*, 2002; TJADEN *et al.*, 2004). Eine umfassende Veränderung des *E. coli*-Systems könnte daher zur Folge haben, dass insbesondere Transportkinetiken in Mitleidenschaft gezogen werden, so dass die ermittelten Substrataffinitäten nicht den *in vivo* Affinitäten des Transportproteins entsprechen.

Weiter konnte in dieser Arbeit über Rücktauschexperimente gezeigt werden (Abb. 3.7; Abb. 3.35), dass ATP und ADP durch AtER-ANT1 und OsER-ANT1 im Gegentausch transportiert werden. Gleiches konnte auch bei den mitochondrialen AACs, die einen Transport von ATP und ADP in einer 1:1 Stöchiometrie zeigen, beobachtet werden (HAFERKAMP *et al.*, 2002). Bei dem ATP-Transport über die Membran von ER-Mikrosomen aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte ebenso festgestellt werden, dass der Transport von ATP im Gegentausch mit ADP stattfindet (MAYINGER *et al.*, 1995). Der Transport von ATP und ADP in Form eines Gegentausches ist dabei physiologisch essentiell, um einen ausgeglichenen Nukleotid-Level zwischen den Kompartimenten der Zelle zu gewährleisten.

Besonders interessant sind die Inhibitorstudien bezüglich AtER-ANT1 und OsER-ANT1, die in dieser Arbeit im Vergleich zu den mitochondrialen AACs durchgeführt wurden (Tabelle 3.3; Tabelle 3.9). Die Studien zeigten, dass BKA und CAT - die klassischen Hemmstoffe der mitochondrialen AACs (PEBAY-PEYROULA *et al.*, 2003) - keinerlei Effekt auf die Transportaktivität des AtER-ANT1 und OsER-ANT1

haben. Bei den klassischen AACs konnte hingegen eine signifikante Reduktion der Transportaktivität sowohl durch BKA (30,4%) als auch durch CAT (47,5%) beobachtet werden (Tabelle 3.3; Tabelle 3.8). Die Bindung von CAT an den mitochondrialen AAC aus Rind wurde bereits detailliert untersucht, wobei die positiv geladene Aminosäure Arginin (R) 279 eine entscheidende Funktion bei der Bindung des Hemmstoffes erfüllt (PEBAY-PEYROULA *et al.*, 2003). Interessanterweise ist genau diese Aminosäure sowohl in dem *AfER-ANT1*-Protein als auch bei *OsER-ANT1* nicht konserviert. Bei *AfER-ANT1* wird das Arginin durch ein ungeladenes Leucin (L282) ersetzt (Abb. 3.2) und bei *OsER-ANT1* kommt es zu einer Substitution dieser Aminosäure durch die negativ geladene Aminosäure Serin (S295) (Abb. 3.31). Andererseits konnte N-ethylmaleimid (NEM), als ein spezifischer Hemmstoff der Transportproteine *AfER-ANT1* und *OsER-ANT1* identifiziert werden (Tabelle 3.3 und Tabelle 3.8). Durch die Zugabe von NEM wurde die ATP-Transportaktivität von *AfER-ANT1* auf etwa 46% bei *OsER-ANT1* auf ungefähr 59% inhibiert. Dagegen hatte NEM keinerlei Einfluss auf die mitochondrialen AACs (Tabelle 3.3; Tabelle 3.8). Einen inhibitorischen Effekt auf die Translokation von Proteinen über die Membran des Endoplasmatischen Retikulums aus Ratte durch NEM - der wie beschrieben stark ATP-abhängig ist - konnte zuvor gezeigt werden (NICCHITTA *et al.*, 1989). Weiter konnte NEM bereits als spezifischer Inhibitor des Nukleotidtransportes an ER-Mikrosomen aus Rattenleber identifiziert werden (CLAIRMONT *et al.*, 1992). Interessanterweise haben andere Studien an ER-Mikrosomen aus Rattenleber gezeigt, dass der Nukleotidtransport über die ER-Membran nicht von den klassischen mitochondrialen Hemmstoffen BKA und CAT beeinflusst wird (GUILLEN & HIRSCHBERG, 1995). Trotz der unterschiedlichen Substrataffinitäten von *OsER-ANT1* und *AfER-ANT1* sprechen die ermittelten biochemischen Charakteristika des *OsER-ANT1* stark dafür, dass es sich bei diesem Transportprotein um ein Homolog des *AfER-ANT1* handelt und sich somit von den klassischen mitochondrialen AACs unterscheidet. Die biochemischen Studien an *AfER-ANT1* und *OsER-ANT1* sprechen zudem eindeutig gegen eine mitochondriale Lokalisierung, da die Gesamtnukleotidaufnahme über pflanzliche Mitochondrien hochgradig sensitiv für BKA und CAT ist (HAFERKAMP *et al.*, 2002).

4.1.2 Subzelluläre Lokalisierung von *AfER-ANT1* und *OsER-ANT1*

Proteomanalysen von *Arabidopsis*-Mitochondrien zeigen eine eindeutige Integration der drei AAC-Isoformen in der inneren Mitochondrienmembran, wohingegen *AfER-ANT1* bei diesen Analysen nicht in den Mitochondrien detektiert werden konnte (HEAZLEWOOD *et al.*, 2004). Weiter sagen bioinformatische Programme wie Target-P und Signal-P eine mögliche subzelluläre Lokalisierung des *AfER-ANT1* im sekretorischen Weg voraus (NIELSON *et al.*, 1997; EMANUELSSON *et al.*, 2000). Studien an mitochondrialen Proteinen aus Pflanzen konnten außerdem zeigen, dass für diese Proteine eine N-terminale Signalsequenz absolut essentiell ist, um diese korrekt in die Mitochondrien zu transportieren (MURCHA *et al.*, 2005). Aminosäuresequenzanalysen von *AfER-ANT1* belegen eindeutig, dass diesem Transportprotein im Gegensatz zu den klassischen mitochondrialen AACs eine N-terminale Targetsequenz fehlt (Abb. 3.2).

Bei *OsER-ANT1* indizieren neben den biochemischen Charakteristika auch die phylogenetischen Analysen dieses Proteins eine Homologie zu *AfER-ANT1*, was mit einer subzellulären Lokalisierung von *OsER-ANT1* in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums einhergeht. Aminosäuresequenz-

Analysen zeigten, dass OsER-ANT1 mit 64% identischen und rund 80% ähnlichen Aminosäuren zu AtER-ANT1 eine weitaus höhere Homologie aufweist als zu den bereits charakterisierten drei klassischen mitochondrialen AACs aus *Arabidopsis*. Hier konnte jeweils ein geringerer Anteil an identischen (rund 48%) und circa 60% ähnlichen Aminosäuren ermittelt werden (Tabelle 3.7). Nicht nur der Anteil identischer Aminosäuren macht OsER-ANT1 zu einem Homolog von AtER-ANT1. Die genauere Betrachtung der Aminosäuresequenz von OsER-ANT1 zeigte zudem, dass diesem Protein ebenfalls eine N-terminale Signalsequenz fehlt. Weiter sagt das Bioinformatikprogramm Signal-P eine subzelluläre Lokalisierung des OsER-ANT1 nicht in den Mitochondrien sondern ebenso wie AtER-ANT1 im sekretorischen Weg voraus (EMANUELSSON *et al.*, 2000).

Schon zuvor konnten mehrere Mitglieder der MCF (mitochondrial carrier family) identifiziert werden, die subzellulär nicht in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert sind, u.a. ein peroxisomales Transportprotein und der plastidär lokalisierte StBT-1 (PALMIERI *et al.*, 2001; LEROCH *et al.*, 2005).

Lösliche Proteine des Endoplasmatischen Retikulums besitzen als Retentionssignal für das Verbleiben im ER ein Tetrapeptid (KDEL bzw. HDEL) am carboxyterminalen Ende des Proteins (FRIGERIO *et al.*, 2001). Bei Membranproteinen des Endoplasmatischen Retikulums konnte ein solches Rückhaltemotiv hingegen nicht beobachtet werden (CHEN *et al.*, 2002; MCCARTNEY *et al.*, 2004). Andere Studien ergaben, dass bei ER-Membranproteinen, welche die Membran mehrfach durchspannen, häufig die ersten zwei Transmembrandomänen als Signalsequenz für das Targeting in die ER-Membran dienen. Dabei kommt es nicht zur Abspaltung dieser Signalsequenz nach dem Proteinimport. Es konnte außerdem ein sehr hydrophober Bereich innerhalb der ersten Transmembrandomäne identifiziert werden, der eine Funktion als Signalanker für das Targeting in die ER-Membran besitzt. Dabei wird der hydrophobe Bereich häufig von einer N-terminalen Aminosäuresequenz flankiert, die einen hohen Gehalt an geladenen Aminosäuren aufweist (HIGH & DOBBERSTEIN, 1992; MEACOCK *et al.*, 2002). Tatsächlich weist die erste Transmembrandomäne von AtER-ANT1 eine weitaus höhere Hydrophobizität auf als die erste Transmembrandomäne der mitochondrial lokalisierten AtAAC1-3 (Abb. 3.2). Weiter kann bei genauer Betrachtung der Aminosäuresequenz von AtER-ANT1 innerhalb der ersten Transmembrandomäne ein N-terminaler Bereich beobachtet werden, der einen hohen Gehalt an geladenen Aminosäuren aufweist (K6, E8, R9 und D13; Abb. 3.2). Bei OsER-ANT1 kann dies gleichfalls beobachtet werden, wobei die erste Transmembrandomäne sogar sieben positiv geladene Aminosäurereste (AtER-ANT1: vier) enthält (Abbildung 3.31). Daneben sprechen zwei putative c-terminale ER-Targeting-Signale bei AtER-ANT1, die aromatische Aminosäurereste enthalten (YxxL bzw. YxxW), für eine subzelluläre Lokalisierung des Proteins in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (MCCARTNEY *et al.*, 2004).

Zur Analyse der subzellulären Lokalisierung von AtER-ANT1 wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation verschiedene Methoden angewandt. AtER-ANT1-GFP-Fusionskonstrukte, die in isolierten Tabakprotoplasten transient exprimiert wurden, indizierten eine mögliche Lokalisierung des Proteins im Endoplasmatischen Retikulum (Abb. 3.8 und 3.9). Die erhaltenen Ergebnisse zeigen die Expression des AtER-ANT1 innerhalb der Zelle in einem sehr großen, flächig verteilten und netzwerkartigen Kompartiment. Innerhalb der pflanzlichen Zelle kommt in dieser Form nur das Endoplasmatische Retikulum vor. Ein Vergleich der Fluoreszenz von AtER-ANT1 mit einem ER-spezifischen Protein als ER-Kontrolle (pBin) zeigt ein sehr ähnliches GFP-Muster beider Proteine (Abb. 3.9). Sowohl bei AtER-ANT1 als auch bei der ER-Kontrolle (pBin) kann besonders um den Bereich des Zellkerns eine erhöhte Fluoreszenz beobachtet werden. Die in dieser Arbeit gezeigten GFP-Muster für AtER-ANT1 und pBin

decken sich dabei mit früheren GFP-Studien bezüglich des pflanzlichen Endomembransystems (BRANDIZZI *et al.*, 2003). Die Verwendung von Kontroll-GFP-Proteinen, die u.a. eine mitochondriale, plastidäre oder zytosolische Lokalisierung zeigen, lässt zudem eine subzelluläre Lokalisierung des AtER-ANT1 in den eben benannten Zellstrukturen eindeutig ausschließen (Abb. 3.8).

Durch die Fusion des AtER-ANT1 mit dem GFP-Protein entsteht ein Gesamtexpressionsprotein mit einer molekularen Masse von etwa 60 kDa, was dazu führen könnte, dass AtER-ANT1 zwar in das ER importiert wird, aber aufgrund seiner großen molekularen Masse nicht an den wahren Bestimmungsort gelangen kann. So werden beispielsweise Sekretionsproteine oder vakuoläre Proteine durch das ER und über den Golgi-Apparat zum jeweiligen Bestimmungsort geleitet (VITALE & DENECKE *et al.*, 1999). Um diese Möglichkeit bei AtER-ANT1 ausschließen zu können, wurden im Verlauf dieser Arbeit *in vitro* Translations-Experimente mit anschließenden Targeting-Studien an ER-Mikrosomen durchgeführt (Abb. 3.10). Diese Experimente wurden mit freundlicher Unterstützung in der Abteilung Medizinische Biochemie in Homburg durchgeführt. Die Studien zeigten, dass AtER-ANT1 in die Membran der ER-Vesikel integriert wird. Dagegen konnte bei AtAAC1, welches als Negativkontrolle diente, zwar eine Assoziation an die Membran aber keine signifikante Integration beobachtet werden. Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse sprechen für eine subzelluläre Lokalisierung des AtER-ANT1 in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Da bei den *in vitro* Translations-Studien von AtER-ANT1 allerdings stets ein zusätzliches Translationsprodukt entstand, kann anhand dieser Ergebnisse nicht mit absoluter Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem in der Membran integrierten Protein wirklich um AtER-ANT1 handelt. Aufgrund dessen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine neue Methode zur Analyse der subzellulären Lokalisierung des AtER-ANT1 etabliert, bei der die Lokalisierung des AtER-ANT1 *in planta* untersucht werden kann (Kapitel 3.1.3.3). Hierzu wurden transgene *Arabidopsis thaliana* Pflanzen hergestellt, die das AtER-ANT1-Protein überexprimieren. Eine Detektion des Proteins wurde durch die Fusion des AtER-ANT1 mit einem c-terminalen Myc-Tag gewährleistet. Der Myc-Tag stellt dabei ein sehr kleines Protein von 10 Aminosäuren dar. Eine Beeinflussung der subzellulären Lokalisierung von AtER-ANT1 durch den Myc-Tag kann somit nahezu ausgeschlossen werden (DEWITT *et al.*, 1996). Nach Herstellung der transgenen AtER-ANT1-c-Myc-Tag Pflanzen ist es in dieser Arbeit gelungen die subzelluläre Lokalisierung von AtER-ANT1 im Endoplasmatischen Retikulum *in planta* zu bestätigen. Zur Lokalisierungsüberprüfung wurde eine neue Methode zur Trennung pflanzlicher ER-Membranen von anderen zellulären Organellen entwickelt. Die Trennung der ER-Membranen erfolgte dabei unter Verwendung eines Saccharosedichtegradienten in An- bzw. Abwesenheit von Mg^{2+} mit anschließender Zentrifugation. In Abwesenheit von Mg^{2+} können die Ribosomen nicht mehr an die ER-Membranen binden. Dabei kommt es zu dem Effekt, dass die ER-Membranen in Abwesenheit von Mg^{2+} in Fraktionen mit einer geringeren Saccharosekonzentration detektierbar sind als in Anwesenheit von Mg^{2+} . Unter Einsatz dieser Methode ist es gelungen, eine eindeutige Verschiebung des AtER-ANT1 Proteins in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Anwesenheit nachzuweisen (Abb. 3.12). Weiter konnte auch durch die Verwendung eines ER-spezifischen Antikörpers, der das ER-spezifische Chaperon Calretikulin erkennt, eine eindeutige Kolokalisierung von AtER-ANT1 und Calretikulin in An- und Abwesenheit von Mg^{2+} gezeigt werden (PAGNY *et al.*, 2000). Alle anderen hier untersuchten Membranen, wie z.B. die Plasmamembran, die Vakuolenmembran, die Mitochondrienmembran und Plastidenmembran zeigten keine Kolokalisierung mit dem zu untersuchenden AtER-ANT1. Zudem wiesen diese Membranen keine derartig signifikante Verschiebung innerhalb des Gradienten im Vergleich zu AtER-ANT1 und Calretikulin

auf. Dieses Verhalten von Membranen in Saccharosegradienten konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (PAGNY *et al.*, 2000; LIANG *et al.*, 1997). Die Analysen haben weiter ergeben, dass besonders eine subzelluläre Lokalisierung des AtER-ANT1 in der Membran der Mitochondrien definitiv ausgeschlossen werden kann. Im Saccharosegradienten bewegen sich die mitochondrialen Membranen zwar auch in Abhängigkeit von der Ab- bzw. Anwesenheit von Mg^{2+} , allerdings kann hier beobachtet werden, dass sie sich im Gradienten sogar komplett entgegengesetzt verhalten im Vergleich zu den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums. Dieses entgegengesetzte Verschiebungsverhalten der Mitochondrien in Abhängigkeit von Mg^{2+} konnte dabei auch in Studien von HOEPFNER *et al.*, 2005 beobachtet werden.

Die hier erhaltenen Ergebnisse bezüglich der subzellulären Lokalisierung von AtER-ANT1, die über GFP-Fusion und AtER-ANT1-c-Myc-Tag Pflanzen gewonnen wurden, indizieren eindeutig eine subzelluläre Lokalisierung von AtER-ANT1 in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums.

Neben diesen Methoden zur Lokalisierungsüberprüfung bieten die in dieser Arbeit hergestellten AtER-ANT1-c-Myc-Tag Pflanzen noch eine weitere Möglichkeit, die Lokalisierung des AtER-ANT1 noch detaillierter zu untersuchen. Dazu könnten Gewebeschnitte an AtER-ANT1-c-Myc-Tag Pflanzen durchgeführt werden. Die Lokalisierung des Proteins könnte dann über Immuno-Gold-Labeling unter Einsatz eines Elektronenmikroskops direkt innerhalb der Zelle untersucht werden.

Trotz aller Indizien, die für eine Lokalisierung des OsER-ANT1 im ER sprechen, stellt die experimentelle Analyse der subzellulären Lokalisierung des OsER-ANT1 eine weitere Herausforderung dar. Zur Untersuchung der Lokalisierung des OsER-ANT1 könnten GFP-Fusionskonstrukte mit anschließender Expression des Konstruktes in Protoplasten Aufschluss geben. Dabei sollte allerdings beachtet werden, dass in diesem Fall Protoplasten aus einer monokotyledonen Pflanze - wie zum Beispiel Gerste - bei der transienten Expression verwendet werden, um eine natürliche Umgebung für die Expression des OsER-ANT1-Proteins zu gewährleisten.

4.1.3 Einblicke in die physiologische Funktion des AtER-ANT1

Zur Untersuchung der physiologischen Einbindung des AtER-ANT1 wurden in dieser Arbeit zwei unabhängige *Arabidopsis* Knockout-Linien bezüglich des AtER-ANT1 Gens detailliert untersucht (Kapitel 3.1.5). Dabei indiziert der Verlust eines funktionellen AtER-ANT1 im Endoplasmatischen Retikulum von *Arabidopsis thaliana* eine Pflanze mit einem stark reduzierten ER-Metabolismus, der im Fehlen von ATP im ER-Lumen begründet liegt. Weiter zeigte eine Analyse des Expressionsmusters von AtER-ANT1 durch die Untersuchung von AtER-ANT1-Promotor-GUS-Fusionskonstrukten sowie Microarray-Analysen, dass AtER-ANT1 gewebespezifisch auf bestimmte Zelltypen lokal begrenzt exprimiert wird (Abb. 3.13 und Abb. 3.14).

Eine starke Expression von AtER-ANT1 konnte besonders in Pflanzengewebe beobachtet werden, die einen sehr aktiven ER-Metabolismus besitzen (Abb. 3.14). Bemerkenswerterweise zeigen gewebespezifische Expressionsstudien des im ER-Lumen lokalisierten Chaperon BiP - welches unter starkem ATP-Verbrauch fungiert - ein zu AtER-ANT1 fast identisches Expressionsmuster

(BUZELI *et al.*, 2002). Beide Proteine werden beispielsweise sehr stark im Bereich der Wurzel, besonders in der Wurzelspitze, exprimiert (Abb. 3.14 A+B). Dabei kann die Wurzelspitze in drei verschiedene Zonen unterteilt werden. An der äußersten Wurzelspitze befindet sich die meristematische Zone, in der eine hochaktive Zellteilung stattfindet. Auf die meristematische Zone folgen die Zellelongations- sowie die Differenzierungszone. Sowohl für die Zellteilung als auch für die Zellverlängerung werden eine Reihe von Membrankomponenten und Membranproteinen benötigt, die größtenteils über das Endoplasmatische Retikulum geliefert werden. Weiter zeichnet sich die Wurzelspitze durch eine hochgradig aktive Sekretion von Zellwandmolekülen und Wurzelschleim aus, die zum Beispiel Pektin-haltige Polysaccharide sowie Arabinogalaktan-Proteine enthalten. Viele dieser Bestandteile werden ebenfalls über das Endoplasmatische Retikulum synthetisiert. Dabei erleichtert der Wurzelschleim die Penetration der Wurzel durch die Erde (VICRE *et al.*, 2005; McCULLY *et al.*, 1999). In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des *AtER-ANT1* eine signifikant verschlechterte Wurzelentwicklung in *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen verursacht, die mit Defekten innerhalb des sekretorischen Wegs einhergeht (Abb. 3. 19).

Sowohl *AtER-ANT1* als auch BiP zeigt eine verstärkte Expression in den Leitgefäßen der Blätter. Ein aktives ER wird dort für die Synthese einer Reihe von plasmamembranständigen Proteinen benötigt, die u.a. für die Phloembeladung und -entladung verantwortlich sind. So zeigen beispielsweise Expressionsstudien bezüglich eines Saccharosetransporters in der Plasmamembran (*AtSUC2*) ebenfalls eine verstärkte Expression und physiologische Funktion dieses Proteins in den Leitgefäßen von Blättern wo die Phloembeladung von zentraler Bedeutung ist (TRUERNIT & SAUER, 1995).

Die *AtER-ANT1*-Promotor-GUS-Analysen sowie die Microarray-Analysen zeigten außerdem, dass dieses Protein sehr stark in den Pollen exprimiert wird (Abb. 3.13; Abb. 3.14; PINA *et al.*, 2005). Die Pollen stellen zudem ein Gewebe dar, in dem das Endoplasmatische Retikulum sehr stoffwechselaktiv vorliegt (HUANG *et al.*, 1996). Dabei konnte an *Arabidopsis thaliana* Mutanten gezeigt werden, dass eine Deletion des in der ER-Membran lokalisierten ATPase-Gens (*MIA*) zu dramatischen Defekten im sekretorischen Weg führt. Dies hat wiederum eine signifikante Reduktion der Pollenentwicklung zur Folge (JAKOBSEN *et al.*, 2005). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung des *MIA*-Gens zu drastischen Effekten bezüglich der Expression einer funktionellen Gruppe von Genen führt, die in enger Verbindung mit der Proteinsekretion, Proteinfaltung und Stofftransport stehen. Interessanterweise kann innerhalb der *MIA*-Knockout-Pflanzen eine zwanzigfach reduzierte Expression von *AtER-ANT1* beobachtet werden (JAKOBSEN *et al.*, 2005). Die Expressionslevel der mitochondrialen *AtAAC1-3* waren dagegen in den *MIA*-Knockout-Mutanten unverändert. Diese Beobachtungen zusammen mit den Expressionsstudien indizieren, dass *AtER-ANT1* in den Pollen eine hohe physiologische Bedeutung hat.

Das pflanzliche Endoplasmatische Retikulum spielt zusätzlich eine sehr wichtige Rolle im Lipidmetabolismus (WHITE *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2003). In keimenden *Arabidopsis* Samen werden große Mengen an Triacylglycerin, Phospholipiden und Oleosinen, die im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden, in Form von Ölkörperchen eingelagert. Dabei bestehen *Arabidopsis*-Samen bis zu 40% aus Lipiden und kleinen Ölkörperchen, wobei 10% der Samenproteine in Form von Oleosinen vorkommen (HSIEH & HUANG, 2004). In Samen der Ölsaat Raps (*Brassica napus*) konnte gezeigt werden, dass der Energiegehalt in Form von ATP einen umfassenden Einfluss auf die Triacylglycerinsynthese ausübt (VIGEOLAS *et al.*, 2003). Interessanterweise zeigen *AtER-ANT1*-Promotor-GUS-Analysen eine

sehr starke Expression des *AtER-ANT1* Gens in den Samen von sich entwickelnden Schoten (Abb. 3.14). Weiter haben umfassende Analysen von homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Samen eine dramatische Reduktion des Lipidgehaltes und Proteingehaltes innerhalb der Samen gezeigt (Abb. 3.22). Die Reduzierung des Proteingehaltes in *AtER-ANT1* Knockout-Samen auf rund 50% spricht dabei sehr für einen eingeschränkten ER-Metabolismus, da die Speicherproteine in Samen - u.a. die 12S Globuline und 2S Albumine - cotranslational in das ER-Lumen importiert werden. Dabei kommt es im ER-Lumen zur Bildung von spezifischen Disulfidbrücken und zur Zusammensetzung der Globuline und Albumine in Dimere bzw. Trimere, bevor eine Translokation der Speicherproteine in die Proteinspeichervakuolen stattfindet (GRUIS *et al.*, 2004).

Analysen bezüglich des Chlorophyllgehaltes in homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen haben außerdem gezeigt, dass diese im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen einen dramatisch reduzierten Chlorophyllgehalt aufweisen (Abb. 3.21). Dieser Effekt könnte ebenso aufgrund eines reduzierten ER-Lipidmetabolismus in *Arabidopsis thaliana* begründet werden, da 50% der Thylakoidmembranlipide über das Endoplasmatische Retikulum geliefert werden (BROWSE *et al.*, 1986).

Studien belegen, dass fast ein Drittel aller zellulären Proteine über das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums transportiert und verändert werden, wobei diese Reaktionen einen enorm hohen Bedarf an Energie mit sich bringen (SHEN *et al.*, 2002). Dies könnte den dramatischen morphologischen und physiologischen Phänotyp der homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen während der gesamten Pflanzenentwicklung erklären. Homozygote *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen weisen dabei unter ambienten Wachstumsbedingungen auf Erde einen dramatisch im Wachstum retardierten Phänotyp im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen auf (Kapitel 3.1.5.2; Abbildung 3.18; 3.20). Für eine detaillierte Analyse der *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Gehalt einer Reihe von Metaboliten des pflanzlichen Stoffwechsels, u.a. Nukleotide (Abb. 3.24), Zucker (Abb. 3.23), Metabolite des primären Stoffwechsels (Tabelle 3.4), sowie Aminosäuren (Tabelle 3.5) bestimmt (Kapitel 3.1.5.4).

Die Bestimmung der Metabolite zeigte, dass der dramatische Phänotyp der *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen durch pleiotrope Effekte, die durch einen stark veränderten Gesamtmetabolismus dieser Pflanzen zustande kommen, erklärt werden kann. Die Veränderung des gesamten Pflanzenstoffwechsels führt zu einer verminderten Photosyntheseleistung, die sich wiederum in einer signifikanten Reduktion von Kohlenstoffintermediaten widerspiegelt (Tabelle 3.4).

Für diese These spricht nicht nur die Reduktion des Chlorophyllgehaltes innerhalb der *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen. Weiter zeigen die Bestimmungen der Zuckerkonzentrationen in den Mutanten, dass sowohl der Gehalt an Glukose als auch die Menge an Fruktose in den Knockout-Pflanzen dramatisch reduziert ist (Abbildung 3.23). Die Reduktion der Glukose- und Fruktosekonzentrationen spiegeln sich ebenso in einer signifikant verringerten Saccharosekonzentration wider. Zusätzlich weisen *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen einen stark verminderten Stärkegehalt auf (Abbildung 3.23). Dabei ist zu unterstreichen, dass die Stärke in höheren Pflanzen der wichtigste Energiespeicher darstellt. Eine Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen zeigte, dass auch hier die Deletion des *AtER-ANT1* starke pleiotrope Auswirkungen auf den gesamten Aminosäurestoffwechsel der Pflanzen hat (Tabelle 3.5). In Abbildung 4.1 wurde ein Schema erstellt, das insbesondere auf den

Aminosäurestoffwechsel eingeht, um die Auswirkungen einer Deletion des *AfER-ANT1*-Gens auf den pflanzlichen Metabolismus besser diskutieren zu können.

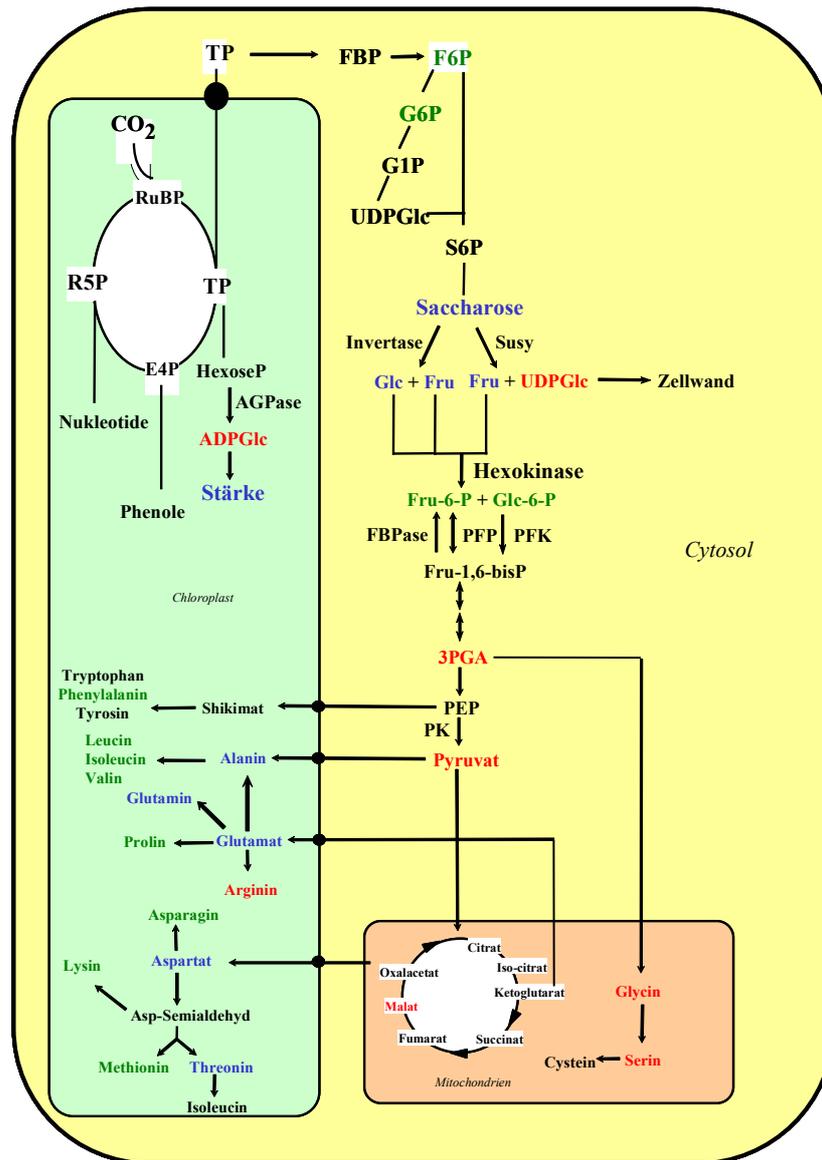


Abbildung 4.1: Schema der Aminosäuresynthese und wichtiger zellulärer Stoffwechselwege. Dabei wurden die Metabolite in homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen unter ambienten CO₂-Bedingungen ermittelt. Metabolite in grün weisen keine Veränderung der Konzentration im Vergleich zum Wildtyp auf. Rot dargestellte Metabolite sind in *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen signifikant erhöht. Blau dargestellte Metabolite sind in *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt. Metabolite in schwarz wurden bei den Experimenten nicht bestimmt.

Das Schema verdeutlicht den dramatischen Effekt, den das Ausschalten des *AfER-ANT1* Gens auf den gesamten Stoffwechsel hat, wobei besonders die Aminosäurebiosynthese in *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen beeinflusst wird. Dabei stellt die Aminosäuresynthese, welche hauptsächlich in den Plastiden stattfindet, das Endprodukt der Nitratassimilation dar (LEA & IRELAND, 1999). Die Nitratassimilation wird besonders innerhalb der Wurzel zur Ammonium-Fixierung genutzt (LEJAY *et al.*, 1999). Zudem zeigte sich bei Expressionsstudien eine starke Expression des *AfER-ANT1* im Bereich der Wurzel (Abb. 3.14 A+B). Die Nitratassimilation unterliegt dabei einer sehr strengen Kontrolle, denn sie kann nur dann ablaufen, wenn durch den oxidativen Pentosephosphatweg genügend Kohlenstoffgerüste für die

Aminosäuresynthese bereitgestellt werden. Weiter ist die Synthese von Aminosäuren sehr von der Verfügbarkeit an Energie in Form von ATP sowie von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH und NADH abhängig (LEA & IRELAND, 1999). Bei den homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen konnte eine Reduktion des ATP-Gehaltes um circa 30% im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen beobachtet werden (Abb. 3.24). Diese Reduktion des ATP-Levels innerhalb der Pflanzen könnte sich somit auf die stark ATP-abhängige Aminosäurebiosynthese auswirken. So kann bei den *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen eine signifikante Reduktion der Aminosäuren Glutamat, Glutamin, Aspartat, Alanin und Threonin beobachtet werden. Dabei ist insbesondere die Aminosäure Glutamat essentiell für den gesamten pflanzlichen Stoffwechsel. Aus Glutamat werden beispielsweise eine Reihe weiterer Aminosäuren gebildet, wie z.B. Glutamin, Aspartat, Alanin, Prolin, und Arginin (LAM *et al.*, 1995; 1996). Interessanterweise sind eben diese Aminosäuren mit Ausnahme von Prolin und Arginin in *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen reduziert, was sich möglicherweise durch den verringerten Glutamatgehalt sowie der damit einhergehenden Reduktion der Nitratassimilation begründet werden könnte. Für diese Theorie spricht beispielsweise die reduzierte Konzentration von Alanin innerhalb der Knockout-Pflanzen. Für die Synthese von Alanin wird neben Glutamat auch Pyruvat benötigt (STREETER & THOMPSON, 1972). Der Gehalt von Pyruvat ist allerdings in den Knockout-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen signifikant erhöht (Tabelle 3.4; Abbildung 4.1). Somit scheint die reduzierte Alaninkonzentration die direkte Folge einer verminderten Glutamat-Verfügbarkeit zu sein. Weiter stellt Glutamat auch das Ausgangsprodukt für die Chlorophyllbiosynthese dar (HARTEL & GRIMM, 1998), was sich mit den Beobachtungen deckt, dass *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen weniger Chlorophyll enthalten als Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.21).

Die Bestimmung der Glycinkonzentration in *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen hat ergeben, dass diese Pflanzen einen dramatisch erhöhten Glycingehalt aufweisen. Dabei konnte eine bis zu 120-fache Erhöhung der Glycinkonzentration im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen beobachtet werden (Tabelle 3.5). Interessanterweise zeigte nur Glycin in homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen eine derart dramatische Erhöhung. Glycin spielt besonders bei der für Pflanzen spezifischen Photorespiration eine herausragende Rolle. Dabei wird Glycin in den Mitochondrien über die Glycinecarboxylase unter Abgabe von CO₂ und Ammonium zu Serin umgewandelt (BOURGUIGNON *et al.*, 1999). Das dabei frei werdende Ammonium wird daraufhin in den Chloroplasten mit Hilfe der Glutamatsynthase wieder refixiert, die die Synthese von zwei Molekülen Glutamat aus einem Molekül Glutamin katalysiert (TEMPEST *et al.*, 1970). Die extreme Veränderung der Glycinkonzentration in den *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen könnte mehrere mögliche Ursachen haben.

Zum einen könnte es sich bei *AfER-ANT1* um ein Transportprotein handeln, welches nicht ausschließlich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Beispielsweise konnte für eine Katalase aus Hefe bereits gezeigt werden, dass diese sowohl in den Mitochondrien als auch in den Peroxisomen lokalisiert ist (PETROVA *et al.*, 2004). Es besteht daher die Möglichkeit, dass *AfER-ANT1* nicht nur im ER sondern auch in der Membran der Mitochondrien lokalisiert ist und dort die biochemische Funktion eines Glycin-Transporters ausführt. Der dramatische Glycinanstau innerhalb der *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen könnte so durch die Deletion des *AfER-ANT1* Gens erklärt werden. Neben dieser Möglichkeit könnte der dramatische Glycineffekt auch durch eine starke Veränderung der enzymatischen Reaktionen während der Photorespiration begründet werden.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass *AfER-ANT1* neben der Funktion als ATP/ADP-Transporter des Endoplasmatischen Retikulums zudem eine Funktion als mitochondrialer Glycin-Transporter besitzt,

wurden in dieser Arbeit detaillierte Transportstudien gemacht. Dazu wurden Transportaufnahmen sowohl durch heterologe Expression des *AtER-ANT1* in *E. coli* als auch durch direkte Transportmessungen an isolierten Mitochondrien aus *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Glycin keinen Einfluss auf die durch *AtER-ANT1* vermittelte ATP-Transportaktivität in *E. coli*-Zellen hat (Abb. 3.25). Weiter konnte beobachtet werden, dass durch *AtER-ANT1* kein radioaktiv markiertes Glycin in die *E. coli*-Zellen transportiert werden kann (Abb. 3.26). Abschließend zeigten direkte Transportmessungen, dass aus *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen isolierte Mitochondrien, trotz Deletion des Gens zu einem unveränderten Glycintransport befähigt sind (Abb. 3.27). Da es sich bei *AtER-ANT1* somit nicht um einen Glycin-Transporter handelt, muss der dramatische Anstau der Glycinkonzentration in den *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen auf andere physiologische Weise erklärt werden.

Um dies genauer zu untersuchen, wurden weitere Wachstumsanalysen der *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen durchgeführt, wobei die Pflanzen unter hoch CO_2 -Bedingungen angezogen wurden, was zu einer Unterdrückung der Photorespiration und damit einhergehend möglicherweise zu einer Reduktion des extremen Glycinanstaus führen könnte. Interessanterweise zeigte sich, dass bei einer Anzucht der *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter hoch CO_2 der im Wachstum dramatisch retardierte Phänotyp nahezu aufgehoben wird (Abb. 3.28). Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass die Deletion des *AtER-ANT1* zu enormen pleiotropen Effekten des Photorespirationsstoffwechsels innerhalb der Pflanze führt, welche sich wiederum in dem dramatischen Phänotyp unter ambienten CO_2 -Bedingungen widerspiegeln. Zur Analyse, ob die Aufhebung des dramatischen Phänotyps ebenfalls mit einer „Normalisierung“ der Metabolitengehalte einhergeht, wurden eine Reihe von Metaboliten bei *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen bestimmt, die unter hoch CO_2 angezogen wurden. Abbildung 4.2 (siehe nächste Seite) zeigt die Veränderungen der Metabolite, besonders im Aminosäurestoffwechsel der *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen, die unter hoch CO_2 -Bedingungen angezogen wurden.

Die Abbildung verdeutlicht, dass die Anzucht der *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter hoch CO_2 -Bedingungen zu einer „Normalisierung“ der Metabolitengehalte und damit einhergehend zu einer Verbesserung des Stoffwechsels führt. Dies spiegelt sich wiederum in der phänotypischen Erscheinung der *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen wider. Die Bestimmung der ATP-Konzentration zeigt im Vergleich zu ambienten CO_2 -Bedingungen keine Reduktion des ATP-Gehaltes in *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen (Abb. 3.29), was auf eine verbesserte Photosyntheseleistung der Pflanzen hindeutet. Weiter glich sich auch die Konzentration von Glutamat der gemessenen Menge in Wildtyp-Pflanzen an (Tabelle 3.6). Der normalisierte Glutamatlevel führt seinerseits zu einer Normalisierung der Konzentrationen der Aminosäuren, die Glutamat als Ausgangssubstrat besitzen (Tabelle 3.6). Unter hoch CO_2 -Bedingungen kann in *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen dennoch eine weiterhin erhöhte Glycin- und Serin-Konzentration im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen beobachtet werden (Tabelle 3.6). Die Erhöhung der Glycinkonzentration ist unter hoch CO_2 mit einer sechsfachen Erhöhung weniger dramatisch als unter ambienten CO_2 -Bedingungen (120-fach). Nun stellt sich weiter die Frage, wie der dramatische Glycinanstau zu erklären ist.

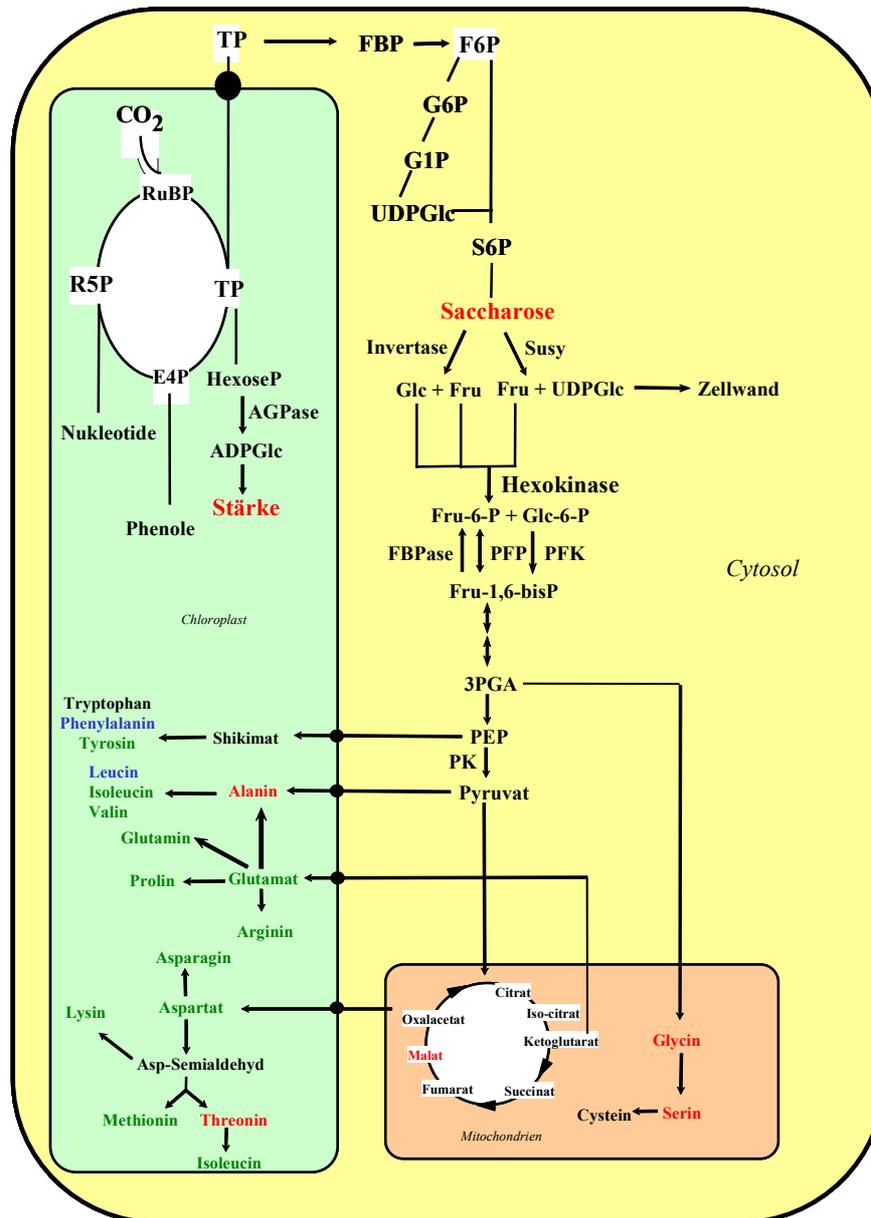


Abbildung 4.2: Schema der Aminosäuresynthese und wichtiger zellulärer Stoffwechselwege. Dabei wurden die Metabolite in homozygoten *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen unter hoch CO₂-Bedingungen ermittelt. Metabolite in grün weisen keine Veränderung der Konzentration im Vergleich zum Wildtyp auf. Rot dargestellte Metabolite sind in *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen signifikant erhöht. Blau dargestellte Metabolite sind in *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt. Metabolite in schwarz wurden bei den Experimenten nicht bestimmt.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Deletion des *AfER-ANT1* Gens indirekt zu einer Inaktivierung bzw. einer Reduktion der Glycin-Decarboxylaseaktivität führt, so dass das während der Photorespiration gebildete Glycin nicht zu Serin decarboxyliert werden kann. Dies hätte einen dramatischen Anstau von Glycin unter ambienten CO₂-Bedingungen zur Folge.

Interessanterweise weisen *Arabidopsis*-Pflanzen, die keine Glycindecarboxylase besitzen, ähnlich wie *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen einen stark im Wachstum retardierten Phänotyp auf (SOMERVILLE *et al.*, 2001; WINGLER *et al.*, 1997; HEINEKE *et al.*, 2001). In diesen Pflanzen konnte ebenso wie in den *AfER-ANT1* Knockout-Pflanzen eine dramatisch erhöhte Glycin-Konzentration (bis zu 100-fach) sowie

eine Reduktion des Chlorophyllgehaltes durch eine verminderte Photosyntheseleistung beobachtet werden (HEINECKE *et al.*, 2001).

Ein Grund der Inaktivierung der Glycin-Decarboxylase in den *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen könnte sein, dass die zur Decarboxylierung von Glycin zu Serin notwendigen Cofaktoren, u.a. Tetrahydrofolat, NAD, Liponsäure und Pyridoxalphosphat (PLP), nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen (WALKER & OLIVER, 1986; YASUNO & WADA, 1998). Pyridoxal-Phosphat wird dabei aus Pyridoxin und Vitamin B6 synthetisiert, wobei die Synthese von Vitamin B6 wiederum von der Verfügbarkeit von Glutamin und somit Glutamat abhängt (TAMBASCO-STUDART *et al.*, 2005).

Zur Klärung des dramatischen Glycinanstaus in homozygoten *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter ambienten CO₂-Bedingungen könnten daher Messungen der Glycin-Decarboxylase-Aktivität in *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp sehr aufschlussreich sein.

Anhand der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse lässt sich abschließend festhalten, dass unter ambienten CO₂-Bedingungen das Ausschalten des *AtER-ANT1* und damit einhergehend ein verminderter ER-Metabolismus, zu dramatischen pleiotropen Effekten im gesamten Pflanzenstoffwechsel führt. Dabei konnten durch Wachstumsanalysen und Metaboliten-Bestimmungen an *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen unter hoch CO₂-Bedingungen eine signifikante Verbesserung sowohl des Wachstums als auch des Stoffwechsels beobachtet werden. Zur näheren Analyse der Stoffwechselwege und Metabolite, die direkt und nicht über pleiotrope Effekte durch das Ausschalten von *AtER-ANT1* zustande kommen, könnten weitere Analysen mit Pflanzen dienen, die unter hoch CO₂ angezogen wurden. Mit Hilfe von Microarray-Analysen von *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen, die unter hoch CO₂ im Vergleich zum Wildtyp angezogen wurden, könnte ebenso ein umfassender Überblick über die physiologische Funktion des *AtER-ANT1* gewonnen werden. Um einen detaillierten Einblick in veränderte Stoffwechselprozesse zu erlangen, die direkt mit einer Reduktion des *AtER-ANT1* einhergehen, könnte hier auch die physiologische Charakterisierung der in dieser Arbeit hergestellten *AtER-ANT1* Antisensepflanzen („Knock-down“) eine Anwendung finden (Kapitel 3.1.5.1).

Zudem könnten ER-spezifische Untersuchungen weitere Einblicke in die physiologische Funktion des *AtER-ANT1* liefern. Dazu wäre eine umfangreiche Analyse des ER-Metabolismus, wie zum Beispiel Expressionsstudien von ATP-abhängigen ER-Proteinen (u.a. BiP, Calnexin, Calretikulin) über Northern-Blot-Analysen bzw. quantitative RT-PCR oder die Bestimmung von ER-relevanten Metaboliten (u.a. Triacylglycerin, Fettsäuren), in *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen oder Antisensepflanzen eine weitere Herausforderung. Zusätzlich wäre es interessant zu untersuchen, ob die Deletion des *AtER-ANT1* mit einer Veränderung der im ER stattfindenden Proteinfaltung, Glykosylierungsreaktionen oder Proteinsekretion einhergeht.

Abschließend stellt sich die Frage, weshalb homozygote *AtER-ANT1* Knockout-Pflanzen, denen ATP im ER-Lumen fehlt, nicht letal sind. Dabei sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass in Pflanzen ein weiteres ATP-Transport-System innerhalb der ER-Membran existieren könnte, welches eine zumindest basale ATP-Versorgung des ER-Lumens gewährleisten könnte. Neuste Studien postulieren, dass ein in der ER-Membran existierender „Voltage-Dependent-Anion-Channel“ einen ATP-Transport über die ER-Membran ins Lumen katalysieren könnte (SHOSHAN-BARMATZ & ISRAELSON, 2005), der eine

basale ATP-Versorgung ins pflanzliche Endoplasmatische Retikulum sicherstellen würde. Desweiteren könnten alternative Nukleotid-Carrier innerhalb der MCF - von denen erst etwa ein Drittel funktionell bekannt ist - existieren, die diese Aufgabe übernehmen (PICAULT *et al.*, 2004).

4.2 Die Redundanz verschiedener AAC-Isoformen in *Arabidopsis thaliana*

Ähnlich wie in Pflanzen konnten in Tieren und Hefen bereits mehrere mitochondriale AAC-Isoformen identifiziert werden (HATANAKA *et al.*, 2001; KOLAROV *et al.*, 1990). Dabei konnte in Hefe gezeigt werden, dass deren AACs in Abhängigkeit des Stoffwechsels exprimiert werden (KOLAROV *et al.*, 1990; DRGON *et al.*, 1992). Dagegen wurde in Tieren eine gewebespezifische Expression der vorhandenen mitochondrialen AACs beobachtet (HATANAKA *et al.*, 2001; SHINOHARA *et al.*, 1993).

In *Arabidopsis thaliana* konnten bereits drei AAC-Isoformen identifiziert werden, die subzellulär alle in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Dabei wurde über eine heterologe Expression in *E. coli* gezeigt, dass diese Proteine nahezu identische biochemische Charakteristika aufweisen (HAFERKAMP *et al.*, 2003). Daher ist es sehr interessant zu klären, weshalb in *Arabidopsis thaliana* verschiedene

AAC-Isoformen existieren. Aufgrund der ähnlichen biochemischen Eigenschaften der Proteine konnte diese Frage noch nicht geklärt werden.

In den Arbeiten von HAFERKAMP (2003) und GERHOLD (2004) wurde die gewebespezifische und entwicklungsabhängige Expression der mitochondrialen AACs aus *Arabidopsis thaliana* über Promotor-GUS-Fusionskonstrukte sowie Microarray-Analysen („Genevestigator“) eingehend untersucht. Dabei zeigte sich bereits eine omnipräsente Expression der ersten AAC-Isoform (AAC1) in allen Geweben sowie in allen Entwicklungsstadien der Pflanze. Dagegen konnte bei *AtAAC2* eine verstärkte Expression dieses Gens während der Blütenentwicklung beobachtet werden. Im Falle von *AtAAC3* zeigte sich eine starke Expression während des Abreifens der Pflanzen sowie bei der Entwicklung der Schoten (HAFERKAMP, 2003; GERHOLD, 2004).

Um weitere Einblicke in die Redundanz verschiedener AAC-Isoformen zu erlangen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht, homozygote Knockout-Pflanzen bezüglich der verschiedenen *AtAAC*-Gene zu isolieren.

4.2.1 Die Existenz von *AtAAC1* ist für *Arabidopsis thaliana* Pflanzen essentiell

Bislang existieren von der SALK-Bibliothek drei unabhängige Knockout-Linien bezüglich des *AtAAC1*-Gens. Dabei konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es bei allen drei existierenden Linien nicht möglich ist, unter ambienten Wachstumsbedingungen auf Erde, homozygote Knockout-Pflanzen bezüglich des *AtAAC1*-Gens zu züchten (Kapitel 3.3.1). Somit scheint eine komplette Deletion des *AtAAC1*-Gens in beiden Allelen zu einem letalen Phänotyp zu führen.

Diese Beobachtungen bestärken die Aussagen, welche durch die Analyse der gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression von *AtAAC1* bereits gewonnen wurden, dass es sich bei *AtAAC1* um ein omnipräsent stark exprimiertes Protein handelt. Die Letalität homozygoter *AtAAC1* Knockout-Pflanzen zeigt weiter, dass dieses Gen für die Pflanze absolut essentiell ist und bei einem Verlust des Gens auch nicht durch die anderen zwei AAC-Isoformen ersetzt werden kann.

Zu einer weiteren Analyse der physiologischen Funktion des *AtAAC1*-Gens innerhalb der Pflanze könnte die Herstellung von Dosismutanten wie Antisense- oder RNAi-Pflanzen hilfreich sein. *AtAAC1* ist allerdings auf DNA-Ebene zu der Isoform *AtAAC2* bis zu 85% und zu *AtAAC3* bis zu 70% homolog. Aufgrund dieser Tatsache ist die Herstellung von Knockdown-Mutanten bezüglich des *AtAAC1* Gens relativ schwierig.

Weiterhin könnte ein Versuch unternommen werden, die Samen von geselbsteten heterozygoten *AtAAC1* Knockout-Pflanzen unter verbesserten Bedingungen auszusäen, um ein Auskeimen der homozygoten *AtAAC1* Knockout-Samen zu induzieren. Dazu könnte eine Aussaat der Samen in Sterilkultur eine Möglichkeit zur Züchtung von homozygoten *AtAAC1* Knockout-Pflanzen darstellen. Eine weitere Möglichkeit stellt eine Aussaat unter hoch CO₂-Bedingungen dar, die beispielsweise auch das Wachstum homozygoter Knockout-Pflanzen bezüglich des *AtER-ANT1* Gens signifikant verbesserte.

4.2.2 Homozygote Knockout-Pflanzen bezüglich *AtAAC2* und *AtAAC3*

Bei den Isoformen *AtAAC2* und *AtAAC3* ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen homozygote Knockout-Pflanzen bezüglich der jeweiligen Gene zu züchten (Kap. 3.3.3; Abb. 3.37; Kap. 3.3.4; Abb. 3.38). Hier war eine Anzucht der jeweiligen Knockout-Mutanten unter ambienten Wachstumsbedingungen auf Erde möglich. Weiter konnte beobachtet werden, dass sowohl die *AtAAC2* als auch die *AtAAC3* Knockout-Pflanzen unter diesen Bedingungen keinen morphologischen Phänotyp aufweisen.

Das Ergebnis zeigt, dass *AtAAC2* und *AtAAC3* in *Arabidopsis thaliana* im Bereich der Pflanzenentwicklung eine eher untergeordnete Funktion im Vergleich zur Isoform *AtAAC1* besitzen. Diese Beobachtungen bekräftigen die Ergebnisse der gewebe- und entwicklungsspezifischen Analysen von HAFERKAMP (2003) und GERHOLD (2004), die eine Expression dieser Gene besonders im Adultstadium der Pflanzen zeigen.

Durch die Identifizierung von homozygoten *AtAAC2* und *AtAAC3* Knockout-Pflanzen können nun im weiteren Forschungsverlauf eine Reihe von Studien durchgeführt werden, die zur Analyse der physiologischen Funktion dieser Gene im pflanzlichen Stoffwechsel dienen. So könnten beispielsweise umfangreiche Metabolit-Untersuchungen stoffwechselspezifische Wirkungsweisen der Isoformen *AtAAC2* und *AtAAC3* aufdecken. Dabei sollte allerdings darauf geachtet werden, dass bei den Metaboliten-Bestimmungen besonders die Gewebe untersucht werden, in denen *AtAAC2* bzw. *AtAAC3* exprimiert werden (*AtAAC2*: Blüte; *AtAAC3*: Samen/Schoten). Microarray-Analysen der Knockout-Pflanzen könnten außerdem einen umfassenden Überblick über die physiologische Funktion der beiden Transportproteine liefern. Weiter wäre es mittels Northern-Blot-Analysen sehr interessant zu untersuchen, ob die Deletion der Isoform zwei oder drei möglicherweise jeweils zu einer Hochregulation der anderen Isoformen führt.

4.2.3 AtAAC5: Eine weitere Isoform in *Arabidopsis thaliana*

Bereits in der Diplomarbeit von LEROCH (2003) konnte eine weitere AAC-Isoform in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Studien zur subzellulären Lokalisierung mittels transienter Expression in isolierten Tabakprotoplasten sprechen für eine Lokalisierung des AtAAC5 in den Mitochondrien. Allerdings könnte aufgrund der sehr ähnlichen Größe von Mitochondrien und Peroxisomen auch eine Lokalisierung des AtAAC5 in den Peroxisomen in Betracht gezogen werden (LEROCH, 2003). Bemerkenswerterweise konnte über Analysen der Aminosäuresequenz nachgewiesen werden, dass dieses Protein wie AtER-ANT1 kein N-terminales Transitpeptid besitzt. Weiter wurde in der Diplomarbeit versucht, die biochemische Funktion des AtAAC5 durch heterologe Expression des Proteins im *E. coli*-System zu untersuchen. Allerdings konnte zu dieser Zeit die Funktion des Proteins in diesem System noch nicht geklärt werden.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit hat sich gezeigt, dass eine funktionelle biochemische Charakterisierung des AtER-ANT1 im heterologen *E. coli*-Expressionssystem nur dann ermöglicht wird, wenn das Protein ohne einen c-terminalen Histidin-Tag in den *E. coli*-Zellen exprimiert wird. In der Diplomarbeit von LEROCH (2003) wurde die Expression des AtAAC5 in *E. coli* mit einem Histidin-Tag durchgeführt. Auch im Falle von AtAAC5 sollte daher ausgeschlossen werden, dass ein Histidin-Tag einen funktionellen Einbau des AtAAC5-Proteins in die *E. coli*-Membran behindert. Um die biochemische Funktion des AtAAC5 zu klären, könnte daher im weiteren Forschungsverlauf das AtAAC5-Protein ohne diesen zusätzlichen Histidin-Tag in *E. coli* exprimiert werden. Zusätzlich könnte auch eine Verlängerung der Induktionszeiten für die heterologe Expression des AtAAC5 in *E. coli* hilfreich sein, sowie eine Optimierung der Medien, die bei der *E. coli*-Anzucht verwendet werden. Einen positiven Effekt auf die Transportaktivität des AtER-ANT1 durch Optimierung der *E. coli*-Anzucht konnte dabei in dieser Arbeit gezeigt werden.

Im Falle von AtAAC5 könnte es sich auch um ein Transportprotein handeln, das im Gegensatz zu den anderen vier Isoformen weder ATP noch ADP transportiert. Beispielsweise konnten bereits in Hefe (Leu 5) und Mensch (Greaves Disease Carrier) MCF-Mitglieder identifiziert werden, die subzellulär in den Mitochondrien lokalisiert sind und als Transportsubstrat Coenzym A aufweisen (PROHL *et al.*, 2001).

Zur physiologischen Charakterisierung der fünften AtAAC-Isoform wurden in dieser Arbeit homozygote Knockout-Pflanzen bezüglich des AtAAC5-Gens gezüchtet (Kapitel 3.3.4; Abb. 3.39). Auch diese Pflanzen zeigen unter ambienten Wachstumsbedingungen auf Erde keinen morphologisch erkennbaren Phänotyp. Daher wäre es zukünftig interessant zu untersuchen, ob Bedingungen geschaffen werden können, die einen sichtbaren Phänotyp der homozygoten AtAAC5 Knockout-Pflanzen zur Folge haben. Zudem wäre eine umfangreiche physiologische Analyse der vorliegenden homozygoten AtAAC5-Pflanzen eine weitere interessante Aufgabe. Dabei könnten Microarray-Analysen und umfangreiche Metaboliten-Bestimmungen in homozygoten AtAAC5-Pflanzen interessante Einblicke in die

physiologische Funktion dieses Transportproteins gewähren. Zudem könnten solche Metaboliten-Bestimmungen Hinweise auf die Transportfunktion des *AtAAC5* aufzeigen.

Weiter wurden in dieser Arbeit im Hinblick auf die physiologische Bedeutung des *AtAAC5*-Gens transgene *AtAAC5*-Promotor-GUS-Pflanzen hergestellt (Abb. 3.40). Eine Analyse dieser Pflanzen könnte zeigen, in welchem Gewebe bzw. Entwicklungsstadium der Pflanze *AtAAC5* exprimiert wird.

4.3 Ein Adeninnukleotid-Transporter in dem einzelligen Protisten *Entamoeba histolytica*

Studien belegen die Existenz einer Reihe von eukaryotischen Organismen, die keine klassischen Mitochondrien tragen. Jedoch konnten in diesen Organismen alternative Organellen in Form von Hydrogenosomen oder Mitosomen identifiziert werden (BIAGINI *et al.*, 1997; EMBLEY *et al.*, 1997; ROGER, 1999; YARLETT & HACKSTEIN, 2005; VAN DER GIEZEN & TOVAR, 2005; VAN DER GIEZEN *et al.*, 2005).

Eine Analyse des phylogenetischen Ursprungs dieser Organellen gestaltet sich sehr schwierig, weil mit einer Ausnahme (*Nyctotherus ovalis*) die Hydrogenosomen und Mitosomen im Gegensatz zu den Mitochondrien kein eigenes Genom besitzen (TOVAR *et al.*, 2004; TOVAR & VAN DER GIEZEN, 2005). Weiter zeichnen sich Hydrogenosomen und Mitosomen durch das Fehlen einer für Mitochondrien typischen Elektronentransportkette aus (MÜLLER, 1998; VAN DER GIEZEN *et al.*, 1997; MARTIN & MÜLLER, 1998; TOVAR *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2002; DYALL *et al.*, 2004).

Ein zentrales Merkmal, das diese drei Organelltypen dennoch evolutiv stark miteinander verbindet ist die gemeinsame Fähigkeit zur Eisen-Schwefel-Clusterbildung, die für den komplexen Stoffwechsel eukaryotischer Zellen essentiell ist (WILLIAMS *et al.*, 2002; TOVAR *et al.*, 1993; VAN DER GIEZEN *et al.*, 2005; LILL & MÜHLENHOFF, 2005).

Für einen tieferen Einblick in die Entstehung von Mitochondrien, Hydrogenosomen und Mitosomen stellt die biochemische Charakterisierung von ATP/ADP-Transportproteinen eine sehr gute Möglichkeit dar. Dabei konnte bereits ein klassischer AAC in Hydrogenosomen von *Neocallimastix*, sowie ein alternativer ATP/ADP-Transporter in *Trichomonas gallinae* biochemisch charakterisiert werden (VONKEN *et al.*, 2002; TJADEN *et al.*, 2004). Für weiterführende Untersuchungen wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein ATP/ADP-Transporter in dem Mitosomen-tragenden einzelligen Protisten *Entamoeba histolytica* biochemisch charakterisiert. Hierzu wurde das für diesen Carrier stabilere heterologe *E.coli*-Expressionssystem (*E.coli*-Stamm C43) verwendet. Bei den Studien konnte gezeigt werden, dass sich dieses Transportprotein in seinen biochemischen Eigenschaften stark von bereits charakterisierten klassischen AACs und alternativen ATP/ADP-Transportern unterscheidet (VONKEN *et al.*, 2002; TJADEN *et al.*, 2004; HAFERKAMP, 2003; Kapitel 3.4).

Bei der Analyse des Substratspektrums des Transporters aus *Entamoeba histolytica* (*EhANT1*) durch eine heterologe Expression des Transportproteins in *E.coli* konnte beobachtet werden, dass *EhANT1* im Gegensatz zu allen bisher bekannten klassischen AACs und alternativen ATP/ADP-Transportern außer ATP und ADP ebenso in der Lage ist, AMP zu transportieren (Tab. 3.11). Dabei ist es interessant zu vermerken, dass *EhANT1* im phylogenetischen Stammbaum eine gesonderte Stellung einnimmt, da dieses Transportprotein weder zu den klassischen AACs noch zu dem alternativen ATP/ADP-Transporter

aus *Trichomonas gallinae* gruppiert wird (Abb. 3.41). *EhANT1* wird im phylogenetischen Stammbaum in die Brittle-Familie eingegliedert. Für das Brittle-Homolog aus *Solanum tuberosum* konnte bereits ein Transport von ATP, ADP und AMP nachgewiesen werden (LEROCH *et al.*, 2005). Zudem ist es in dieser Arbeit gelungen, die Substrataffinitäten des *EhANT1* für ATP und ADP detailliert zu analysieren. Dabei ergaben die ermittelten Daten, dass *EhANT1* im Vergleich zu dem alternativen AAC und den klassischen AACs eine geringere Affinität sowohl für ATP als auch für ADP besitzt (Tab. 3.10). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Transport dieser Substrate nicht in Abhängigkeit eines Membranpotentials stattfindet. Diese Ergebnisse werden durch Studien bestärkt, die belegen, dass Mitosomen keine Enzymkomplexe der Atmungskette innerhalb ihrer Membranen besitzen. Aufgrund dessen sind sie nicht zur Ausbildung einer Elektronentransportkette und damit einhergehend zur Bildung eines Membranpotentials in der Lage (MÜLLER, 1998; VAN DER GIEZEN *et al.*, 1997; MARTIN & MÜLLER, 1998; TOVAR *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2002; DYALL *et al.*, 2004).

Sowohl Mitochondrien als auch Hydrogenosomen sind in der Lage ATP zu synthetisieren. Die ATP-Synthese in den Mitochondrien verläuft dabei über die Atmungskette, den Citratzyklus und die F_0/F_1 -ATPase. Bei Hydrogenosomen konnte hingegen eine ATP-Produktion über eine Substratkettenphosphorylierung beobachtet werden. In Mitosomen hingegen findet keine ATP-Produktion statt (MÜLLER, 1993, 1998; VAN DER GIEZEN *et al.*, 1997; MARTIN & MÜLLER, 1998; TOVAR *et al.*, 1999, 2003; MARTIN *et al.*, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2002; DYALL *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Tatsache scheint die Funktion eines mitosomalen ATP/ADP-Transporters im Gegensatz zu klassischen und alternativen AACs in der Versorgung der Mitosomen mit ATP zu liegen. Es wird daher kein ATP aus dem Organell exportiert sondern importiert, um energieverbrauchende Reaktionen innerhalb der Mitosomen zu gewährleisten, wie beispielsweise die Eisen-Schwefel-Cluster-Bildung, den Protein-Import oder die Protein-Faltung.

Die Analyse von Inhibitoren der klassischen und alternativen AACs, die innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurde, bestärkt zudem die Hypothese einer divergenten Evolution von Mitochondrien, Hydrogenosomen und Mitosomen (Tab. 3.12). Dabei konnte gezeigt werden, dass alle klassischen ATP/ADP-Transporter hochgradig sensitiv gegenüber Bongkreksäure und teilweise auch gegen Carboxyatractylat sind (*AtAAC2*; *AAC1 N.spec.*). Dagegen sind sowohl der alternative hydrogenosomale ATP/ADP-Transporter aus *Trichomonas gallinae* als auch der mitosomale Adeninnukleotid-Transporter aus *Entamoeba histolytica* absolut insensitiv gegenüber BKA und CAT. Interessanterweise unterscheiden sich auch die Inhibitorspektren der alternativen Transporter aus *Trichomonas gallinae* und *Entamoeba histolytica*. Bei *EhANT1* konnte eine Inhibierung des ATP-Transportes durch die Zugabe von PLP und NEM beobachtet werden, die wiederum auf den alternativen AAC aus *Trichomonas* keinerlei Einfluss hatten.

Die hier gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass weiterführende Analysen an ATP/ADP-Transportproteinen von basalen einzelligen Organismen notwendig sind, um die komplexe divergente Evolution von Mitochondrien, Hydrogenosomen und Cryptosomen besser zu verstehen. So konnte beispielsweise ein weiterer putativer AAC in *Dictyostelium disciodeum* (Amoeba) identifiziert werden (<http://www.dictyostelium.org/>), dessen biochemische Charakterisierung ebenso zur Klärung beitragen könnte.

5. Zusammenfassung

Die Transportproteine *AfER-ANT1* und *OsER-ANT1* sind Vertreter der MCF (mitochondrial carrier family) und werden phylogenetisch in die Gruppe der klassischen mitochondrialen ADP/ATP-Transporter (AACs) eingegliedert. Unter Verwendung des heterologen *E. coli*-Expressionssystems konnte gezeigt werden, dass es sich bei *AfER-ANT1* und *OsER-ANT1* um spezifische ADP/ATP-Transporter handelt. Der Transport dieser Substrate verläuft in Form eines Gegentausches, entsprechend den klassischen mitochondrialen AACs. Sowohl *AfER-ANT1* als auch *OsER-ANT1* sind hochgradig insensitive gegen die Hemmstoffe BKA und CAT der klassischen mitochondrialen AACs. Dagegen konnte für diese Transportproteine NEM (N-ethylmaleimid) als spezifischer Hemmstoff identifiziert werden, der interessanterweise auch eine inhibierende Wirkung auf den Nukleotidtransport über die ER-Membran besitzt. Der Transport der klassischen mitochondrialen AACs wird dagegen nicht beeinflusst. Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung von *AfER-ANT1* mittels GFP-Fusion ergaben, dass dieses Protein in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Weiter wurde eine Methode etabliert, die Lokalisierung des *AfER-ANT1* *in planta* zu untersuchen. Durch Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation in Abhängigkeit der An- bzw. Abwesenheit von Mg^{2+} konnte die Lokalisierung des *AfER-ANT1* im ER bestätigt werden. Weiter konnte mit diesem Gradienten auch eine Kolokalisierung des *AfER-ANT1* mit dem ER-spezifischen Marker-Protein Calretikulin gezeigt werden. Eine Analyse der gewebespezifischen Expression offenbarte eine starke Expression des *AfER-ANT1* in Geweben, die eine hohe ER-Aktivität aufweisen, u.a. die Wurzelspitze, die Leitgefäße, die Samen und die Pollengewebe. Desweiteren wurde die physiologische Rolle des *AfER-ANT1* anhand von zwei unabhängigen Knockout-Linien bezüglich dieses Gens umfassend untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass der dramatisch im Wachstum retardierte Phänotyp der Knockout-Pflanzen unter ambienten Wachstumsbedingungen mit einer enormen Veränderung des gesamten Stoffwechsels einhergeht. Detaillierte Metabolit-Analysen zeigten außerdem, dass die Deletion des *AfER-ANT1* Gens besonders starke pleiotrope Effekte auf den Photorespirationsstoffwechsel hat. Diese Beobachtungen wurden durch Analysen der Knockout-Pflanzen unter hoch CO_2 -Bedingungen bestätigt. Die hoch CO_2 -Bedingungen bewirkten sowohl eine Verbesserung des gesamten Stoffwechsels als auch der morphologischen phänotypischen Erscheinung der Knockout-Pflanzen.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Redundanz verschiedener AAC-Isoformen in *Arabidopsis thaliana*, die auf biochemischer Ebene sehr ähnliche Eigenschaften besitzen. Knockout-Analysen zeigten, dass *AtAAC1* für den pflanzlichen Stoffwechsel essentiell ist, da das Ausschalten eine Letalität der Pflanzen hervorruft. Für *AtAAC2* und *AtAAC3* kann dahingegen eine physiologische Bedeutung in späten Entwicklungsstadien der Pflanze angenommen werden.

Neben der Charakterisierung pflanzlicher Transportproteine wurde zudem ein mitochondrialer Adeninnukleotid-Transporter aus dem Protisten *Entamoeba histolytica* biochemisch unter Verwendung des heterologen *E. coli*-Expressionssystems charakterisiert. Die Analysen ergaben, dass es sich bei diesem Adeninnukleotid-Transporter um ein zu den klassischen mitochondrialen AACs alternatives Transportprotein handelt, das sich sowohl im Substratspektrum als auch in Inhibitorstudien von bereits charakterisierten mitochondrialen und hydrogenosomalen ATP/ADP-Transportern unterscheidet. Mitosomen benötigen Energie u.a. zur Bildung von Fe-S-Clustern. Da diese Organellform im Gegensatz zu Mitochondrien und Hydrogenosomen nicht zu einer ATP-Synthese fähig sind, indizieren die ermittelten Daten eine physiologische Funktion dieses Proteins in der Versorgung der Mitosomen mit ATP.

6. Literaturverzeichnis

- Abeijon, C., E. C. Mandon, and C. B. Hirschberg.** 1997. Transporters of nucleotide sugars, nucleotide sulfate and ATP in the Golgi apparatus. *Trends Biochem. Sci.* **22**:203-207.
- Akhmanova, A., F. Voncken, A. T. van, H. A. van, B. Boxma, G. Vogels, M. Veenhuis, and J. H. Hackstein.** 1998. A hydrogenosome with a genome. *Nature* **396**:527-528.
- Bakker-Grunwald, T., Wostmann, C.** 1993. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol Today* **9**:27-31.
- Becker, D., E. Kemper, J. Schell, and R. Masterson.** 1992. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* **20**:1195-1197.
- Bergmann A, Ericson I.**1983. Effects of NADH, succinate and malate on the oxidation of glycine in spinach leaf mitochondria. *Physiol Plant* **59**:427.
- Biagini GA, Finlay BJ, Lloyd D.**1997. Evolution of the hydrogenosome. *FEMS Microbiol Letters* **155**:133-140.
- Birnboim, H.C., Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**(6):1513-23.
- Bourguignon, J., Rebeille, F., Douce, R.** 1999. Serine and glycine metabolism in higher plants. In "Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology", Marcel Dekker, NY, pp. 111-146.
- Boxma, B., de Graaf, R.M., van der Staay, G.W.M., van Alen, T.A., Ricard, G., Gabaldon, T., van Hoek, A., Moon-van der Staay, S., Huynen, M.A., Hackstein, J.H.P.** 2005. An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* **434**:74-79.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Brandizzi, F., E. L. Snapp, A. G. Roberts, J. Lippincott-Schwartz, and C. Hawes.** 2002. Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: evidence from selective photobleaching. *Plant Cell* **14**:1293-1309.
- Brandizzi, F., S. L. Irons, J. Johansen, A. Kotzer, and U. Neumann.** 2004. GFP is the way to glow: bioimaging of the plant endomembrane system. *J. Microsc.* **214**:138-158.
- Brodsky, J.L., Schekmann, R.** 1993. A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J Cell Biol.* **123**:1355-1363.
- Browse, J., N. Warwick, C. R. Somerville, and C. R. Slack.** 1986. Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* **235**:25-31.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M.** 1987. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**:376-378.
- Buzeli, R. A., J. C. Cascardo, L. A. Rodrigues, M. O. Andrade, R. S. Almeida, M. E. Loureiro, W. C. Otoni, and E. P. Fontes.** 2002. Tissue-specific regulation of BiP genes: a cis-acting regulatory domain is required for BiP promoter activity in plant meristems. *Plant Mol. Biol.* **50**:757-771.
- Capasso, J. M., T. W. Keenan, C. Abeijon, and C. B. Hirschberg.** 1989. Mechanism of phosphorylation in the lumen of the Golgi apparatus. Translocation of adenosine 5'-triphosphate into Golgi vesicles from rat liver and mammary gland. *J. Biol. Chem.* **264**:5233-5240.

- Chen, Y. F., M. D. Randlett, J. L. Findell, and G. E. Schaller.** 2002. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**:19861-19866.
- Church, G.M., Gilbert, W.** 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**(7):1991-5.
- Clairmont, C. A., A. De Maio, and C. B. Hirschberg.** 1992. Translocation of ATP into the lumen of rough endoplasmic reticulum-derived vesicles and its binding to luminal proteins including BiP (GRP 78) and GRP 94. *J. Biol. Chem.* **267**:3983-3990.
- Cavalier-Smith, T.** 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:297-354.
- Clough, S. J. and A. F. Bent.** 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**:735-743.
- Dacks, J.B., Doolittle, W.F.** 2001. Reconstructing/deconstructing the earliest eukaryotes: how comparative genomics can help. *Cell* **104**:419-425.
- Damm, B., R. Schmidt, and L. Willmitzer.** 1989. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **217**:6-12.
- DeWitt, N.D., Hong, B., Sussman, M.R., Harper, J.F.** 1996. Targeting of two *Arabidopsis* H(+)-ATPase isoforms to the plasma membrane. *Plant Physiol.* **112**(2):833-44.
- Drgon, T., L. Sabova, G. Gavurnikova, and J. Kolarov.** 1992. Yeast ADP/ATP carrier (AAC) proteins exhibit similar enzymatic properties but their deletion produces different phenotypes. *FEBS Lett.* **304**:277-280.
- Douce R, Neuburger M.** 1989. The uniqueness of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**:371-414.
- Dyall, S.D., Brown, M.T., Johnson, P.J.** 2004. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* **304**(5668):253-7.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen, S. Brunak, and H. G. Von.** 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**:1005-1016.
- Embley TM, Horner D, Hirt RP.** 1997. Hydrogenosomes in anaerobic eukaryotes: biochemically modified mitochondria? *Trends Ecol & Evol* **12**:437-440.
- Frigerio, L., A. Pastres, A. Prada, and A. Vitale.** 2001. Influence of KDEL on the fate of trimeric or assembly-defective phaseolin: selective use of an alternative route to vacuoles. *Plant Cell* **13**:1109-1126.
- Gabaldon, T., Huynen, M.A.** 2003. Reconstruction of the proto-mitochondrial metabolism. *Science* **301**(5633):609-609.
- Gabaldon, T., Huynen, M.A.** 2004. Shaping the mitochondrial proteome. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* **1659**(2-3):212-220.
- Gerhold, J.** 2004. Physiologische und molekulare Analyse von ADP/ATP-Carriern aus Pflanzen. Diplomarbeit
- Gething, M.J.; Sambrook, J.** 1992. Protein folding in the cell. *Nature.* **355**(6355):33-45.
- Gleave, A.** 1992. A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol.* **20**(6):1203-7.
- Grebenok, R.J., Pierson, E., Lambert, G.M., Gong, F.C., Afonso, C.L., Haldeman-Cahill, R., Carrington, J.C., Galbraith, D.W.** 1997. Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *Plant J* **11**(3):573-86.

- Gruis, D., J. Schulze, and R. Jung.** 2004. Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. *Plant Cell* **16**:270-290.
- Guillén, E. and C. B. Hirschberg.** 1995. Transport of adenosine triphosphate into the endoplasmic reticulum proteoliposomes. *Biochem.* **34**:5472-5476.
- Hackenberg, H. and M. Klingenberg.** 1980. Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate-adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100. *Biochem.* **19**:548-555.
- Haferkamp, I., J. H. Hackstein, F. G. Voncken, G. Schmit, and J. Tjaden.** 2002. Functional integration of mitochondrial and hydrogenosomal ADP/ATP carriers in the *Escherichia coli* membrane reveals different biochemical characteristics for plants, mammals and anaerobic chytrids. *Eur. J. Biochem.* **269**:3172-3181.
- Haferkamp, I.** 2003. Charakterisierung mitochondrialer und hydrogenosomaler ADP/ATP-Transporter. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.
- Hanning, I., Heldt H.W.** 1993. On the Function of Mitochondrial Metabolism during Photosynthesis in Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Leaves (Partitioning between Respiration and Export of Redox Equivalents and Precursors for Nitrate Assimilation Products). *Plant Physiol.* **103**(4):1147-115.
- Hartel, H., Lokstein, H., Dormann, P., Grimm, B., Benning, C.** 1998. Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **115**(3):1175-84.
- Hatanaka, T., Y. Takemoto, M. Hashimoto, E. Majima, Y. Shinohara, and H. Terada.** 2001. Significant expression of functional human type 1 mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast mitochondria. *Biol. Pharm. Bull.* **24**:595-599.
- Heazlewood, J. L., J. S. Tonti-Filippini, A. M. Gout, D. A. Day, J. Whelan, and A. H. Millar.** 2004. Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* **16**:241-256.
- Heineke, D., Bykova, N., Gardstrom, P., Bauwe, H.** 2001. Metabolic response of potato plants to an antisense reduction of the P-protein of glycine decarboxylase. *Planta* **212**(5-6):880-7.
- High, S. and B. Dobberstein.** 1992. Mechanisms that determine the transmembrane disposition of proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**:581-586.
- Hirschberg, C. B., P. W. Robbins, and C. Abeijon.** 1998. Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:49-69.
- Hoepfner, D., Schildknegt, D., Braakman, I., Philippsen, P., Tabak, H.F.** 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell.* **122**(1):85-95.
- Hsieh, K. and A. H. Huang.** 2004. Endoplasmic reticulum, oleosins, and oils in seeds and tapetum cells. *Plant Physiol* **136**:3427-3434.
- Huang, S., An, Y.Q., McDowell, J.M., McKinney, E.C., Meagher, R.B.** 1996. The *Arabidopsis thaliana* ACT4/ACT12 actin gene subclass is strongly expressed throughout pollen development. *Plant Journal* **10**(2):189-202.
- Jako, C., A. Kumar, Y. Wei, J. Zou, D. L. Barton, E. M. Giblin, P. S. Covello, and D. C. Taylor.** 2001. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol* **126**:861-874.
- Jakobsen, M. K., L. R. Poulsen, A. Schulz, P. Fleurat-Lessard, A. Moller, S. Husted, M. Schiott, A. Amtmann, and M. G. Palmgren.** 2005. Pollen development and fertilization in *Arabidopsis* is

- dependent on the MALE GAMETOGENESIS IMPAIRED ANTHERS gene encoding a type V P-type ATPase. *Genes Dev.* **19**:2757-2769.
- Klingenberg, M.** 1970. Mitochondria metabolite transport. *FEBS Lett* **6**:145-154.
- Klingenberg, M.** 1989. Molecular aspects of adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**:1-14.
- Kochendörfer, K. U., A. R. Then, B. G. Kearns, V. A. Bankaitis, and P. Mayinger.** 1999. Sac1p plays a crucial role in microsomal ATP transport, which is distinct from its function in Golgi phospholipid metabolism. *EMBO J.* **18**:1506-1515.
- Kolarov, J., N. Kolarova, and N. Nelson.** 1990. A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *J. Biol. Chem.* **265**:12711-12716.
- Koncz, C., Olsson, O., Langridge, W.H., Schell, J., Szalay, A.A.** 1987. Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **84**(1):131-135.
- Krömer S.** 1995. Respiration during photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**:45-70.
- Kuan, J. and M. H. Saier, Jr.** 1993. The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**:209-233.
- Kurland, C.G., Andersson, S.G.** 2000. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:786-820.
- Laemmli, K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lam, H.M., Coschigano, K., Schultz, C., Melo-Oliveira, R., Tjaden, G., Oliveira, I., Ngai, N., Hsieh, M-H., Coruzzi, G.** 1995. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* **7**:887-898.
- Lam, H.M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G.** 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**:569-593.
- Larsson, C., Nilson, A., Blomberg, A., Gustafsson, L.** 1997. Glycolytic flux is conditionally correlated with ATP concentration in *Saccharomyces cerevisiae*: a chemostat study under carbon- or nitrogen-limiting conditions. *J Bacteriol* **179**(23):7243-50.
- Lea, P.J., Ireland, R.J.** 1999. Nitrogen metabolism in higher plants. In "Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology", Marcel Dekker, NY, pp. 1-47.
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., Gojon, A.** 1999. Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant J* **18**(5):509-19.
- Leon-Avila, G., Tovar, J.** 2004. Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiology* **150**:1245-1250.
- Leroch, M.** 2003. Molekulare und biochemische Analyse mitochondrialer Transportproteine. Diplomarbeit.
- Leroch, M., S. Kirchberger, I. Haferkamp, M. Wahl, H. E. Neuhaus, and J. Tjaden.** 2005. Identification and characterization of a novel plastidic adenine nucleotide uniporter from *Solanum tuberosum*. *J. Biol. Chem.* **280**:17992-18000.
- Li, K., Warner, C.K., Hodge, J.A., Minoshima, S., Kudoh, J., Fukuyama, R., Maekawa, M., Shimizu, Y., Shimizu, N., Wallace, D.C.** 1989. A human muscle adenine nucleotide translocator gene has four exons, is located on chromosome 4, and is differentially expressed. *J Biol Chem.* **264**(24):13998-14004.

- Liang, F., K. W. Cunningham, J. F. Harper, and H. Sze.** 1997. ECA1 complements yeast mutants defective in Ca²⁺ pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca²⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:8579-8584.
- Lill, R., Mühlhoff, U.** 2005. Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci.* **30**(3):133-41.
- Lyman, S. K., R. Schekman.** 1997. Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* **88**:85-96.
- Macrae AR, Moorhouse R.**1970. The oxidation of malate by mitochondria isolated from cauliflower buds. *Eur J Biochem* **16**:96-102
- Marechal L, Runeberg-Roos P, Grienenberger JM, Colin J, Weil JH, Lejeune B, Quetier F, Lonsdale DM.** 1987. Homology in the region containing a tRNA(Trp) gene and a (complete or partial) tRNA(Pro) gene in wheat mitochondrial and chloroplast genomes. *Curr Genetics* **12**:91-98.
- Martin, W., M. Müller.** 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**:37-41.
- Martin, W., M. Hoffmeister, C. Rotte, and K. Henze.** 2001. An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol. Chem.* **382**:1521-1539.
- Matlack, K. E., W. Mothes, and T. A. Rapoport.** 1998. Protein translocation: tunnel vision. *Cell* **92**:381-390.
- Mayinger, P., V. A. Bankaitis, and D. I. Meyer.** 1995. Sac1p mediates the adenosine triphosphate transport into yeast endoplasmic reticulum that is required for protein translocation. *J. Cell Biol.* **131**:1377-1386.
- McCartney, A. W., J. M. Dyer, P. K. Dhanoa, P. K. Kim, D. W. Andrews, J. A. McNew, and R. T. Mullen.** 2004. Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini. *Plant J.* **37**:156-173.
- McCully, M. E.** 1999. ROOTS IN SOIL: Unearthing the Complexities of Roots and Their Rhizospheres. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **50**:695-718.
- Meacock, S. L., F. J. Lecomte, S. G. Crawshaw, and S. High.** 2002. Different transmembrane domains associate with distinct endoplasmic reticulum components during membrane integration of a polytopic protein. *Mol. Biol. Cell* **13**:4114-4129.
- Miroux, B. and J. E. Walker.** 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**:289-298.
- Murashige, T., Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* **99**:8-15.
- Murcha, M. W., A. H. Millar, and J. Whelan.** 2005. The N-terminal cleavable extension of plant carrier proteins is responsible for efficient insertion into the inner mitochondrial membrane. *J. Mol. Biol.* **351**:16-25.
- Müller, M.** 1993. The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* **139 (Pt 12)**:2879-2889.
- Napier, J.A., Stobart, A.K., Shewry, P.R.** 1996. The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. *Plant Mol Biol* **31**(5):945-956.
- Nath, S.** 2002. The molecular mechanism of ATP synthesis by F₁F₀-ATP synthase: a scrutiny of the major possibilities. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* **74**:65-98.

- Nelson, D. R., J. E. Lawson, M. Klingenberg, and M. G. Douglas.** 1993. Site-directed mutagenesis of the yeast mitochondrial ADP/ATP translocator. Six arginines and one lysine are essential. *J. Mol. Biol.* **230**:1159-1170.
- Nicchitta, C.V., Blobel, G.** 1989. Nascent secretory chain binding and translocation are distinct processes: Differentiation by chemical alkylation. *J Cell Biol.* **108**:789-795.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and H. G. Von.** 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**:1-6.
- Pagny, S., M. Cabanes-Macheteau, J. W. Gillikin, N. Leborgne-Castel, P. Lerouge, R. S. Boston, L. Faye, and V. Gomord.** 2000. Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention. *Plant Cell* **12**:739-756.
- Palmieri, F.** 1994. Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett.* **346**:48-54.
- Palmieri, L., F. M. Lasorsa, A. Voza, G. Agrimi, G. Fiermonte, M. J. Runswick, J. E. Walker, and F. Palmieri.** 2000. Identification and functions of new transporters in yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**:363-369.
- Palmieri, L., H. Rottensteiner, W. Girzalsky, P. Scarcia, F. Palmieri, and R. Erdmann.** 2001. Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J.* **20**:5049-5059.
- Panzer, S.L., Dreier, E., Hartmann, S., Kostka, S., Rapoport, T.A.** 1995. Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell.* **81**:561-570.
- Pebay-Peyroula, E., C. Hout-Gonzalez, R. Kahn, V. Trezeguet, G. J. Lauquin, and G. Brandolin.** 2003. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* **426**:39-44.
- Petrova, V.Y., Drescher, D., Kujumdzieva, A.V., Schmitt, M.J.** 2004. Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem J.* **380**:393-400.
- Pfaff, E., Heldt, H.W., Klingenberg, M.** 1969. Adenine nucleotide translocation of mitochondria. Kinetics of the adenine nucleotide exchange. *Eur J Biochem* **10(3)**:484-493.
- Philippe, H., Germot, A., Moreira, D.** 2000. The new phylogeny of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **10**:596-601.
- Picault, N., M. Hodges, L. Palmieri, and F. Palmieri.** 2004. The growing family of mitochondrial carriers in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **9**:138-146.
- Pina, C., F. Pinto, J. A. Feijo, and J. D. Becker.** 2005. Gene family analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol* **138**:744-756.
- Powell, S. J., S. M. Medd, M. J. Runswick, and J. E. Walker.** 1989. Two bovine genes for mitochondrial ADP/ATP translocase expressed differences in various tissues. *Biochemistry* **28**:866-873.
- Prohl, C., Pelzer, W., Diekert, K., Kmita, H., Bedekovics, T., Kispal, G., Lill, R.** 2001. The yeast mitochondrial carrier Leu5p and its human homologue Graves' disease protein are required for accumulation of coenzyme A in the matrix. *Mol Cell Biol* **21(4)**:1089-97.
- Raghavendra AS, Padmasree K, Saradadevi K.** 1994. Interdependence of photosynthesis and respiration in plant cells: Interactions between chloroplasts and mitochondria. *Plant Sci* **97**:1-14.
- Reeves, R.E.** 1984. Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. *Adv Parasitol* **23**:105-142.
- Reiser, J., N. Linka, L. Lemke, W. Jeblick, and H. E. Neuhaus.** 2004. Molecular Physiological Analysis of the Two Plastidic ATP/ADP Transporters from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **136(3)**:3524-36.

- Roger AJ, Svard SG, Tovar J, Clark CG, Smith MW, Gillin FD, Sogin ML.** 1998. A mitochondrial-like chaperonin 60ágene in *Giardia lamblia*: Evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of amitochondria. *PNAS* **95**:229.
- Saitou, N. and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
- Schatz, G. and B. Dobberstein.** 1996. Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**:1519-1526.
- Sessions, A., Weigel, D., Yanofsky, M.F.** 1999. The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J* **20**(2):259-63.
- Shen, Y., L. Meunier, and L. M. Hendershot.** 2002. Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J. Biol. Chem.* **277**:15947-15956.
- Shinohara, Y., Kamida, M., Yamazaki, N., Terada, H.** 1993. Isolation and characterization of cDNA clones and a genomic clone encoding rat mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Biochim Biophys Acta* **1152**(1):192-6.
- Shoshan-Barmatz, V., Israelson, A.** 2005. The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: characterization, modulation and possible function. *J Membr Biol* **204**(2):57-66.
- Simons, J.F., Ferro-Novick, S., Rose, M.D., Helenius, A.** 1995. BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. *J Cell Biol* **130**(1):41-49.
- Smith, M., Moon, H., Kunst, L.** 2000. Production of hydroxy fatty acids in the seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Soc* **13**:202-206.
- Somerville, C.R., Ogren, W.L.** 1982. Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity. *Biochem J* **202**:373-380.
- Streeter, J.G., Thompson, J.F.** 1972. In Vivo and In Vitro Studies on gamma-Aminobutyric Acid Metabolism with the Radish Plant (*Raphanus sativus*, L.). *Plant Physiol.* **49**(4):579-584.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff.** 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**:60-89.
- Tambasco-Studart, M., Titiz, O., Raschle, T., Forster, G., Amrhein, N., Fitzpatrick, T.B.** 2005. Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**(38):13687-92.
- Theobald, U., Mailinger, W., Baltés, M., Rizzi, M., Reuss, M.** 1997. In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **55**:305-316.
- Tielens, A.G., Rotte, C., van Hellemond, J.J., Martin, W.** 2002. Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem Sci* **27**:564-572.
- Tjaden, J., C. Schwöppe, T. Möhlmann, P. W. Quick, and H. E. Neuhaus.** 1998. Expression of a plastidic ATP/ADP transporter gene in *Escherichia coli* leads to a functional adenine nucleotide transport system in the bacterial cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* **273**:9630-9636.
- Tjaden, J., H. H. Winkler, C. Schwöppe, L. M. Van Der, T. Möhlmann, and H. E. Neuhaus.** 1999. Two nucleotide transport proteins in *Chlamydia trachomatis*, one for net nucleoside triphosphate uptake and the other for transport of energy. *J. Bacteriol.* **181**:1196-1202.

- Tjaden, J., I. Haferkamp, B. Boxma, A. G. Tielens, M. Huynen, and J. H. Hackstein.** 2004. A divergent ADP/ATP carrier in the hydrogenosomes of *Trichomonas gallinae* argues for an independent origin of these organelles. *Mol. Microbiol.* **51**:1439-1446.
- Tovar, J., Fischer, A., Clark, C.G.** 1999. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* **32**:1013-1021.
- Tovar, J., G. Leon-Avila, L. B. Sanchez, R. Sutak, J. Tachezy, G. M. van der, M. Hernandez, M. Muller, and J. M. Lucocq.** 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**:172-176.
- Traut, T.W.** 1994. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem.* **140**(1):1-22.
- Truenit, E., Sauer, N.** 1995. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta.* **196**(3):564-70.
- van der Giezen, M., K. B. Rechinger, I. Svendsen, R. Durand, R. P. Hirt, M. Fevre, T. M. Embley, and R. A. Prins.** 1997. A mitochondrial-like targeting signal on the hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: support for the hypothesis that hydrogenosomes are modified mitochondria. *Mol. Microbiol.* **23**:11-21.
- van der Giezen, M., Slotboom, D.J., Horner, D.S., Dyal, P.L., Harding, M., Xue, G.P., Embley, T.M., Kunji, E.R.S.** 2002. Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. *EMBO J* **21**:572-579.
- van der Giezen, M., Tovar, J.** 2005. Degenerate mitochondria. *EMBO Rep.* **6**:525-530.
- van der Giezen, M.** 2005. Mitochondrion-derived organelles in protists and fungi. *Int Rev Cytol* **244**:175-225.
- Vicre, M., C. Santaella, S. Blanchet, A. Gateau, and A. Driouich.** 2005. Root border-like cells of *Arabidopsis*. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiol* **138**:998-1008.
- Vigeolas, H., van Dongen, J.T., Waldeck, P., Huhn, D., and Geigenberger, P.** 2003. Lipid storage metabolism is limited by the prevailing low oxygen concentrations within developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiol* **133**:2048-2060.
- Vitale, A., Denecke, J.** 1999. The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* **11**(4):615-28.
- Voncken, F., B. Boxma, J. Tjaden, A. Akhmanova, M. Huynen, F. Verbeek, A. G. Tielens, I. Haferkamp, H. E. Neuhaus, G. Vogels, M. Veenhuis, and J. H. Hackstein.** 2002. Multiple origins of hydrogenosomes: functional and phylogenetic evidence from the ADP/ATP carrier of the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. *Mol. Microbiol.* **44**:1441-1454.
- Walker, J.L., Oliver, D.J.** 1986. Glycine decarboxylase multienzyme complex. *JBC* **261**:2214-2221.
- Wendt, U. K., I. Wenderoth, A. Tegeler, and S. A. Von.** 2000. Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **23**:723-733.
- White, J. A., J. Todd, T. Newman, N. Focks, T. Girke, O. M. de Ilarduya, J. G. Jaworski, J. B. Ohlrogge, and C. Benning.** 2000. A new set of *Arabidopsis* expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiol* **124**:1582-1594.
- Williams, B. A., R. P. Hirt, J. M. Lucocq, and T. M. Embley.** 2002. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* **418**:865-869.

- Winkler, H. H. and A. L. Lehninger.** 1968. The atractyloside-sensitive nucleotide binding site in a membrane preparation from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **243**:3000-3008.
- Winkler, H. H. and H. E. Neuhaus.** 1999. Non-mitochondrial ATP transport. *TIBS* **24**:64-68.
- Wormit, A., M. Traub, M. Flörchinger, H. E. Neuhaus, and T. Möhlmann.** 2004. Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochem. J.* **383**:19-26.
- Xu, C., J. Fan, W. Riekhof, J. E. Froehlich, and C. Benning.** 2003. A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **22**:2370-2379.
- Yarlett, N., Hackstein J.H.P.** 2005. Hydrogenosomes: One organelle, multiple origins. *Bioscience* **55**:657-668.
- Yasuno, R., Wada, H.** 1998. Biosynthesis of lipoic acid in *Arabidopsis*: cloning and characterization of the cDNA for lipoic acid synthase. *Plant Physiol.* **118**(3):935-43.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AAC	ATP/ADP-Transporter Isoform
<i>AtAAC1</i>	ATP/ADP-Transporter 1 <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtAAC2</i>	ATP/ADP-Transporter 2 <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtAAC3</i>	ATP/ADP-Transporter 3 <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtER-ANT1</i>	ATP/ADP-Transporter 4 <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtAAC5</i>	ATP/ADP-Transporter 5 <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AACN.sp.</i>	ATP/ADP-Transporter1 <i>Neocallimastix sp.L2</i>
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
ANT	Adenosin-Nukleotid-Transporter
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
Bidest	doppelt destilliert
Bp	Basenpaar
<i>StBT-1</i>	ATP/ADP-Transporter1 <i>Solanum tuberosum</i>
BKA	Bonkreksäure
BSA	Rinderserumalbumin
CAT	Carboxyatractylat
CCCP	Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon
cDNA	komplementäre DANN
Ci	Curie
CIm	Chloramphenicol
CTP	Cytosintriphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EhANT1</i>	Adenosin-Nukleotid-Transporter1 aus <i>Entamoeba histolytica</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETPS	" <u>E</u> nergy <u>T</u> ransfer <u>P</u> rotein <u>S</u> ignatures", konservierter Sequenzabschnitt
<i>g</i>	Erdbeschleunigung

GFP	<u>Green Fluorescence Protein</u>
GTP	Guanosintriphosphat
HIS	Histidin
His-tag	Histidin-tag
HMP31 <i>T.g.</i>	ATP/ADP-Transporter <i>Trichomonas gallinae</i>
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
LEU	Leucin
MCS	" <u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite"
mRNA	"messenger"-RNA
NAD(P)	Nikotinamiddinukleotid(phosphat)
NEM	N-ethylmaleimid
OD600	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OsER-ANT1	Adeninnukleotidtransporter aus <i>Oryza sativa</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLP	Pyridoxalphosphat
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RV	Restriktionsverdau
<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S.t.</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit (µmol Substrat pro Minute)
u.a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Glc	Uridindiphosphat-Glukose
URA	Uracil
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
z. B.	zum Beispiel

7.2 Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Try	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

7.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Leroch
Vorname: Michaela
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 24.04.1979
Geburtsort: Idar-Oberstein
Eltern: Hans-Jürgen Leroch, Susanne Leroch (geb. Petry)

Schulische Ausbildung

1985-1989: Besuch der Grundschule Herrstein
1989-1998: Besuch des Heinzenwies-Gymnasiums Idar-Oberstein
19.06.1998: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

01.10.1998: Beginn des Erststudiums Biologie auf Diplom an der Technischen Universität Kaiserslautern
01.12.2000: Vordiplom Biologie
28.05.2003: Diplom Biologie in der Arbeitsgruppe Molekulare Pflanzenphysiologie der Technischen Universität Kaiserslautern; Prüfungsfächer: Pflanzenphysiologie, Mikrobiologie, Biochemie.
Thema: „Molekulare und biochemische Analyse mitochondrialer Transportproteine“.
01.06.2003-31.05.2006: Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Fachbereich Biologie an der Technischen Universität Kaiserslautern (Arbeitsgruppe: Molekulare Pflanzenphysiologie)

Weiterführende Ausbildung:

2003-2006: Assoziiertes Mitglied des Graduiertenkollegs:
„Molekulare, physiologische und pharmakologische Analyse von zellulärem Membrantransport“.

7.4 Publikationen

Leroch M., Kirchberger S., Haferkamp I., Wahl M., Neuhaus H.E., Tjaden J. (2005):

“Identification and characterization of a novel plastidic adenine nucleotide uniporter from *Solanum tuberosum*.”; J. Biol. Chem. **280**: 17992-18000

Leroch M., Kirchberger S., Gerhold J., Neuhaus H.E., Tjaden J. (2006):

“AtER-ANT1, a Novel Adenine Nucleotide Transporter in the Endoplasmic Reticulum of *Arabidopsis thaliana*.” (Plant Cell, submitted)

Beiträge zu Buch- und Review-Artikeln:

Buchtitel: “Origins of mitochondria and hydrogenosomes”

Autor: Bill Martin

Artikel: “Hydrogenosomes (and related organelles, either) are not the same”;
Springer Verlag 2006 (in press)

Review: “Mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes-products of evolutionary tinkering”; J. Hackstein, J. Tjaden and M. Huynen (Current Genetics; submitted)

DANKE SCHÖN !

An dieser Stelle würde ich mich gerne bei Prof. Dr. H. Ekkehard Neuhaus für die Bereitstellung und Förderung des interessanten Themas bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Joachim Tjaden für seine sehr gute Betreuung und Förderung in den letzten Jahren. Weiter möchte ich mich für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für seine fairen menschlichen Qualitäten bedanken.

Simon, bei dir möchte ich mich auch ganz herzlich bedanken. Und dabei meine ich nicht nur die Arbeit im Labor, die mit dir Spaß gemacht hat.

Ein weiteres „Danke schön“ für die Hilfsbereitschaft und Kooperation geht an all meine Arbeitskollegen und –Kolleginnen, die mich in den letzten Jahren hier im Labor begleitet haben.

Ein weiterer großer Dank geht an Prof. Dr. Matthias Hahn für die Betreuung meiner Dissertation besonders im Rahmen des Graduiertenkollegs und für das ständige Interesse an meiner Arbeit sowie die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Weiter möchte ich mich gerne bei Dr. Martin Jung (Medizinische Biochemie, Homburg) und Dr. Mohammad Hajirezaei (IPK, Gatersleben) für die tolle Kooperation und entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit bedanken.

Ein spezieller Dank gilt Helge und meinen Eltern, die mich in dieser Zeit stets uneingeschränkt unterstützt und viel Verständnis für mich gezeigt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

Ich versichere weiterhin, dass ich weder an der Technischen Universität Kaiserslautern noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Kaiserslautern, den 13.06.2006

Michaela Leroch