

**Charakterisierung eines Membranproteins aus *Arabidopsis*
mit strukturellen Ähnlichkeiten zu den Transportern der
Natrium-Phosphat1-Familie aus Tieren**

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

DISSERTATION

Vorgelegt von: Lilia Lemke
Kaiserslautern, Januar 2007

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

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>AtANTR</i> -Proteinfamilie aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	1
1.2	Nährstoffversorgung der Pflanzen	3
1.3	Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen Phytopathogene	5
1.3.1	Systemisch erworbene Resistenz	8
1.3.2	Reaktive Sauerstoffspezies	8
1.3.3	Salicylsäure	9
1.3.4	Hormone der pflanzlichen Pathogenabwehr	11
1.4	Programmierter Zelltod	13
1.5	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Chemikalien und Enzyme	15
2.2.	Pflanzenanzucht und pflanzenspezifische Techniken	15
2.2.1	Anzucht auf Erde	16
2.2.2	Sterilanzucht	16
2.2.3	<i>In-planta</i> -Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.2.4	Pflanzeninkubationsexperimente	18
2.2.5	Ernte des Pflanzenmaterials	18
2.2.6	Chlorophyllbestimmung	18
2.2.7	Chlorophyllfluoreszenz	18
2.2.8	Bestimmung der Phosphatgehaltes	19
2.2.9	Bestimmung des Anthocyangehaltes	19
2.2.10	Bestimmung der Aminosäuregehalte	19
2.2.11	Bestimmung der Salizylsäuregehalte	20
2.2.12	Inokulation von <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen mit <i>P. syringae</i>	21
2.2.13	Transformation von Protoplasten von <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
2.2.13.1	Isolierung von Protoplasten aus <i>N. tabacum</i>	21
2.2.13.2	Transformation von <i>N. tabacum</i>	22
2.2.13.3	Transformation von <i>A. thaliana</i>	23
2.2.14	Bestimmung der <i>Pseudomonas</i> Vermehrung in der Pflanze	23
2.2.15	Histochemische Analysen	23

2.2.15.1	Trypan-Blau-Färbung von <i>Arabidopsis</i> -Blattgewebe	23
2.2.15.2	Diaminobenzidin-Färbung von <i>Arabidopsis</i> -Blattgewebe	23
2.2.15.3	Callose-Färbung	24
2.2.15.4	GUS-Färbung	24
2.2.15.5	Phosphatasen-Nachweis	25
2.2.16	Herstellung der Dünnschnitte und mikroskopische Analysen von Wurzelgewebe	25
2.3	Molekularbiologische Methoden	25
2.3.1	Stämme, Vektoren und Konstrukte verwendeter Mikroorganismen	25
2.3.2	Oligonukleotide	27
2.3.3	Anzucht von <i>E. coli</i>	28
2.3.4	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	28
2.3.5	Anzucht von <i>P. pastoris</i>	29
2.3.6	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i>	29
2.3.7	Anzucht von <i>P. syringae</i>	30
2.3.8	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> - und <i>A. tumefaciens</i> -Zellen sowie deren Transformation	30
2.3.9	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen sowie deren Transformation	30
2.3.10	Plasmidpräparation	30
2.3.11	„ <i>In-vitro</i> “-Manipulation von DNA	31
2.3.12	DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.3.13	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.3.14	DNA-Sequenzanalyse	31
2.3.15	Datenverarbeitung von DNA- und Aminosäuresequenzen	31
2.3.16	Isolierung von Gesamt-RNA	32
2.3.17	Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR)	32
2.3.18	Isolierung größerer Mengen Gesamt-RNA aus pflanzlichem Gewebe für „Nothern-Blot“-Analysen	32
2.3.19	„Northern-Blot“-Analysen	33
2.3.20	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	33
2.4	Biochemische Methoden	34
2.4.1	Proteinbestimmung	34
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.4.3	Western-Blot und Antikörpernachweis	35
2.4.4	Aufnahmeversuche an intakten <i>E. coli</i> -, <i>S. cerevisiae</i> - und <i>P. pastoris</i> -Zellen	36
2.4.5	Rekonstitution von Membranproteinen in Liposomen	37
2.4.6	Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität	37

3	Ergebnisse	38
3.1	Aminosäuresequenzenvergleich von <i>AtANTR5</i> mit homologen Proteinen	38
3.2	Phylogenetische Analysen der ANTR-Proteinfamilie aus <i>Oryza sativa</i>	40
3.3	Biochemische Charakterisierung von <i>AtANTR5</i>	42
3.4	Subzelluläre Lokalisierung von <i>AtANTR5</i>	43
3.4.1	Analyse der subzellulären Lokalisierung von <i>AtANTR5</i> mittels GFP-Fusion und transienter Expression in isolierten Protoplasten von <i>N. tabacum</i>	43
3.4.2	Analyse der subzellulären Lokalisierung von <i>AtANTR5</i> mittels GFP-Fusion und transienter Expression in <i>Arabidopsis</i> -Suspensionszellkulturen.....	45
3.5	Herstellung der <i>AtANTR5</i> -c-Myc-Tag-Pflanzen.....	47
3.6	Expressionsanalyse von <i>AtANTR5</i> mittels Promotor-Reporterfusion	49
3.7	Identifizierung und Charakterisierung der <i>antr5</i> -Mutante	50
3.7.1	Molekulare Charakterisierung der <i>antr5</i> -Mutanten	50
3.7.2	Phänotyp der homozygoten <i>antr5</i> -Mutanten	52
3.7.3	Komplementation der <i>antr5</i> -Mutante.....	53
3.8	Herstellung von <i>AtANTR5</i> -„Antisense“-Pflanzen.....	55
3.9	Expression von <i>OsANTR5.1</i> in Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> -Mutanten.....	57
3.9.1	Komplementation der <i>antr5</i> -Insertionsmutanten durch <i>OsANTR5.1</i>	58
3.9.2	Expression von <i>OsANTR5.1</i> in Wildtyppflanzen	59
3.10	Charakterisierung der <i>antr5</i> -Mutanten	61
3.10.1	Analyse der Chlorophyllgehalte und der photosynthetischen Leistung der <i>antr5</i> -Mutanten	61
3.10.2	Analyse der Veränderungen in der Phosphathomöostase der <i>antr5</i> -Mutante	61
3.10.2.1	Analyse der Phosphatgehalte im Blattgewebe der Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> -Mutanten	62
3.10.2.2	Einfluss exogener Phosphatzugabe auf das Wachstum von Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> -Mutanten	62
3.10.2.3	Einfluss von Phosphatlimitierung auf das Wachstum von Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> -Mutanten	63
3.10.2.4	Anthocyangehalt der Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> -Mutanten	63
3.10.2.5	Histochemische Detektion von Phosphatasen unter Phosphatlimitierung bei Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> -Mutanten	64
3.10.2.6	Einfluss von Phosphat auf die Expression von <i>AtANTR5</i>	64
3.10.3	Analyse der Veränderungen im Stickstoffwechsel der <i>antr5</i> -Pflanzen	65
3.10.3.1	Quantifizierung der Aminosäuregehalte bei Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> - Insertionsmutanten	65

3.10.3.2	Quantifizierung der Aminosäuregehalte bei Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> -Insertionsmutanten	66
3.10.3.3	Einfluss von Nitrat und Ammonium auf das Wachstum von Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> -Insertionsmutanten in Sterilkultur.....	69
3.10.3.4	Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität bei Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> - Mutanten	70
3.10.3.5	Einfluss von Nitrat, Ammonium, Glutamat und Glutamin auf die Expression von <i>AtANTR5</i>	71
3.11	Quantifizierung der Resistenz der <i>antr5</i> -Insertionsmutanten.....	72
3.11.1	Detektion phenolischer Metaboliten	72
3.11.2	Visualisierung abgestorbenen Zellen bei <i>antr5</i> -Mutanten	73
3.11.3	Histochemische Detektion von Wasserstoffperoxid-Akkumulation	73
3.11.4	Bestimmung der Salizylsäuregehalte.....	74
3.11.5	Histoschemische Detektion von Callose	75
3.11.6	Expressionsanalysen der abwehrrelevanten Proteinen.....	75
3.11.7	Expressionsanalysen der <i>PR1</i> - und <i>PR2</i> -Gene unter verschiedenen Anzuchtbedingungen.....	77
3.11.8	Pathogenversuche mit <i>Pseudomonas syringae</i>	78
3.11.8.1	Expressionsanalysen von <i>AtANTR5</i> nach Inokulation mit <i>P.syringae</i>	78
3.11.8.2	Entstehung von Blattschäden bei Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> -Mutanten nach Pathogenbehandlung	78
3.11.8.3	Bakterienausbreitung in Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> -Mutanten	80
3.11.8.4	Expressionsanalysen bei Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> -Insertionsmutanten nach Inokulation mit <i>P. syringae</i>	81
3.11.9	Einfluss von <i>NahG</i> -Expression auf die <i>antr5</i> -Insertionsmutante	83
3.11.9.1	Herstellung der <i>antr5+nahG</i> -Pflanzen.....	84
3.11.9.2	Bestimmung der Salizylsäure-Gehalte bei <i>antr5+nahG</i> -Mutanten.....	84
3.11.9.3	Expressionsanalysen der <i>PR1</i> - und <i>PR2</i> -Gene bei <i>antr5+nahG</i> -Mutanten	85
3.11.9.4	Visualisierung abgestorbenen Zellen bei <i>antr5+nahG</i> -Mutanten.....	86
3.11.9.5	Phänotyp der <i>antr5+nahG</i> -Mutanten	86
3.12	Wachstumsanalysen der Wildtyppflanzen und <i>antr5</i> -Mutanten bei Salzstress....	87
3.12.1	Visualisierung abgestorbener Zellen von <i>antr5</i> -Keimlingen bei Salzstress.....	90
4	Diskussion.....	91
4.1	Subzelluläre Lokalisierung von <i>AtANTR5</i> -Protein	91
4.2	Expressionsanalysen von <i>AtANTR5</i>	92
4.3	Phänotyp der <i>antr5</i> -Insertionsmutanten.....	94

4.4	Rolle von <i>AtANTR5</i> in der Phosphathomöostase.....	95
4.5	Rolle von <i>AtANTR5</i> im Stickstoffmetabolismus.....	99
4.6	Rolle von <i>AtANTR5</i> bei Salinität	104
4.7	Rolle von <i>AtANTR5</i> in der Pathogenabwehr und beim programmierten Zelltod	106
4.7.1	Einfluss der hohen Luftfeuchtigkeit auf die <i>antr5</i> -Mutante.....	108
4.7.2	Programmierter Zelltod	109
5	Ausblick.....	113
6	Zusammenfassung	115
7	Literaturverzeichnis.....	116
8	Anhang	135
8.1	„Accesion“-Nummern.....	135
8.2	Aminosäuresequenzanalyse der ANTR5-Proteine aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Oryza sativa</i>	135
8.3	Klonierungsstrategien.....	138
8.3.1	Herstellung der Konstrukte zur heterologen Expression in <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	138
8.3.2	Herstellung des <i>AtANTR5</i> ::GFP-Konstruktes zur subzellulären Lokalisierung von <i>AtANTR5</i>	140
8.3.3	Herstellung des <i>AtANTR5</i> -c-Myc-Tag-Konstruktes zur subzellulären Lokalisierung von <i>AtANTR5</i>	141
8.3.4	Herstellung des <i>AtANTR5</i> -Promotor-GUS-Fusionskonstruktes zur Analyse der gewebespezifischen Expression	143
8.3.5	Herstellung des <i>AtANTR5</i> -Komplementationskonstruktes zur Komplementation von <i>antr5</i> -Insertionsmutanten.....	144
8.3.6	Klonierungsstrategie des <i>AtANTR5</i> -Antisense-Konstruktes zur Herstellung von Dosismutanten.....	144
8.3.4	Abkürzungsverzeichnis.....	146
	Publikationsliste	
	Lebenslauf	
	Danksagung	
	Eidesstattliche Versicherung	

1. Einleitung

Pflanzen sind autotrophe Lebensformen, die die Sonnenenergie durch Photosynthese in chemische Energie umwandeln können. Auf diesem Weg wird die Lichtenergie auch für heterotrophe Organismen biologisch nutzbar. Im Gegensatz zu den meisten Tieren sind Pflanzen an ihren Standort gebunden und dadurch diversen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Auf diese Weise können ungünstige Temperaturen, Trockenheit, UV-Strahlung oder hohe Salzkonzentrationen vielfältige Stresssituationen für die Pflanzen bedeuten. Auch die Nährstoffversorgung ist vom Standort abhängig und stellt für die Pflanzen einen limitierenden Faktor dar. Weiterhin können pathogene Erreger wie Bakterien, Viren, Pilze oder Nematoden verschiedene Krankheiten hervorrufen und das Wachstum der Pflanzen enorm beeinträchtigen. Diese Krankheiten verursachen weltweit hohe Ernteverluste. Trotz intensiver Pflanzenschutzmaßnahmen betragen die Ernteeinbußen bei angebauten Kulturpflanzen 10-20% des potentiellen Ertrags (BAKER *et al.*, 1997), so dass neue Konzepte des Pflanzenschutzes nach wie vor sehr wichtig sind. Die Verbesserung des natürlichen Resistenzpotentials gewinnt als eine der alternativen Strategien neben konventionellen Pflanzenschutzkonzepten immer mehr an Bedeutung. Eine genaue Kenntnis der physiologischen und biochemischen Vorgänge der natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanzen ist Voraussetzung zur Entwicklung solcher Strategien.

1.1 *AtANTR*-Proteinfamilie aus *Arabidopsis thaliana*

Mit Hilfe der Genomanalysen von *Arabidopsis thaliana* konnte eine neuartige Proteinfamilie ANTR (Anion Transporter) identifiziert werden (ROTH *et al.*, 2004). Zu dieser Familie zählen 6 putative Membrantransportproteine, *AtANTR*1-6. Durch die Analysen der vorhergesagten Proteinsequenzen konnten die *AtANTR*-Proteine in die MFS-Familie (major facilitator superfamily) eingruppiert werden. Neben Uniportern zählen auch Symporter und Antiporter zu dieser Familie, wobei die beiden letzteren den chemiosmotischen Ionen-Gradienten über eine Membran nutzen können (GRIFFITH *et al.*, 1992; HENDERSON, 1991; PAO *et al.*, 1998; SAIER, 2000). Innerhalb der MFS-Superfamilie wurden die *AtANTR*-Proteine zu der Gruppe der ACS-Proteinen (Anion:Kation-Symporter) zugeordnet. Obwohl ACS-Permeasen weit verbreitet sind, wurden bislang weder in Archaeobakterien noch in Pflanzen Proteine dieser Familie charakterisiert (PAO *et al.*, 1998). Nach bisherigen Erkenntnissen sind die ANTR-Proteine die ersten pflanzlichen Vertreter, die der ACS-Familie zugeordnet wurden (ROTH *et al.*, 2004).

Die *AtANTR*-Gene wurden anhand ihrer hohen Homologie den nur auf tierische Organismen begrenzte, NaPi-1-Proteinen zugeordnet. In *Xenopus laevis*-Oocyten heterolog exprimiertes NaPi-1-Membranprotein aus der Niere von Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) vermittelt

einen natriumabhängigen Phosphattransport in die Zellen. Der Transporter weist jedoch geringe Affinität zu Phosphat auf und ist nur schwach durch Phosphatzugabe reguliert (WERNER *et al.*, 1998). Ferner zeigte NaPi-1 auch eine Leitfähigkeit gegenüber anorganischen und organischen Anionen wie z. B. Chlorid oder Benzylpenizillin (BUSCH *et al.*, 1996). Trotz eingehender Untersuchungen des NaPi-1-Proteins bleibt die Rolle dieses Proteins *in vivo* ungeklärt.

Im Gegensatz zu NaPi-1 konnte ein Homolog, Sialin (Sialinsäuretransporter) aus *Homo sapiens*, charakterisiert und dessen pathophysiologische Rolle aufgeklärt werden. Sialinsäure (N-Acetyl-Neuraminsäure) ist ein negativ-geladenes Monosaccharid, welches durch Glykosylierung im Golgi-Apparat an Glykoproteine oder Glykolipide gebunden wird. Nach der Degradation der Proteine in Lysosomen werden Aminosäuren, Nukleotide, Lipide und freie Monosaccharide, unter anderem Sialinsäure, über spezifische Transporter ins Cytosol transportiert (PISONI & THOENE, 1991). Verlust des Sialin-Proteins, das den protonengekoppelten Export von Sialinsäure aus den Lysosomen katalysiert, führen zur Vergrößerung der Lysosomen und einem Anstau freier Sialinsäure (RENLUND *et al.*, 1983; MANCINI *et al.*, 1991; VERHEIJEN *et al.*, 1999). Beim Menschen verursachen Mutationen in diesem Transportprotein die neurodegenerativen Salla-Erkrankung oder eine noch schwerere, bereits im Kindesalter tödliche Form einer Sialinsäure-Speicher-Erkrankung (ISSD: *infantile sialic acid storage disorder*, RENLUND *et al.*, 1986).

Neben NaPi-1- und Sialin-Transportern zeigt eine weitere Proteingruppe eine Ähnlichkeit zu *AtANTR*-Membranproteinen, nämlich die drei säugerspezifische vesikuläre Glutamattransporter VGLUT1-3. Die VGLUTs katalysieren einen protonenabhängigen Transport des excitatorischen Neurotransmitters Glutamat in die synaptische Vesikel. Ursprünglich wurde VGLUT1 als natriumabhängiger Phosphattransporter BNPI isoliert (*brain-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter*, NI *et al.*, 1994). Auch VGLUT2 wurde zunächst als DNPI beschrieben (*differentiation-associated brain-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter*, AIHARA *et al.*, 2000). Durch spätere Analysen konnten jedoch diese Membranproteine als vesikuläre Glutamattransporter identifiziert und charakterisiert werden (BELLOCCHIO *et al.*, 2000; TAKAMORI *et al.*, 2000). Anhand der Sequenzhomologie zu VGLUT1 wurde VGLUT3 isoliert (GRAS *et al.*, 2002; SCHÄFER *et al.*, 2002). Alle drei Transporter sind stark homolog (>70% identische Aminosäuren) und weisen ähnliche Substratspezifität, sowie kinetische und pharmakologische Transporteigenschaften auf (TAKAMORI *et al.*, 2002).

Der Anteil der identischen Aminosäuren innerhalb der *AtANTR*-Familie beträgt zwischen 29% und 70%, was auf eine starke Diversität der Proteine untereinander hinweist. Von den *AtANTR*-Proteinen wurden bislang *AtANTR1* und *AtANTR2* näher untersucht. Die Expression von *AtANTR2* konnte in autotrophen und heterotrophen Geweben nachgewiesen werden, wobei das Protein besonders stark in den Blättern, Spross, und im Embryo der sich

entwickelnden Schoten akkumuliert. Dagegen ist die Expression des *AtANTR1*-Gens sehr gering und das korrespondierende Protein kaum detektierbar zu sein (ROTH *et al.*, 2004). Für die biochemische Charakterisierung der Proteine, wurden *AtANTR1* und *AtANTR2* heterolog im Hefe-System überexprimiert. Weder an ganzen Hefe-Zellen noch nach Aufreinigung und Rekonstitution der Proteine im artifiziellen Liposomen-System konnte signifikante Transportaktivität für Phosphat, Chlorid, Glutamat oder Glutamin festgestellt werden (ROTH *et al.*, 2004). Aufgrund der Homologie zu NaPi1-Gruppe wird ein putativer Transport organischer Anionen über Endomembranen postuliert. Für *AtANTR1* und *AtANTR2* konnte mittels GFP-Fusion und Immunodetektion eine chloroplastidäre Lokalisierung nachgewiesen werden, außerdem weisen computergestützte Analysen auch für *AtANTR3*, *AtANTR4* und *AtANTR6* auf putative chloroplastidäre Targetsignale (ROTH *et al.*, 2004).

Bei diesen Analysen tritt die besondere Struktur von *AtANTR5* hervor, da dem Protein die lange N-terminale hydrophile Domäne fehlt, die typisch für andere *AtANTR*-Proteine ist. Ferner fällt auf, dass die codierende Sequenz von *AtANTR5* aus einem einzigen Exon besteht, während andere *AtANTR*-Gene 6 bis 15 Exonen enthalten. Diese Eigenschaften, sowie die geringe Ähnlichkeit zu den anderen *AtANTR*-Proteinen, weisen auf eine besondere Stellung von *AtANTR5* innerhalb der Familie hin, weshalb dieses Protein von besonderem Interesse für diese Arbeit war. Die Rolle der *AtANTR*-Proteine im pflanzlichen Stoffwechsel war bislang ungeklärt. Mit Hilfe von Microarray-Analysen konnte die Induktion von *AtANTR5* durch den Nematoden *Meloidogyne incognita* in der Wurzel nachgewiesen werden (HAMMES *et al.*, 2005). Ferner zeigen computergestützte Analysen von Expressionsdatenbanken, dass die *AtANTR5*-Expression nach Inokulation mit *Pseudomonas syringae* in den Blätter induziert wird (<https://www.genevestigator.ethz.ch>). Diese Hinweise deuten auf eine mögliche Rolle von *AtANTR5* in der Pflanze-Pathogen-Interaktion oder Pathogenabwehr hin. Des Weiteren kann aufgrund der Homologie der *AtANTR*-Proteine zur NaPi-1-Familie eine Beteiligung am Aminosäure-, Stickstoff- oder Phosphatstoffwechsel nicht ausgeschlossen werden.

1.2 Nährstoffversorgung der Pflanzen

Bodenbeschaffenheit und Nährstoffverfügbarkeit sind Faktoren, die für den Aufbau der Biomasse von großer Bedeutung sind und das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen beeinflussen können. Gerade bei intensiv bewirtschafteten Agrarsystemen muss die Nährstoffversorgung als ein ertraglimitierender Faktor berücksichtigt werden. Kohlenstoffdioxid (CO₂) kann von Pflanzen mittels Photosynthese fixiert werden, so dass der Kohlenstoffbedarf zur Synthese von Kohlenhydraten aus der Luft gedeckt wird. Für den Aufbau der Biomasse und das Aufrechterhalten der biologischen Funktionen werden weitere Elemente benötigt, deren Aufnahme über die Wurzel und damit aus dem Boden erfolgt. In den meisten

natürlichen Ökosystemen stellen vor allem Stickstoff und Phosphat wachstumslimitierende Faktoren für die Pflanzen dar (BIELESKI, 1979; RAGHOTAMA, 1999).

Pflanzen enthalten, wie alle anderen Organismen, einen hohen Anteil an Stickstoff, der als Bestandteil in Proteinen, Nukleinsäuren und vielen anderen Makromolekülen vorkommt. Im Boden tritt Stickstoff hauptsächlich in anorganischen Form als Nitrat (NO_3^-) und Ammonium (NH_4^+) auf und seltener in organischen Verbindungen (HAYNES & GOH, 1978; NÄSHOLM *et al.*, 1998). Nitrat ist leicht löslich, während Ammonium meist in nur schwerlöslichen Verbindungen vorliegt. Anorganischer Stickstoff wird als Nitrat oder Ammonium über zahlreiche Transportproteine der Wurzel aufgenommen, wobei der Transport innerhalb der Zelle oder über das Xylem durch die Pflanze einer strikten Regulation unterliegt. Dabei können die Aufnahmesysteme für beide Ionen in HATS (*high affinity transport system*) und LATS (*low affinity transport system*) eingeteilt werden (GLASS *et al.*, 2002). NRT1, NRT2, NRT3 stellen Transportfamilien, die protonengekoppelten Nitratsymport in die Zellen vermitteln (CRAWFORD & FORDE, 2002; FORDE, 2000; OKAMOTO, 2006; ORSEL *et al.*, 2002). Das AtCLCa-Protein (*chloride channel a*) weist hohe Ähnlichkeit zu tierischen Cloridkanälen und katalysiert Nitratimport in die Vakuole (ANGELI *et al.*, 2006). Transporter der Familien AMT1 und AMT2 transportieren Ammonium und fungieren dabei als Uniporter (LUDEWIG *et al.*, 2002; GLASS *et al.*, 2002; VON WIREN *et al.*, 2000; HOWITT & UDVARDI, 2000; WHITE, 1996). AtTIP2;1 und AtTIP2;3 (*tonoplast intrinsic protein*) konten im Tonoplasten lokalisiert werden, wo sie die Ammoniumaufnahme in Form von erleichterten Diffusion in die Vakuole vermitteln (LOQUE *et al.*, 2004). Neben der Aufnahme aus dem Boden kann unter anderem die Symbiose mit N_2 -reduzierenden Bakterien als eine weitere Stickstoffquelle für Pflanze dienen (MYLONA *et al.*, 1995).

Von allen Formen der Stickstoffaufnahme stellt Nitrat für die meisten Pflanzen die wichtigste Stickstoff-Quelle dar, welches zur weiteren Nutzung reduziert werden muss. Dabei wird Nitrat zunächst von der Nitrat-Reduktase zu Nitrit und dann von der Nitrit-Reduktase zu Ammonium reduziert. Das Ammonium aus der Stickstoffassimilation oder der Photorespiration wird durch eine Glutamin-Synthetase auf Glutamat übertragen, wobei Glutamin entsteht. Die Amidgruppe des Glutamins wird anschließend durch die Glutamat-Synthetase auf α -Ketoglutarat übertragen, wodurch zwei Moleküle Glutamat entstehen (LAM *et al.*, 1996; STITT, 1999). Glutamat dient entweder als Ausgangsprodukt oder bei den Transaminase-Reaktionen als Amidgruppen-Donor für die Biosynthese weiterer Aminosäuren. Über das Phloem und das Xylem werden die Aminosäuren in der Pflanze zu den verschiedenen Organen transportiert (COOPER & CLARKSON, 1989). Die Nitratreduktion zu Ammonium benötigt acht Elektronen und ist im pflanzlichen Stoffwechsel nach der CO_2 -Fixierung die Reaktion mit dem höchsten Energieverbrauch (CHAMPIGNY, 1995).

Phosphat ist neben Stickstoff einer der wichtigsten Nährstoffe für das Wachstum und den Stoffwechsel der Pflanzen. Dieses Element ist Bestandteil von Zuckerphosphaten,

Nukleinsäuren und Phospholipiden. Ferner ist Phosphat an den metabolischen Energieübertragungen beteiligt und wirkt als Regulator der Aktivität von Schlüsselenzymen des Primär- und Sekundärstoffwechsels. Es ist ein wichtiges Kontrollsignal von Entwicklungsprozessen der Pflanzen, das die Gentranskription und Signaltransduktion reguliert (RAGHOTAMA, 1999; RAGHOTAMA, 2000; SADKA *et al.*, 1994).

Zahlreiche noch- und niedrig affine Transportproteine katalysieren Phosphataufnahme in die Wurzel und seine Verteilung über Leitelemente in der Pflanze. Nach bisherigen Erkenntnissen bilden pflanzliche Phosphattransporter drei Hauptgruppen, Pht1, Pht2 und Pht3. Plasmamembranständige Pht1-Transporter katalysieren protonenabhängigen Pi-Symport und weisen sowohl hohe als auch niedrige Affinität zum Phosphat (BUCHER *et al.*, 2001; DARAM *et al.*, 1998; MARTINEZ & PERSSON, 1998; RAUCH & BUCHER, 2002; RAE *et al.*, 2003). Dagegen sind die Transporter der Pht2-Familie aus in Chloroplasten lokalisiert und niedrig affin zum Phosphat (DARAM *et al.*, 1999; RAUCH *et al.*, 2004; VERSAW & HARRISON, 2002). Die dritte Gruppe, Pht3, umfasst mitochondriale pflanzlichen Phosphattransporter (TAKABATAKE *et al.*, 1999; RAUCH & BUCHER, 2002). Neben den Pi-Transportern ist auch eine Gruppe der Phosphattranslokatoren in die Phosphathomöostase der Pflanzen involviert. Dazu gehören unter anderem GTP (Glucose-6-Phosphat/Phosphat Translokator), PPT (Phosphoenolpyruvat/Phosphat Translokator) TPT (Triose-Phosphat/Phosphat Translokator), oder XPT (Xylose-5-Phosphat/Phosphat Translokator). Diese plastidäre Proteine katalysieren den Export der photosynthetischer Assimilate oder den Import Vorstufen für biosynthetische Prozesse jeweils im Gegentausch mit anorganischen Phosphat (FLÜGGE, 1999).

Phosphatlimitierung ruft zahlreiche morphologische, physiologische, und molekulare Veränderungen hervor. Unter anderem wird die Bildung von Lateralwurzeln verstärkt, die Pi-Transportkapazität erhöht, Phosphat in den Pflanzenorganen von älteren zugunsten jüngerer Gewebe umverteilt, und zum Erhalten der Pi-Homöostase im Zytoplasma vakuoläres Phosphat mobilisiert (BATES & LYNCH, 1996; RAUSCH & BUCHER, 2002; MIMURA *et al.*, 1996; MIMURA *et al.*, 1995). Ferner werden alternative Stoffwechselwege zur Umgehung phosphat- und adenylat-abhängiger Reaktionen in der Glykolyse und im mitochondrialen Elektronentransport induziert (DUFF *et al.*, 1989; THEODOROU & PLAXTON, 1993). Zur Mobilisierung von Phosphat aus den organischen Verbindungen des Bodens werden zahlreiche unspezifische RNAsen und Phosphatasen exprimiert und in die Rhizosphäre sekretiert (BARIOLA *et al.*, 1994; DUFF *et al.*, 1994). Zwar erfordert die Phosphat-Homöostase keine energieaufwändige Fixierung, sie benötigt jedoch komplexe Aufnahme- und Speichermechanismen.

1.3 Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen Phytopathogene

Expressionsanalysen haben im Vorfeld gezeigt, dass die *AtANTR5*-Expression durch Kontakt zu Pathogenen wie *Meloidogyne incognita* oder *Pseudomonas syringae* induziert wird. Der Einfluss der Phytopathogene auf die *AtANTR5*-Regulation legt die Vermutung

nahe, dass das Protein in die Pflanze-Pathogen-Interaktion involviert sein könnte. Prozesse der Infektion und der Abwehr sind äußerst komplex und erfordern gegenseitige Erkennung, spezifische Regulation der Stoffwechselwege und vielfältige Reaktionen seitens der Pflanzen und der Krankheitserreger.

Trotz zahlreicher Pathogene, von denen die Pflanzen umgeben sind, stellt Krankheitsbefall eher die Ausnahme als die Regel dar (HAMMOND-KOSACK & PARKER, 2003). Zwar können viele saprotrophe Mikroorganismen totes Pflanzenmaterial als eine Nahrungsquelle nutzen, doch nur wenige sind in der Lage, lebende Pflanzen zu befallen. Kann die Pflanze den Krankheitserreger abwehren, handelt es sich um eine inkompatible Interaktion zwischen einem resistenten Wirt und einem avirulenten Pathogen (HEAT, 2000; KAMOUN, 2001; THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Kommt es jedoch zu einer erfolgreichen Besiedelung der Pflanze durch ein Pathogen, so handelt es sich um eine kompatible Interaktion, das heißt der Wirt ist anfällig gegenüber dem virulenten Erreger. Phytopathogene haben verschiedene Strategien entwickelt, um Wirtspflanzen zu besiedeln und sie als Nährstoffquelle zu nutzen. Je nach Lebensart werden biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Parasiten unterschieden (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000). Biotrophe Pathogene, wie *Blumeria graminis* (Gerstenmehltauerreger), fügen den Wirtszellen bei einer Infektion zunächst möglichst wenig Schaden zu. Sie beziehen die Nährstoffe aus stoffwechselaktiven Geweben und sind damit auf lebende Wirtszellen angewiesen (PANSTRUGA & SCHULZE-LEFERT, 2002). Hemibiotrophe Krankheitserreger, wie *Magnaporthe grisea*, leben zunächst biotroph im Wirtsgewebe, treten aber anschließend in die nekrotrophe Phase ein, in der sie umliegende Zellen abtöten. *Botrytis cinerea* sowie andere Vertreter der nekrotrophen Phytopathogene können sich von abgestorbenen Zellen der Wirtspflanzen ernähren. Sie produzieren Toxine und zellwandabbauende Enzyme, wodurch die Zellen der befallenen Pflanzen absterben (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000; WALTON, 1996).

Phytopathogene werden von der Pflanze mit Hilfe von Elicitoren erkannt. Diese werden bei Befall freigesetzt und durch unterschiedliche pflanzliche Rezeptoren perzipiert (EBEL & COSIO, 1994; NÜRNBERGER & BRUNNER 2002). Zu exogenen Elicitoren zählen pathogenspezifische Moleküle wie komplexe Polysaccharide der pilzlichen Zellwände (Chitinfragmente), Polypeptide oder Lipide (SHARP *et al.*, 1984; COHEN *et al.*, 1991). Die Erkennung solcher Moleküle durch pflanzliche Rezeptoren löst eine MAP-Kinase-Kaskade aus (mitogen activated protein), die eine schnelle Phosphorylierung von spezifischen Kern-, Cytosol- oder Membranproteine katalysiert (ASAI *et al.*, 2002; DIETRICH *et al.*, 1990; FELIX *et al.*, 2001; JONAK *et al.*, 2002; PECK, 2003). Als endogene Elicitoren fungieren pflanzeneigene Substanzen, wie z. B. Zellwandbestandteile, die beim Abbau der Zellwand durch hydrolytische Enzyme des Pathogens entstehen (RYAN & FARMER, 1991).

Eine wirtsspezifische Erkennung basiert auf einer Interaktion eines pflanzlichen R-Proteins mit einem korrespondierenden, pathogenen Avirulenz-Protein (DESLANDES *et al.*, 2003; JIA

et al., 2000). Durch diese Interaktion werden Signaltransduktionskaskaden aktiviert, die eine schnelle und effiziente Bekämpfung des Erregers erlaubt (INNES *et al.*, 1993; KUNKEL *et al.*, 1993). Solche spezifische Pflanze-Pathogen-Interaktion wird als „gene for gene resistance“ bezeichnet, da die beteiligte Wirtspflanze resistent gegenüber dem Erreger ist (FLOR 1971). Pflanzen sowie Tiere haben im Laufe der Evolution Strategien zur Pathogenabwehr entwickelt. Säugetiere besitzen ein lymphatisches Immunsystem, das bei Erkrankung schnell hochspezialisierte Zellen ausschüttet, die für Abwehrreaktionen gegen Pathogene verantwortlich sind (NÜRNBERGER *et al.*, 2004; WALBOT, 1985). Pflanzen verfügen jedoch nicht über ein derartiges System der Immunabwehr, sondern dort besitzt jede Zelle die Fähigkeit auf Infektionen zu reagieren und Abwehrreaktionen zu aktivieren (EBEL & MITHÖFER, 1998). Bei einer Infektion stehen einer Pflanze zwei unterschiedliche Abwehrmechanismen zur Verfügung: präformierte oder induzierte Abwehr. Zu präformierten Abwehr zählen strukturelle oder chemische Barrieren, die bereits vor Pathogenbefall vorhanden sind und einen primären Schutz gegen das Eindringen der Pathogene bieten. So stellt Kutin, ein unlösliches Polyester der Hydroxyfettsäuren, als Hauptbestandteil der Kutikula epidermaler Zellen einen passiven Schutzmechanismus dar. Weitere Substanzen wie Lignin oder Suberin (Phenylpropanoid-Polymere) werden in die Zellwände eingelagert und dienen zur Verstärkung. Je nach Pflanzenart können auch andere Substanzen der Zellwandverstärkung dienen, wie z. B. Kieselsäure in den Zellwänden von Reispflanzen, die als präformierte Abwehr vor allem gegen *Magnaporthe grisea* wirksam ist (SUZUKI, 1965). Als chemische Barrieren gelten zahlreiche Substanzen mit antimikrobieller Wirkung. Manche toxische Metabolite des Sekundärstoffwechsels wie Alkaloide, Phenole, Saponine, Senföle, aber auch komplexere Moleküle wie Glukanasen oder Chitinasen können das Eindringen und Wachstum der Pathogene hemmen (AGRIOS, 2005; HEATH 2000; OSBOURN, 1996). Bei induzierten Abwehrmechanismen handelt es sich um mechanische und biochemische Komponenten, die in der Pflanze erst nach einer Infektion aktiviert werden (SCHEEL, 1998; YANG *et al.*, 1997). Zu der schnellsten detektierbaren Reaktion nach einem Kontakt mit einem Pathogen gehören Ionenströme über die Plasmamembran. Innerhalb kürzester Zeit strömt Kalzium die Zelle hinein (ZIMMERMANN *et al.*, 1997). Dabei sind GTP-bindende Proteine sowie Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen am Transfer der Signale und am Aktivieren der Kalziumkanäle beteiligt (KUROSAKI *et al.*, 2001; SCHULTHEISS *et al.*, 2002). Mit dem Kalzium-Einstrom geht ein Protonen-Einstrom sowie ein ausgleichender Chlorid- und Kalium-Ausstrom aus der Zelle einher (HAHLBROCK *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 1997). Diese Verlagerung von Ionen führt zur Depolarisation der Plasmamembran, zu einer Ansäuerung des Zytoplasma und Alkalisierung des Apoplasma (FELIX *et al.*, 1993; ROOS *et al.*, 1998). Kalzium ist ein wichtiger „second messenger“, das als Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli wie Trocken-, Licht-, Temperatur-, oxidativem Stress oder Berührung agiert (REDDY, 2001). Bei einem Pathogenbefall dient Kalzium als Signalmolekül, das nach der Perzeption von

Elicitoren eine Reihe von Reaktionen auslöst (GRANT *et al.*, 2000). Den Ionenflüssen folgen nun zahlreiche Reaktionen wie die Aktivierung von MAPK- und Phytooxylipin-Kaskaden, hypersensitive Reaktion, Bildung von Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoffspezies, Zellwandmodifikationen sowie Akkumulation von Phytoalexinen und PR-Proteinen (ASAI *et al.*, 2002; BLEE, 2002). Zusätzlich zur vorhandenen Lignifizierung stabilisieren polymerisierte und miteinander vernetzte Zellwandeinlagerungen, wie Callose, Lignin oder hydroxyprolinreiche Glykoproteine, die Zellwände direkt am Penetrationsort der Pilzhyphen. Sie wirken der mechanischen Penetration oder hydrolytischen Enzymaktivität des Pathogens entgegen und erschweren dessen Eindringen (BOWLES, 1990; JACOBS *et al.*, 2003; HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000; KAUSS *et al.*, 1989). Durch die Synthese toxischer Verbindungen und antimikrobieller Proteine werden Pathogene aktiv bekämpft. Die Regulation der Abwehrreaktionen werden über zentrale Signalmoleküle gesteuert, die jeweils salizylsäure-, jasmonsäure- oder ethylenabhängige Antworten aktivieren.

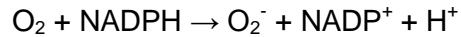
1.3.1 Systemisch erworbene Resistenz

Im Rahmen der induzierten Abwehrmechanismen nach einer Pathogenattacke kann es zur Etablierung einer besonderen Form der Resistenz, der systemisch erworbenen Resistenz (SAR: systemic acquired resistance) kommen. Beim Befall eines Blattes durch einen Krankheitserreger werden auch andere Teile der Pflanze gegenüber weiteren Infektionen von verschiedenen Erregern resistent (ROSS, 1961; RYALS *et al.*, 1996). Bei einer Zweitinfektion werden die Abwehrmechanismen schneller und stärker induziert, so dass durch die rechtzeitige Synthese von Proteinen und toxischer Substanzen die Krankheitserreger direkt gehemmt werden (CONRATH & KAUSS, 2000; HUNT & RYALS, 1996). Das Auftreten von SAR ist mit der Expression verschiedener Gene verbunden, deren Produkte entsprechend als SAR-Proteine bezeichnet werden und als Marker der SAR dienen. Die meisten davon gehören zur Gruppe der PR-Proteine (PR: pathogenesis related, WARD *et al.*, 1991). Die Funktion einiger PR-Proteine wurde bereits aufgeklärt, wie zum Beispiel PR-2 (β -1,3 Glukanase), PR-3 (Chitinase) und PR-13 (Thionin) die antifungale Wirkung zeigen. Peroxidasen (PR-9) sind in die Regulation oxidativer Prozesse und die Vernetzung der Zellwandmoleküle involviert (UKNES *et al.*, 1992).

1.3.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Durch Perzeption der Elicitoren, den daraus folgenden Anstieg der Kalziumkonzentrationen im Cytosol, sowie einer Depolarisation der Plasmamembran wird die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS: reaktive oxigen species) induziert. Zu ROS zählen unter anderem Superoxidanionen (O_2^-), das Hydroxylradikale ($\cdot OH$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (LAMB & DIXON, 1997). Dieser Prozess wird als „oxidative burst“ bezeichnet und entspricht dem Begriff „respiratory burst“ in tierischen Zellen, bei dem neutrophile Granulozyten ROS für die

antimikrobielle Abwehr produzieren (BABIOR, 1999; MOREL *et al.*, 1991). Bei Tieren und Pflanzen bewerkstelligt eine plasmamembranständige NADPH-Oxidase die Entstehung der Superoxidanionen unter Reduktion des atmosphärischen Sauerstoffs und NADPH-Verbrauch (LAMB & DIXON, 1997), gemäß folgender Reaktion:



Anschließend entsteht durch Dismutation aus Superoxidanionen Wasserstoffperoxid. Neben NADPH-Oxidasen existieren weitere Enzyme, die H_2O_2 generieren können. So werden verschiedene Gene von Peroxidasen, Oxalat-Oxidasen oder der Enzyme des oxidativen Metabolismus wie Lipoxigenasen bei Pathogenbefall induziert (DOEHLERT *et al.*, 1993; HURKMAN *et al.*, 1996; LAMB & DIXON, 1997; LANE *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1995). Zwar ist die transkriptionsabhängige Induktion solcher Enzyme zu langsam, um zur ersten Phase des „oxidative burst“ beitragen zu können, doch sind sie möglicherweise am Aufrechterhalten der hohen H_2O_2 -Konzentrationen beteiligt.

Für reaktive Sauerstoffspezies werden verschiedene Funktionen bei der Pathogenabwehr diskutiert. Wasserstoffperoxid besitzt eine direkte antimikrobielle Wirkung auf Mikroorganismen und ist am Vernetzen der Glykoproteine und Polysaccharide der Zellwand beteiligt (BRESSION *et al.*, 1994; IKEGAVA *et al.*, 1996). Darüber hinaus spielen ROS eine zentrale Rolle in der Induktion der hypersensitiven Reaktion im infizierten Gewebe. Bereits wenigen Stunden nach Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies sterben pflanzliche Zellen am Infektionsort durch programmierten Zelltod ab (LAM *et al.*, 2001). Da ROS am Auslösen von Signaltransduktionswegen, der hypersensitiven Reaktion sowie der Induktion zahlreicher Enzyme beteiligt sind, wird ihre Rolle als „second messenger“ diskutiert, doch ihre genaue Funktion bleibt noch unklar (WOJTASZEK, 1997; LEVINE *et al.*, 1994).

In Pflanzen werden ROS als Antwort auf abiotischen und biotischen Stress wie hohe Lichtintensität oder UV-Licht, Ozon, extreme Temperaturen und Pathogene generiert (DAT *et al.*, 2000). Exogene H_2O_2 -Applikation kann bei Pflanzen eine Toleranz nicht nur gegen Pathogene sondern auch gegen Kälte induzieren (VAN CAMP *et al.*, 1998).

1.3.3 Salizylsäure

Im Zusammenhang mit SAR und HR wird Salizylsäure als ein Signalmolekül diskutiert, welches in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielt (MURPHY *et al.*, 1999; GAFFNEY *et al.*, 1993; SHAH, 2003). Salizylsäure (SA: *salicylic acid*) ist ein endogenes Signalmolekül das bei Pflanzen eine Vielzahl von Reaktionen auslösen kann. Früher wurde Salizylsäure aus Rinde verschiedener Weidearten (*Salix spec.*) gewonnen, was sich bis heute im Namen des Moleküls widerspiegelt. Im Gegensatz zu Menschen oder Tieren sind Pflanzen in der Lage Salizylsäure zu synthetisieren. Eine Übersicht der möglichen SA-Biosynthesewege ist

in der Abbildung 1.1 dargestellt, Ausgangssubstrat ist dabei das im Shikimatweg gebildete Chorismat.

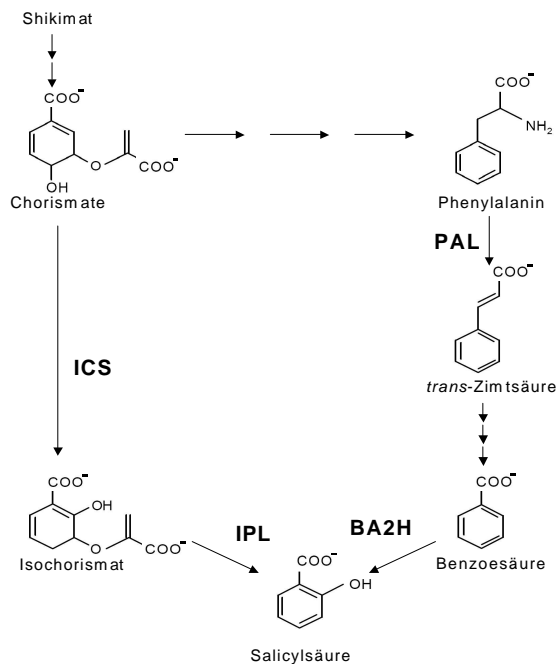


Abbildung 1.1: Mögliche Biosynthesewege der Salizylsäure. PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, BA2H: Benzoessäure-2-Hydroxylase, ICS: Isochorismat-Synthase, IPL: Isochorismat-Pyruvat-Lyase (nach SHAH, 2003).

Phenylalanin wird in mehreren Schritten aus Chorimat im Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL)-abhängigen Syntheseweg gebildet. Das PAL-Enzym setzt Phenylalanin zu *trans*-Zimtsäure um, das über weitere Zwischenstufen zu Benzoesäure konvertiert wird. Schließlich katalysiert Benzoessäure-2-Hydroxylase (BA2H) die Entstehung von SA aus Benzoesäure (HAHLBROCK & SCHEEL, 1989; RIBNICKY *et al.*, 1998). In manchen Bakterien, wie z. B. *Pseudomonas aeruginosa*, wird SA über Isochorismat-Synthase (ICS) und Isochorismat-Pyruvat-Lyase (IPL) gebildet (SERINO *et al.*, 1995). Auch in *A. thaliana* wurde ein analoger SA-Syntheseweg nachgewiesen, bei dem ICS Chorismat zu Isochorismat umsetzt, und IPL die Bildung von SA aus Isochorismat katalysiert. Die Überexpression der bakteriellen ICS- und IPL-Gene in *Arabidopsis*-Pflanzen führt zu erhöhten SA-Akkumulation, konstitutiver Expression der PR-Proteine, sowie einer erhöhten Resistenz (MAUCH *et al.*, 2001).

In den Pflanzen liegt SA meist in konjugierter Form vor. Salizylsäure-O- β -glucosid, Methyl-Salizylsäure, Methyl-Salizylsäure-O- β -glucosid und Salizylsäure-Glucoseester stellen die wichtigsten Formen der SA-Konjugate dar (DEAN *et al.*, 2005; LEE & RASKIN, 1998). Weiter kann Salizylsäure zu Gentisinsäure (GA: *g*entisic *a*cid) umgesetzt werden. Gentisinsäure scheint neben Salizylsäure eine Rolle in der Aktivierung der Abwehrreaktionen zu spielen. Exogene GA-Applikation induziert bei Tomate und Gurke die Expression abwehrrelevanter

Proteine (BELLÉS *et al.*, 1999). Bei diesen Pflanzen führt Pathogenbefall zur Akkumulation der Gentisinsäure in infizierten und distalen Geweben (BELLÉS *et al.*, 2006; FAYOS *et al.*, 2006). Es gibt viele Hinweise darauf, dass Salizylsäure in der SAR eine zentrale Rolle spielt. Noch bevor SA als endogene Komponente der pflanzlichen Abwehr identifiziert wurde, wurde erhöhte Resistenz gegen das Tabakmosaikvirus nach Behandlung mit Salizylsäure oder Aspirin beschrieben (ANTONIW & WHITE, 1980; WHITE, 1979). Nach einer Pathogeninfektion akkumuliert SA hundertfach höher in infizierten Gurken- oder Tabakpflanzen (MÉTRAUX *et al.*, 1990; RASMUSSEN *et al.*, 1991). Des Weiteren wurde SA im Phloemsaft detektiert, so dass dies über weite Strecken innerhalb der Pflanze transportiert werden und in distalen Geweben als ein Signalmolekül fungieren kann (MALAMY *et al.*, 1990; MÖLDERS *et al.*, 1996). Exogene SA-Zugabe führt zur Akkumulation von ROS, Expression der SAR-Gene sowie zur Etablierung der SAR (KAWANO & MUTO, 2000; WARD *et al.*, 1991; WHITE, 1979). Im Gegensatz dazu sind Pflanzen, die keine SA akkumulieren können, nicht in der Lage SAR zu entwickeln. Eine bakterielle Salizylat-Hydroxylase, kodiert durch *nahG*-Gen, setzt Salizylsäure zu Catechol um. Wird dieses Gen in Pflanzen überexprimiert, kann in solchen transgenen *nahG*-Pflanzen keine SAR-Antwort induziert werden, weder durch virale, noch durch bakterielle oder pilzliche Pathogene (GAFFNEY *et al.*, 1993; FRIEDRICH *et al.*, 1995). Viele weitere Mutanten, wie *sid1*, *sid2*, *eds5-1* (*enhanced disease susceptibility*), können keine bzw. nur sehr geringe SA-Mengen akkumulieren und sind ebenfalls defizient in ihrer SAR-Antwort (GLAZERBROOK *et al.*, 1996; NAWRATH *et al.*, 2002). Allerdings scheint SA nicht das alleinige mobile Signal zu sein, welches SAR in distalen Blättern auslöst. Wird ein inokuliertes Gurkenblatt nach Infektion, jedoch bevor SA akkumuliert, entfernt, so kann die SAR in distalen Geweben trotzdem etabliert werden (RASMUSSEN *et al.*, 1991; DURNER *et al.*, 1997).

1.3.4 Hormone der pflanzlichen Pathogenabwehr

Ethylen (C₂H₄) ist ein pflanzliches Hormon, das verschiedene biologische Prozesse wie Samenkeimung, Zellelongation, Fruchtreifung oder Seneszenz reguliert (JOHNSON & ECKER, 1998; KIEBER, 1997). Außerdem kommt es zur Induktion der Ethylensynthese durch viele biotische und abiotische Faktoren wie Verwundung, Pathogenbefall, Wasserstress oder Lichtstress (MORGAN & DREW, 1997). Die Ethylenbiosynthese erfolgt ausgehend von S-Adenosylmethionin das in mehreren Schritten zu Ethylen konvertiert wird (JOHNSON & ECKER, 1998). Bei einer Pathogeninfektion kann Ethylen die Expression verschiedener PR-Proteine und Peroxidasen induzieren (KIEBER, 1997). Ferner ist Ethylen am Signaltransduktionsweg der induzierten systemischen Resistenz (ISR) beteiligt. ISR entsteht bei Kolonisation von nichtpathogenen Rhizobakterien an Pflanzenwurzeln und ist im Gegensatz zur SAR salizylsäureunabhängig (TON *et al.*, 2001).

Jasmonsäure (JA: *jasmonic acid*) ist ein weitere pflanzliche Substanz, die sowohl an pathogeninduzierten Antworten wie Insektenfraß, mechanische Verwundung als auch an

Fruchtreife, Seneszenz, Knollen- und Pollenbildung beteiligt ist (CREELMAN & MULLET, 1997; PENNINCKX *et al.*, 1996). Jasmonsäure, ein C12-Fettsäurederivat, ist in den Oxylin-Stoffwechsel der Pflanzen eingebettet und wird ausgehend von Linolensäure gebildet (VICK & ZIMMERMAN; 1984). Infektion mit Pathogenen führt zu JA-Akkumulation in Pflanzen. So wurde bei *Arabidopsis thaliana* nach Infektion mit *Alternaria brassicicola* eine stark erhöhte JA-Menge in inokulierten und distalen Geweben detektiert (PENNINCKX *et al.*, 1996). Durch JA wird die Expression abwehrrelevanter Gene induziert, wobei sich die Expressionsmuster eindeutig von denen der SA-abhängigen Expression unterscheiden. PDF1.2 ist ein antifungales Peptid, das zur Familie pflanzlicher Defensine gehört und durch exogene Zugabe von JA, jedoch nicht durch SA, induziert wird (PENNINCKX *et al.*, 1996; THOMMA *et al.*, 1998). Ferner weist JA antifungale Eigenschaften auf und kann Entwicklungsprozesse in pathogenen Pilzen inhibieren (SCHWEITZER *et al.*, 1993).

Die Wirkung der beiden Hormone, SA und JA, deutet auf eine antagonistische Wechselbeziehung der Signalwege hin (DOARES *et al.*, 1995; PENA-CORTES *et al.*, 1993; SCHENK *et al.*, 2000). Salizylsäure und ihre funktionellen Analoga hemmen die Jasmonsäure-induzierte Genexpression (PIETERSE & VAN LOON, 1999). Aber auch synergistische Effekte dieser Signalmoleküle wurden beobachtet, so führt gleichzeitigen die Behandlung mit JA und SA zu einer höheren PR1-Expression als mit SA alleine (XU *et al.*, 1994). Diese komplementäre Wirkung von SA und JA scheint eine Feinabstimmung der Genexpression gegen unterschiedliche Pathogene zu ermöglichen, so dass die beste Kombination von Abwehrkomponenten an die jeweils spezifische Situation angepasst wird (BECKER & SPOEL, 2006).

Stickstoffmonoxid (NO) ist als ein intra- und extrazelluläres Signalmolekül mit zahlreichen Funktionen bei Säugern bekannt, darunter die Beteiligung an der Immunabwehr, wobei ROS und NO beim Abtöten der Tumorzellen oder Bakterien durch Makrophagen zusammenwirken (NATHAN, 1995). Auch bei Pflanzen ist NO in viele biologische Prozessen wie Pathogenabwehr, Entwicklung, Schließen der Stomata oder Antwort auf abiotischen Stress involviert (LAMOTTE *et al.*, 2005). In Pflanzen wurden mittlerweile mehrere Mechanismen für NO-Entstehung aufgeklärt. AtNOS1 („nitric oxid synthase“) ist ein Homolog zu säugerspezifischen NOS und katalysiert eine NADH-abhängige NO-Synthese, bei der Arginin zu Citrullin umgesetzt wird (GUO *et al.*, 2003). Außerdem kann die Nitratreduktase, ein Enzym der Stickstoffassimilation, ebenfalls NO in einer Nebenreaktion produzieren (ROCKEL *et al.*, 2002). Eine nicht enzymatische Reduktion von NO^{2-} zu NO wurde im sauren Milieu des Apoplasten von *Hordeum vulgare* nachgewiesen (BETHKE *et al.*, 2004). Wie in der Immunantwort der Säuger wird auch in Pflanzen NO eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr zugeschrieben. So verursacht die Inokulation von Soja-Zellkulturen mit *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* eine verstärkte NO-Produktion. Ferner wurde NO als „second messenger“ während der hypersensitiven Reaktion identifiziert. Dabei weist die

Zusammenwirkung von ROS und NO sowohl antagonistische als auch syneristische Eigenschaften während des induzierten Zelltodes auf (DELLEDONNE *et al.*, 1998).

1.4 Programmierter Zelltod

Programmierter Zelltod (PCD: *programmed cell death*) gehört zur Entwicklung und Differenzierung der Organismen sowie zu zahlreichen Verteidigungsmechanismen. PCD stellt einen physiologischen Prozess dar, dessen Aktivierung genomkodierte, biochemische Abläufe erfordert und zur selektiven Eliminierung (z. B. durch Apoptose) der Zellen führt (DANON *et al.*, 2000; ELLIS *et al.*, 1991; VAUX 1999). Diese Form des Zelltodes ist aktiv und unterscheidet sich von Nekrosen, die nicht von der Zelle induziert oder kontrolliert werden.

Bei Säugern wird PCD während der Entwicklung der Strukturen durch eliminieren unerwünschter Zellen, Kontrolle der Zellzahl oder Differenzierung des Nervensystems ausgelöst (JACOBSON *et al.*, 1997; OPPENHEIM, 1991). Darüber hinaus spielt Zelltod eine Rolle in autoimmunen, neurodegenerativen, Infektions- oder Krebserkrankungen (FISCHER, 1994; SAVILL, 1994).

In Pflanzen wurde PCD in Aleuronzellen, Wurzelspitzen, bei Xylembildung, Seneszenz, Hypoxie oder der Entwicklung von Pollen beobachtet. Vor allem in der Pathogenabwehr hat PCD in Form der hypersensitiven Reaktion eine große Bedeutung (DOORN & WOLTERIN 2005; GILCHRIST, 1998; GREENBERG, 1997; PENNEL & LAMB, 1997).

Die hypersensitive Reaktion (HR: *hypersensitive response*) ist eine lokale Abwehrreaktion der Pflanzen gegen Phytopathogene. Durch die HR wird das Wachstum und die Ausbreitung der Pathogene eingedämmt. Dabei sterben an der Infektionsstelle die Zellen ab, so dass Gewebeschädigungen durch mikroskopische oder makroskopische Läsionen sichtbar werden. Die sterbenden Zellen produzieren große Mengen an Phytoalexinen, PR-Proteinen und Phenylpropanoiden (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996; KOGA *et al.*, 1990). Durch das Absterben des Pflanzengewebes wird insbesondere den biotrophen Pathogenen, die auf lebende Zellen angewiesen sind, Nahrung und Wasser entzogen. Dadurch wird die Infektion lokal begrenzt und das Ausbreiten der Krankheitserreger verhindert (GREENBERG, 1997). Den nekrotrophen Pathogenen kann dieser Mechanismus zugute kommen, da sie sich von totem Gewebe ernähren. Jedoch werden beim Absterben der Zellen toxische Substanzen aus der Vakuole freigesetzt, die eine hemmende Wirkung auch auf nekrotrophe Mikroorganismen haben. Bei HR handelt es sich um einen aktiven Vorgang, der die Biosyntheseleistung der Pflanze erfordert. Damit ähnelt der Mechanismus der HR dem apoptotischen Zelltod bei tierischen Organismen, der mit gleichen Apoptosemarkern einhergeht. Im Verlauf der HR kommt es zur Induktion bestimmter Gene, Elektrolytverlust, Degradation von DNA und Proteinen, Dekompartimentierung der Zelle und Membranschädigungen (DANON *et al.*, 2000; PENNEL & LAMB, 1997). Ebenfalls können

tierische Apoptoseinhibitoren die Induktion und Ausprägung der pflanzlichen HR hemmen (MATSUMURA *et al.*, 2003; MITSUHARA *et al.*, 1999).

Es gibt eine Vielzahl von Mutanten, die lokal begrenzte, abgestorbene Gewebereiche aufweisen. Solche Läsionen sind HR-ähnlich und treten spontan sowie in Abwesenheit von Pathogenen auf, so dass die betroffenen Pflanzen als „lesion-mimic“- oder „mimic-disease“-Mutanten bezeichnet werden. Die Gründe für die Läsionentstehung liegen oft in Mutationen der Gene, die in die Kontrolle von PCD oder Pathogenabwehr involviert sind. Ebenso verursacht die Überexpression von Pathogenen-eigenen Genen, Signalkaskaden- oder Killer-Gene in den transgenen Pflanzen Bildung von Läsionen. Ferner können Mutationen Störungen im Gesamtmetabolismus hervorrufen und dadurch ebenfalls den Zelltod auslösen (MITTLER & RIZHSKY, 2000). Manche Mutanten exprimieren molekulare und biochemische Marker der Pathogenabwehr. Die Akkumulation von PR-Proteinen, ROS und Salizylsäure, Verstärkung der Zellwand durch Callose und Synthese von Phytoalexinen führt oft zur erhöhten Resistenz dieser Mutanten gegenüber den Phytopathogenen (DIETRICH *et al.*, 1994; MITTLER & RIZHSKY, 2000; PETERSEN *et al.*, 2000; STROKES *et al.*, 2002). Die Aktivierung der Abwehrmechanismen in Abwesenheit von Pathogenen bestätigt die Hypothese, dass der Zelltod dieser Mutanten vergleichbar mit PCD während der HR beim Pathogenbefall ist.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll die physiologische Bedeutung eines der Proteine der *AtANTR*-Familie, *AtANTR5*, untersucht werden. Dabei soll die subzelluläre Lokalisierung dieses Membranproteins aufgeklärt werden. Des Weiteren sollen gewebespezifische und entwicklungsabhängige Expressionanalysen des *AtANTR5*-Gens durchgeführt werden.

Um die Einbindung von *AtANTR5* in den Stoffwechsel zu untersuchen, wurden homozygote *AtANTR5*-„knock out“-Linien umfassend charakterisiert. Dabei soll die Resistenz- bzw. das Abwehrverhalten der „knock out“-Linien sowie die Pflanze-Pathogen-Interaktion eingehend analysiert werden. Ferner wurde die Rolle von *AtANTR5* im Bezug auf Phosphathomöostase sowie Stickstoffstoffwechsel näher betrachtet. Außerdem sollen weitere Homologe zur *AtANTR*-Familie in der monokotylen Pflanze *Oryza sativa* identifiziert und ihre Verwandtschaft überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien und Enzyme wurden von den Firmen, AppliChem (Darmstadt), Duchefa (Harlem, Niederlande), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), MWG Biotech, (Ebersberg), New England Biolabs (Schwalbach), Promega (Mannheim), Roche (Penzberg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Schleicher & Schuell (Dassel), Sigma (Deisenhofen) und Stratagene (Heidelberg) in höchsten Reinheitsgrad bezogen.

2.2 Pflanzenanzucht und pflanzenspezifische Techniken

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an Wildtyp- und transgenen Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. der Varietät Columbia durchgeführt. Die Pflanzenanzucht erfolgte sowohl auf Erde in einer Klimakammer als auch in Sterilkultur in einem Sterilkultur-Anzuchtsraum.

Tabelle 2.1 Verwendete Pflanzen.

Pflanze	Resistenz	Beschreibung
Columbia	-	<i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp
<i>antr5</i>	Basta ^r	<i>AtANTR5</i> -„knock out“-Linie, Garlic_809_B01.1aLb3Fa, T-DNA im Exon von <i>AtANTR5</i>
<i>antr5+AtANTR5</i>	Basta ^r Kan ^r	<i>AtANTR5</i> -„knock out“-Linie, Garlic_809_B01.1aLb3Fa, T-DNA im Exon von <i>AtANTR5</i> , enthält zusätzlich <i>AtANTR5</i> -Genkopie, endogener Promotor und Terminator
<i>AtANTR5-c-Myc</i>	Kan ^r	Expression von <i>AtANTR5</i> fusioniert mit c-Myc-Tag, CaMV-35S-Promotor, OCS-Terminator
<i>AtANTR5-Antisense</i>	Kan ^r	Verminderte <i>AtANTR5</i> -Aktivität über „Antisense“-Technik
<i>OsANTR5.1-His</i>	Kan ^r	Expression von <i>OsANTR5.1</i> fusioniert mit His-Tag, CaMV-35S-Promotor, OCS-Terminator
<i>antr5+OsANTR5.1-His</i>	Basta ^r Kan ^r	<i>AtANTR5</i> -„knock out“-Linie, Garlic_809_B01.1aLb3Fa, T-DNA im Exon von <i>AtANTR5</i> , Überexpression von <i>OsANTR5.1</i> fusioniert mit His-Tag, CaMV-35S-Promotor, OCS-Terminator
<i>antr5+NahG</i>	Basta ^r Kan ^r	<i>AtANTR5</i> -„knock out“-Linie, Garlic_809_B01.1aLb3Fa, T-DNA im Exon von <i>AtANTR5</i> , Überexpression von NahG (Salizylat-Hydroxylase), mit 2 x CaMV-35S-Promotor, tml-Terminator
<i>AtANTR5</i> -Promotor-GUS	Basta ^r	mit <i>AtANTR5</i> -Promotor regulierte β -Glucuronidase

2.2.1 Anzucht auf Erde

Für die Anzucht der *Arabidopsis*-Pflanzen wurde die ED-73 (DIN 11540-80T) Einheitserde verwendet. Die Pflanzen wurden in einer Klimakammer unter folgenden Bedingungen angezogen:

Temperatur:	18°C
Tageslänge/Lichtbedingungen:	10 h/100 $\mu\text{mol Photonen} \times \text{m}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$
rel. Luftfeuchtigkeit:	60%

Zur Induktion der Blütenbildung wurden die Pflanzen nach Entwicklung einer kräftigen Blattrosette in den Langtag (14h) überführt.

2.2.2 Sterilanzucht

Für Selektion der transgenen Pflanzenlinien, Wachstumsanalysen von *AtANTR5* „knock out“-Mutanten und Wildtyp-Pflanzen wurden *Arabidopsis*-Pflanzen auf halbkonzentriertem MS-Medium (MURASHIGE & SKOOG, 1962) unter sterilen Bedingungen auf Petrischalen (Greiner) angezogen. Mit Hilfe eines definierten Anzuchtsmediums ist es möglich die Pflanzen bei bestimmten Nährstoffzusammensetzungen anzuziehen. Dabei wurden verschiedene MS-Salze und Aminosäuren in definierten Konzentrationen eingesetzt und ihre Wirkung auf das Pflanzenwachstum untersucht. Um Kontaminationen zu vermeiden wurde die Samenoberfläche sterilisiert. Die *Arabidopsis*-Samen wurden in ein Eppendorf-Gefäß mit 1 ml 70%-igem Ethanol für 5 Minuten geschüttelt und anschließend 1 Minute bei 14000g sedimentiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurden Samen mit 1 ml Natriumhypochlorid (15% (v/v)) versetzt, 10 Minuten geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde Natriumhypochlorid abgenommen und Samen dreimal mit je 1 ml sterilen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Die oberflächensterilisierten Samen wurden im Anschluss unter sterilen Bedingungen auf halbkonzentriertem MS-Agar in Petrischalen ausgesät. Um gleichzeitige Keimung der Samen zu gewährleisten erfolgte eine Dunkelinkubation von 2 Tagen bei 4°C (WEIGEL & GLAZERBROOK, 2002).

MS-Medium (halbkonzentriert):	2,203 g/l MS-Salze (Murashige Skoog Medium)
	0,05% (w/v) MES
	1% (w/v) Saccharose
	0,8% (w/v) Agar
	pH 5,7 (KOH)

MS-Salze:	0,00011 mM	CoCl ₂
	0,00011 mM	CuSO ₄
	0,1 mM	FeNaEDTA
	0,005 mM	KI
	0,1 mM	MnSO ₄
	0,00103 mM	ZnSO ₄
	2,99 mM	CaCl ₂
	1,25 mM	KH ₂ PO ₄
	18,79 mM	KNO ₃
	1,5 mM	MgSO ₄
	20,61 mM	NH ₄ NO ₃
	0,02664 mM	Glycin
	0,56 mM	myo-Inositol
	0,00406 mM	Nicotinsäure
	0,00243 mM	Pyridoxin-HCl
	0,0003 mM	Thiamin-HCl

Je nach Experiment wurde dem Pflanzenmangelmedium die entsprechende Menge an NaCl, NH₃Cl, NH₃PO₄, KNO₃, NaNO₃, KH₂PO₄ oder Aminosäuren Alanin, Argingi, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamin, Glutamat, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin zugegeben. Transgene Pflanzenlinien wurden auf MS-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin selektiert.

2.2.3 *In-planta-Transformation von Arabidopsis thaliana*

Für Promotor-Reporter-gen-Analysen, Komplementation von *AtANTR5*-„knock out“-Mutanten, sowie Überexpression verschiedener Gene wurden transgene *Arabidopsis*-Pflanzen hergestellt. Zur genetischen Veränderung von *Arabidopsis thaliana* wurde die florale Dip-Methode verwendet (BECHTOLD *et al.*, 1993; CLOUGH & BENT, 1998).

Die Transformation erfolgte mit *Arabidopsis*-Pflanzen, die mehrere gut entwickelte Blütenstände ausgebildet hatten. Agrobakterien des Stammes GV 3101, die zuvor mit den entsprechenden Konstrukten transformiert wurden, wurden in 250 ml YEB-Selektionsmedium (Kap. 2.3.6, Rifampicin, Gentamycin, Kanamycin, Tab. 2.5) über Nacht angezogen. Die Bakterien wurden durch einen Zentrifugationsschritt geerntet (3000g; 10 Minuten) und in 500 ml 5%-iger (w/v) Saccharose-Lösung mit 0,01% (v/v) Substanz Silwet L-77 (BASF, Ludwigshafen) aufgenommen. Die gesamten Blütenstände wurden für 20 Sekunden in die Agrobaktériensuspension eingetaucht. Nach der Inokulation wurden die Pflanzen für 48 Stunden in Plastikboxen zum Erhalt der Luftfeuchte im Schwachlicht gehalten und anschließend bis zur Samenausbildung im Gewächshaus kultiviert. Die geernteten Samen sowie Keimlinge der T₁-Generation wurden auf Grund der erworbenen Kanamycin bzw. BASTA-Resistenz selektiert. Kanamycinselektion erfolgte auf kanamycinhaltigen MS-8-Medium (Kap. 2.2.2). Anschließend wurden die kanamycinresistenten Pflanzenlinien vom

Selektionsmedium auf Erde transferiert. Für die BASTA-Selektion wurden die Samen auf Erde ausgesät und nach Entfaltung der Keimblätter mit 20 ml BASTA-Lösung (100 mg/ml) im Abstand von 2 bis 3 Tagen besprüht, und nach Abreifen der Samen geerntet.

2.2.4 Pflanzeninkubationsexperimente

Um die Expression von *AtANTR5* unter verändertem Nährstoffangebot zu analysieren wurden „Feeding“-Experimente durchgeführt. Dazu wurden autoklavierte 100 mM NH_4Cl_3 -, 10 mM K_2HPO_4 - bzw. 10 mM KNO_3 -Lösungen verwendet. Für die Inkubationsexperimente wurden mittels eines Korkbohrers (\varnothing 0,7 mm) Blattscheibchen aus den Blätter der sechs Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen ausgestanzt und in Petrischalen mit der entsprechenden Lösungen inkubiert. Nach 0, 6, 12 und 24 Stunden wurden Blattscheibchen für die Gesamt-RNA-Isolierung geerntet (Kap. 2.3.18).

2.2.5 Ernte des Pflanzenmaterials

Zur Isolierung von Gesamt-RNA bzw. mRNA (*messenger-RNA*), DNA oder Metaboliten wurden das Pflanzenmaterial direkt nach der Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung gelagert.

2.2.6 Chlorophyllbestimmung

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde angelehnt an ARNON *et al.* (1949) durchgeführt. Es wurden 100 mg Pflanzenmaterial in 500 μl Ethanol (80% (v/v)) für 10 Minuten aufgekocht. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 17000g) wurde der Überstand abgenommen und die Chlorophyllextraktion wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt und die Extinktion bei 652 nm im Photometer (Sinco SUV-2120) bestimmt. Der Chlorophyllgehalt ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) ergibt sich aus dem Quotienten der Extinktion bei 652 nm und dem Faktor 34,2.

2.2.7 Chlorophyllfluoreszenz

Chlorophyllfluoreszenz wurde mit Hilfe des MINI-PAM Gerätes (Walz, Effeltrich) gemessen. Hierbei wird ein kurzer, starker Lichtimpuls (3 μs mit einer wiederholenden Frequenz von 600 oder 20000 Herz) einer Wellenlänge von $\lambda < 670$ nm über eine Diode auf das Blatt appliziert. Der Lichtimpuls erzeugt im Blatt die Emission von Chlorophyllfluoreszenzlicht. Das emittierte Signal wird durch zwei Filter, die Licht von einer Wellenlänge von $\lambda > 700$ nm und keine Wärmestrahlung durchlassen, herausgefiltert, verstärkt und über einen Detektor gemessen. Die wichtigsten, gemessenen Parameter hierbei waren die maximale Fluoreszenz (F_m), die Grundfluoreszenz (F_0) und die aus der Differenz resultierte variable Fluoreszenz ($F_v = F_m - F_0$). Im Licht sind die Fluoreszenzwerte geringer und werden entsprechend mit F_m' und F_t (Steady State Fluoreszenz) bezeichnet. Mit den Fluoreszenzwerten kann die maximale

photosynthetische Aktivität, auch als maximale Quantenausbeute vom Photosystem II oder kurz als „Yield“ bezeichnet, berechnet werden.

$$\text{Yield} = (F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m \quad (\text{KITAJIMA \& BUTLER, 1975; ROHACEK, 2002})$$

2.2.8 Bestimmung des Phosphatgehaltes

Die Bestimmung der Gehalte an anorganischen Phosphat im pflanzlichen Gewebe erfolgte nach der Methode von AMES (1966). Unter Verwendung von Ascorbat-Ammoniummolybdat-Gemisch bildet sich in schwefelsaurer Lösung und Gegenwart von Phosphat das Ammoniumphosphomolybdatkomplex $(\text{NH}_4)[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$. Für die Phosphat-Bestimmung wurde 100 μl 10% (w/v) Ascorbat und 600 μl 0,42% (w/v) Ammoniummolybdat in 1 N Schwefelsäure zu 300 μl Probe zugegeben und 15 Minuten bei 45°C inkubiert. Die Messung dieses Komplexes erfolgte photometrisch in Spektralphotometer (2000 Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bei 820 nm.

2.2.9 Bestimmung des Anthocyangehaltes

Die Bestimmung des Anthocyangehaltes von *A. thaliana*-Keimlingen erfolgte nach LANGE *et al.* (1971). Hierzu wurden diese 50mg in ein Reaktionsgefäß mit 1,5 ml Extraktionspuffer gegeben und 3 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Ansätze über Nacht im Dunkeln bei 22°C gelagert. Nach Zentrifugation (12000g, 15 Minuten) wurde der Überstand in Photometer (2000 Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) gemessen. Der Extinktionswert bei 535 nm lieferte die Absorption der Anthocyane, der Extinktionswert bei 650 nm hingegen war ein Maß für die Streuung durch Trübung. Eine Korrektur der gemessenen Daten erfolgte nach der Raleigh-Formel:

$$A_{535} (\text{korrigiert}) = A_{535} - 2,2 A_{650}$$

Extraktionspuffer: 81% (v/v) H₂O
 1% (v/v) HCl
 18% (v/v) 1-Propanol

2.2.10 Bestimmung der Aminosäuregehalte

Die Konzentrationsmessungen der proteinogenen Aminosäuren in den Rosettenblättern der Arabidopsis-Pflanzen wurde mittels HPLC (*high pressure liquid chromatography*) durchgeführt. Für die HPLC-Messungen wurden das Blattgewebe in 80% (v/v) Ethanol aufgenommen, 90 Minuten bei 80°C inkubiert und 10 Minuten bei 14000g abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand eingedampft und in H₂O resuspendiert. Vor der Messung wurden die präparierten Proben mit dem fluoreszierenden Reagenz AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbammat) derivatisiert. Die Quantifizierung der Aminosäuren wurde mit

einer HPLC-Anlage durchgeführt, das aus P680 HPLC Dionex Pumpe, ASI 100 Dionex Autosampler, RF 2000 Fluoreszenzdetektor, UCI 50 Dionex Interface, UV Detektor UVD 170 U Dionex bestand. Nucleodur cc 250/4 100-5 c18 ec diente als HPLC-Säule. Aliquots von 20 μ l wurden mittels einer Pumpe auf die Säule aufgetragen, wobei der Fluß konstant 1 ml pro Minute betrug. Die Proben wurden in einem automatischen Probengeber auf 37°C temperiert. Die Chromatogramme wurden mit der Software Chromeleon 6.7, Dionex ausgewertet.

Laufmittel A: 100 mM Natriumacetat
pH 5,2

Laufmittel B: 100% Acetonitril

2.2.11 Bestimmung der Salizylsäuregehalte

Die Extraktion von Salizylsäure erfolgte nach einer modifizierten Methode von MEUWLY & METRAUX (1993). Dazu wurden 0,5 g Blattmaterial in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit 5 ml 100% Methanol für 1 Minute unter Schütteln extrahiert. Nach Zentrifugation bei 20000g (10 Minuten, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet nochmals mit 4 ml 100% Methanol für 30 Sekunden extrahiert. Nach erneuten Zentrifugation wurden die beiden Überstände vereinigt und das Methanol bei 38°C mit Hilfe eines Vakuumrotationsverdampfers (Labo Rota S300, Resona Technics, Schweiz) abgezogen. Nach Aufnahme in 2 ml 20% (v/v) Ameisensäure und Ansäuerung mit 50 μ l 32%-iger HCl auf einen pH-Wert < 1,5 wurden die Proben zweimal mit Ethylacetat:Cyclohexan (1:1, v/v) ausgeschüttelt (5 und 3 ml) und die vereinigte organische Phase im Vakuum einrotiert. Die wässrige Phase, die die konjugierte Salizylsäure enthielt, wurde mit 1,3 ml 32%-iger HCl auf 4 N HCl eingestellt und dann in verschlossenen Pyrexgläschen für eine Stunde im Heizofen bei 80°C hydrolysiert. Die freigesetzten Verbindungen wurden wie oben beschrieben zweimal mit Ethylacetat:Cyclohexan (1:1, v/v) ausgeschüttelt und anschließend einrotiert.

Die Proben wurden in 250 μ l Probenpuffer aufgenommen und nach Zentrifugation bei 20000g, 10 Minuten und 4°C mittels HPLC aufgetrennt. Die Quantifizierung wurde mit folgender Anlage durchgeführt: P680 HPLC Pumpe Dionex, ASI 100 Autosampler Dionex, RF 2000 Fluoreszenzdetektor, Interface UCI 50 Dionex, UV Detektor UVD 170 U Dionex, Säule Nucleodur cc 250/4 100-5 c18 ec. Aliquots von 20 μ l wurden mittels einer Pumpe auf die Säule aufgetragen, wobei der Fluß konstant 1 ml pro Minute betrug. Die Proben wurden in einem automatischen Probengeber auf 30°C temperiert. Salizylsäure wurde mit dem Fluoreszenzdetektor bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 300 und 400 nm detektiert. Die Retentionszeit für Salizylsäure betrug ca. 18 Minuten. Die Quantifizierung erfolgte mit Chromeleon 6.7 Programm, Dionex.

Probenpuffer:	10 mM Natriumacetat, 20% (v/v) Methanol pH 5,2
Laufmittel A:	10 mM Natriumacetat pH 5,2
Laufmittel B:	100% Methanol

2.2.12 Inokulation von *Arabidopsis*-Pflanzen mit *P. syringae*

Für die Analyse der Auswirkungen der Pathogen-Pflanze-Interaktion auf das Expressionsniveau von *AtANTR5* sowie die Bestimmung der Resistenz wurden 4 Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen mit *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pst*) (dem virulenten Stamm DC3000 und dem avirulenten Stamm DC3000*AvrRpt2*) inokuliert. Zur Inokulation von *A. thaliana* wurde jeweils eine 25 ml Kultur im KB-Medium mit dem entsprechenden Stamm angeimpft und über Nacht unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert (Kap. 2.3.6). Die Zellen wurden geerntet (2500g, 10 Minuten) und in sterilem 10 mM MgCl₂ resuspendiert. Es wurde eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt, was einer Zelldichte von 1 x 10⁷ entsprach. Für die Inokulation der Pflanzen wurde zwei verschiedene Methoden verwendet, die Infiltrationsmethode oder die Dip-Methode. Die Infiltration der Pflanzen erfolgte von der Blattunterseite mit einer 1 ml Spritze ohne Kanüle (in eine Fläche von 0,5 cm im Durchmesser). Das Volumen pro Infiltration betrug etwa 10 µl. Als Negativkontrolle wurde 10 mM MgCl₂ infiltriert. Für die Dip-Methode wurde eine oberflächenaktive Substanz Silwet L-77 mit einer Endkonzentration von 0,01% (v/v) (BASF, Ludwigshafen) zugefügt. In diese Bakterien-Suspension wurden einzelne *Arabidopsis*-Blätter vier mal eingetaucht. Als Kontrolle wurde 10 mM MgCl₂ mit 0,01% (v/v) Silwet L-77 verwendet. Anschließend wurden die Pflanzen in eine Feuchtkammer zum Erhalt der Luftfeuchtigkeit gestellt. Unter diesen Bedingungen sind die Stomata der Blätter weitgehend geöffnet, so dass *P.syringae* durch diese in den Intrazellularraum eindringen und die Pflanze infizieren kann. Um die Expression von *AtANTR5* verfolgen zu können, wurden infizierte Blätter zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden) für die Gesamt-RNA-Isolierung und die Northern-Blot-Analyse (Kap. 2.3.18 bis Kap. 2.3.20) geerntet (Kap. 2.2.5). Außerdem wurde die Entwicklung der Krankheitssymptome über mehrere Tage beobachtet und dokumentiert.

2.2.13 Transformation von Protoplasten von *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana*

2.2.13.1 Isolierung von Protoplasten aus *N. tabacum*

Die Methode der Protoplastenisolierung aus *N. tabacum* wurde nach DAMM & WILLMITZER (1989) durchgeführt. Das Alter der Pflanzen betrug 2-3 Wochen. Blätter von *N. tabacum*

wurden in eine Petrischale mit 0,5 M Mannit überführt, mit einer Rasierklinge angeritzt und das 0,5 M Mannit durch 12 ml Digestion-Medium ersetzt. Die Blätter wurden über Nacht zum Verdau der Zellwand im Dunkeln bei 22°C erschütterungsfrei inkubiert. Mittels eines Metallnetzes mit 63 μm Maschenweite wurden die Protoplasten von den unverdauten Blattresten getrennt und anschließend mit 6 ml 0,2 M CaCl_2 gewaschen. Durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 70g und 15 °C wurden die Protoplasten pelletiert und der Überstand bis auf 0,5 ml abgenommen. Im verbleibenden Überstand wurden die Protoplasten resuspendiert und mit 3 ml 0,5 M Mannit und 6 ml 0,2 M CaCl_2 versetzt. Die Protoplasten wurden bei 50g für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde bis auf 0,5 ml abgenommen und die Protoplasten im verbleibenden Überstand resuspendiert. Danach wurden 6 ml 0,5 M Mannit und 3 ml 0,2 M CaCl_2 zugegeben, die Protoplasten bei 50g für 5 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Die Protoplasten wurden in 8 ml Saccharose/MES-Medium resuspendiert. Nach 10-minütigen Zentrifugation bei 60g sammelten sich die intakten Protoplasten an der Oberfläche der Lösung. Die Protoplasten wurden abgenommen und in 9 ml W5-Medium resuspendiert. Mit Magnesium/Mannit-Medium wurden diese auf eine Konzentration von $1,6 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ Protoplasten eingestellt und für 30 Minuten bei 0°C bis zur Transformation aufbewahrt.

Digestion-Medium	0,45 M Mannit
	10 mM CaCl_2
	1% (w/v) Cellulase "Onozuka" R-10 (Serva, Heidelberg)
	0,25% (w/v) Macerozyme R-10 (Serva, Heidelberg)

Saccharose/MES-Medium:	0,5 M Saccharose
	0,1% (w/v) MES
	pH 5,7 (NaOH)

W5-Medium:	145 mM NaCl
	125 mM CaCl_2
	5 mM KCl
	5 mM Glukose

Magnesium/Mannit-Medium:	0,5 M Mannit
	15 mM MgCl_2
	0,1% (w/v) MES
	pH 5,7(KOH)

2.2.13.2 Transformation von *N. tabacum*

Die Transformation von Protoplasten von *N. tabacum* 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 Plasmid-DNA wurde in die Petrischale gegeben,

300 μ l Protoplasten und 500 μ l 40% (w/v) PEG 6000 wurden nacheinander aufgetropft und für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml W5-Medium wurden die Protoplasten bei 70g für 5 Minuten abzentrifugiert und in 2,5 ml B5t-Medium resuspendiert. Die transformierten Protoplasten wurden über Nacht im Dunkeln bei 23°C inkubiert und die Fluoreszenz der transformierten Protoplasten mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Zeiss) analysiert.

B5t-Medium: 0,32% (w/v) Gamborg-Medium
 0,45 M Glucose
 1 x 10⁻⁵% (w/v) 2,4-Dichlorophneoyacetic acid
 1 x 10⁻⁴% (w/v) 1-Naphtylacetic acid
 2 x 10⁻⁵% (w/v) 6-Benzylaminopurine
 pH 5,7 (KOH)

2.2.13.3 Transformation von *A. thaliana*

Die Transformation der Protoplasten aus *A. thaliana* erfolgte nach WENDT *et al.*, 2000 in Kooperation mit Prof. Enrico Martinoia und Dr. Ulrike Schmidt (Botanisches Institut, Zürich).

2.2.14 Bestimmung der *Pseudomonas* Vermehrung in der Pflanze

Für die Bestimmung der Vermehrung *Pseudomonas syringae* in den infizierten Blätter wurden Wachstumskurven erstellt. Dazu wurden *P. syringae* mit einer Bakteriensuspension der Zelldichte von 5 x 10⁵ in die Blätter infiltriert. Für jeden Zeitpunkt wurden 9 Blattscheibchen mit einem Korkbohrer (Durchmesser: 0,3 cm) ausgestanzt, je 3 Blattscheibchen pro Probe vereint und in 0,5 ml steriler 10 mM MgCl₂-Lösung mit einem Potter (B. Braun AG, Melsungen) homogenisiert. Die Proben wurden in einer Verdünnungsreihe (1:10 bis 1:1000000, in 1:10 Verdünnungsschritten) auf KB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert (Kap. 2.3.7). Nach 2-tägigen Inkubation bei 28°C wurden die Kolonien ausgezählt.

2.2.15 Histochemische Analysen

2.2.15.1 Trypanblau-Färbung von *Arabidopsis*-Blattgewebe

Trypanblau dient zum selektiven Anfärben abgestorbener Zellen oder Pilzstrukturen. Die Färbung mit Trypanblau wurde mit Modifikationen nach der Methode von CAO *et al.* (1998) durchgeführt. Das Gewebe wurde in einem Volumenanteil Lactophenol-Trypanblau-Lösung und zwei Volumenanteilen 95% (v/v) Ethanol 5 Minuten lang gekocht. Das Gewebe wurde für 24 Stunden in Chloralhydrat-Lösung (2,5 g/ml) entfärbt und in 80% (v/v) Glycerin gelagert.

2.2.15.2 Diaminobenzidin-Färbung von *Arabidopsis*-Blattgewebe

Die Diaminobenzidin-Färbung (DAB) dient zur Detektion von H₂O₂-Akkumulation in Rosettenblättern von *Arabidopsis thaliana* und wurde nach der Methode von KARIOLA *et al.* (2005) durchgeführt. Dazu wurden die Blätter für 15 Minuten mit einer DAB-Lösung infiltriert

2.2.15.5 Phosphatase-Nachweis

Zur Untersuchung der Phosphatasen-Aktivität *in vivo* wurden die *Arabidopsis*-Keimlinge in Sterilkultur mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen 10 Tage kultiviert. Anschließend wurde 3 ml 0,08% (w/v) BCIP-Lösung gleichmäßig auf den Platten verteilt und 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde die Intensität des blauen Niederschlages ausgewertet.

2.2.16 Herstellung der Dünnschnitte und mikroskopische Analyse von Wurzelgeweben

Die Herstellung der Dünnschnitte sowie ihre Auswertung unter einem Mikroskop erfolgte in Kooperation mit Dr. Michael Menzel (IPK, Gatersleben).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Stämme, Vektoren und Konstrukte verwendeter Mikroorganismen

Die rekombinanten DNA-Techniken erfolgten in *E. coli*-Zellen des Stammes XL1blue (BULLOCK *et al.*, 1987). Für die heterologe Expression von *AtANTR5* in *E. coli* wurde der Stamm C43 (MIROUX & WALKER, 1986), in *S. cerevisiae* wurde der Stamm 22Δ8AA (FISCHER *et al.*, 2002) und in *P. pastoris* der Stamm GS115 (CARMONIA *et al.*, 1996) verwendet.

In-Planta-Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen (Kap. 2.2.3) wurde mit dem *Agrobacterium-tumefaciens*-Stamm GV3103::pMP90 durchgeführt (KONCZ & SHELL, 1986).

Für die Untersuchung von Pflanzen-Pathogen-Interaktionen wurden *Arabidopsis*-Pflanzen mit pathogenen Mikroorganismen inokuliert (Kap. 2.2.12). Als bakterieller Mikroorganismus wurde *Pseudomonas syringae* pv *tomato* eingesetzt, wobei sowohl der virulente Pseudomonaden-Stamm DC3000 als auch der avirulente Stamm DC3000*AvrRpt2* (KUNKEL *et al.*, 1993; WHALEN *et al.*, 1991) verwendet wurden.

Tabelle 2.2 Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Resistenz	Verwendung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1 blue	Tet ^r	Klonierung und Amplifikation von DNA	BULLOCK <i>et al.</i> , 1987
<i>Escherichia coli</i> C43	-	Heterologe Expression	MIROUX & WALKER, 1996
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 22Δ8AA	-	Heterologe Expression MATα gap1-1 put4-1 uga4-1 Δcan1 Δapl1 Δlyp1 Δhip1 Δdip5 ura3	FISCHER <i>et al.</i> , 2002
<i>Pichia pastoris</i> GS115	-	his 4, heterologe Expression	CARMONIA <i>et al.</i> , 1996
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3103::pMP90	Rif ^r , Gent ^r	Transformation von <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	KONCZ & SHELL, 1986
<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000	Rif ^r	Inokulation der Pflanzen	KUNKEL <i>et al.</i> , 1993 WHALEN <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000 <i>AvrRpt2</i>	Rif ^r , Kan ^r	Inokulation der Pflanzen	KUNKEL <i>et al.</i> , 1993 WHALEN <i>et al.</i> , 1991

Die in dieser Arbeit verwendeten oder konstruierten Vektoren, die zur Klonierung oder Expression in Bakterien oder zur Transformation von Protoplasten sowie *Arabidopsis*-Pflanzen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Vektoren und Konstrukte

Vektor	Relevante Merkmale	Referenz
pBSK	β -gal ⁺ , Amp ^r , Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
pET16b	Kan ^r , Histidin-Tag, Expressionsvektor	Novagene, Heidelberg
pET42a	Kan ^r , Histidin-Tag, Expressionsvektor	Novagene, Heidelberg
pDR196	Amp ^r , URA3, PMA-Promotor, ADH-Terminator Expressionsvektor	WIPF <i>et al.</i> , 2003
pGFP2	Amp ^r , Pflanzentransformationsvektor, CaMV-35S-Promotor, OCS-Terminator	WENDT <i>et al.</i> , 2000
pGPTV-bar	Kan ^r , Basta-Resistenz, GUS-Reportergen, nos-Terminator, Pflanzentransformationsvektor	BECKER <i>et al.</i> , 1992; BECKER, 1990; BEVAN, 1984;
pHANNIBAL	Amp ^r , Klonierungsvektor, CaMV35S-Promotor, OCS-Terminator	GLEAVE <i>et al.</i> , 1992
pART27	Kan ^r , Spec ^r , binärer Pflanzentransformationsvektor	GLEAVE <i>et al.</i> , 1992
pGreen0029	β -gal ⁺ , Kan ^r , binärer Pflanzentransformationsvektor	HELENS <i>et al.</i> , 2000
pSoup	Tet ^r , binärer Pflanzentransformationsvektor	HELENS <i>et al.</i> , 2000
pCIB200-NahG	<i>nahG</i> mit 2 x 35S-Promotor und tml-3' Terminator, Kan ^r , binärer Pflanzentransformationsvektor	Syngenta
pNB4	<i>OsANTR5.1-His</i> mit CaMV35S-Promotor, OCS-Terminator in pART27	BENTEL, 2006
pNB4	<i>AtANTR5-His</i> in pPIC3.5	BENTEL, 2006
pLL1	<i>AtANTR5</i> in pBSK	diese Arbeit
pLL2	<i>AtANTR5-His</i> in pET16b	diese Arbeit
pLL3	<i>AtANTR5</i> in pGFP2	diese Arbeit
pLL5	<i>AtANTR5</i> -Promotor in pBSK	diese Arbeit
pLL6	<i>AtANTR5</i> -Promotor in pGPTV-bar	diese Arbeit
pLL7	<i>AtANTR5</i> -gDNA mit Promotor und Terminator in pGreen029	diese Arbeit
pLL8	<i>AtANTR5</i> „Anitsense“ Orientierung, mit CaMV35S-Promotor, OCS-Terminator in pHannibal	diese Arbeit
pLL9	<i>AtANTR5</i> „Anitsense“ Orientierung, CaMV35S-Promotor, OCS-Terminator in ART27	diese Arbeit
pLL11	<i>AtANTR5-cMyc</i> in pBSK	diese Arbeit
pLL12	<i>AtANTR5-cMyc</i> mit CaMV35S-Promotor, OCS-Terminator in pHannibal	diese Arbeit
pLL14	<i>AtANTR5-cMyc</i> mit CaMV35S-Promotor, OCS-Terminator in pART27	diese Arbeit
pLL15	<i>AtANTR5-His</i> in pDR196	diese Arbeit

2.3.2 Oligonukleotide

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR (Kap. 2.3.12), für Expressionsstudien mittels RT-PCR (Kap. 2.3.17) und DNA-Sequenzanalyse (Kap. 2.3.11) wurden die in der Tabelle 2.4 aufgeführten Oligonukleotide verwendet, die Synthese erfolgte durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg).

Tabelle 2.4: Oligonukleotide Eingefügte Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind hervorgehoben und hinter der Bezeichnung der Oligonukleotide in Klammern angegeben.

Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'
T3 Promotor Primer	AATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7 Promotor Primer	GTAATACGACTCACTATAGGG
GUSas Primer	ATCCAGACTGAATGCCACAGG
GFP-seq	ATCACCTTCACCCTCTCCA
LB-3	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC
CaMV-35S-Promotor	ATCCTTCGCAAGACCCTTT
OCS-Terminator	TCATGCGATCATAGGCGTC
nptII-s	CTCGTCAAGAAGGCGATAGAAG
nptII-as	GATGGATTGCACGCAGGTTCTC
PET-Kozak	AAGGAGATCCACCATGGGCCATC
PET-PstI [<i>PstI</i>]	TTCGGGCTTTGT CTGCAG CCGGAT
At5g44370-3 [<i>XhoI</i>]	GCTCTAGAC CTCGAG AAAAGGTCTAACATG
At5g44370-4 [<i>BamHI</i>]	TACCGAATCAAATCGATCTT GGATCC AGG
At5g44370-11	GACCACTGCGTTTCACACTACTCTCTCTC
At5g44370-12 [<i>SmaI</i>]	GCTCTATGTAACACAC CCCGGG TGCTGAGGAAAG
At5g44370-13	TTCTTATGTGGTGGTGCTTGAGAGG
At5g44370-14	GCAATTACCGAATCAATCGATCTTCG
At5g44370-6 [<i>XhoI</i>]	GCAATTACCGACT CTCGAG CGATCTTCG
At5g44370-10 [<i>KpnI</i>]	CAATCAAAG GTACCT TCTCCAGTAGAAAAC
At5g44370-20 [<i>BamHI</i>]	GCTCTAGATCAGAGAAAG GGATCC AACATG
At5g44370-21 [<i>EcoRI</i>]	TAGTCTGCGAT GAATTC ACCAACAATGG
At5g44370-27 [<i>BamHI</i>]	AGGATCC TACAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTCAAAGATCCTTTCT CCACTAGAAAACAGCAGAAACACAACAG
At5g44370-29	ACCAGAACCCGCAAGTTCTT
At5g44370-30	ATTCCAGCTAATGTCCCAGC
Os11g08370-1 [<i>KpnI</i>]	TTGACCTGAA GTACCT GCCAGCAAGTAT
Os11g08370-2 [<i>XhoI</i>]	AATCACCTGACTA CTCGAG GATCTTCTCC
Os11g08370-3 [<i>BamHI</i>]	CAGCCAACCTCAG GGATCC TTTCGGGCT
Os11g08370-4	GGCTGGGAGGTAGACTTGTC
Os11g08370-5	TCAGGTCCATGTTAGATGCC
nahG-sense	GCCTTAGCACTGGAAGTCTG
nahG-antisense	TCGGTGAACAGCCACTTGCCAC

2.3.3 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen der unterschiedlichen Stämme erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in sterilem YT-Vollmedium, bzw. nach Transformation in ψ B-Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989). Durch Zugabe der geeigneten Antibiotika wurden entsprechende Selektionsbedingungen eingestellt (Tab. 2.4). Zur Aufbewahrung der Bakterienklone wurden diese bei –80°C als Glycerinkultur (13% (v/v) Glycerin) gelagert.

YT-Medium:	0,5% (w/v) Hefe-Extrakt
	0,8% (w/v) Pepton
	0,25% (w/v) NaCl
	1,5% (w/v) Agar (für Agarplatten)
	pH 7,0 (NaOH)
ψ B-Medium:	0,5% (w/v) Hefe-Extrakt
	0,8% (w/v) Pepton
	0,4% (w/v) MgSO ₄
	10 mM KCl
	pH 7,6 (KOH)

Tabelle: 2.5 Konzentrationen der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	μ g/ml	Stocklösung (mg/ml) [Lösungsmittel]
Ampicillin	200	100 [50% EtOH]
Tetrazyklin	10	5 [50% EtOH]
Kanamycin	50	25 [H ₂ O]

2.3.4 Anzucht von *S. cerevisiae*

Die *S. cerevisiae*-Zellen wurden in Vollmedium (YPD) oder nach Transformation in SC-Minimalmedium unter aeroben Bedingungen bei 30°C angezogen. Zur Aufbewahrung der Bakterienklone wurden diese bei –80°C als Glycerinkultur (13 % (v/v) Glycerin) gelagert.

YPD-Medium:	1% (w/v) Hefe-Extrakt
	2% (w/v) Pepton
	2% (w/v) Glukose
	2% (w/v) Agar (für Agarplatten)
SC-Medium:	0,67% (w/v) <i>Yeast Nitrogen Base</i> (ohne Aminosäuren)
	2% (w/v) Glykose
	0,1% (w/v) Adenin, Leucin, Tryptophan, Uracil
	0,005% (w/v) Histidin
	2% (w/v) Agar (für Agarplatten)

2.3.5 Anzucht von *P. pastoris*

Die Anzucht von *P. pastoris* erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 30°C in sterilem YPD-Vollmedium (Kap. 2.3.4). Für die Induktion des in das AOX1-Locus integrierten Gens wurde *P. pastoris* zunächst in BMGY angezogen und anschließend in methanolhaltiges BMMY überimpft.

BMGY-Medium: 1,34% (w/v) *Yeast Nitrogen Base* (ohne Aminosäuren)
 1% (v/v) Glycerin
 4 x 10⁻⁵% (w/v) Biotin
 100 mM KH₂PO₄
 pH 6,0

BMMY-Medium: 1,34% (w/v) *Yeast Nitrogen Base* (ohne Aminosäuren)
 0,5% (v/v) Methanol
 4 x 10⁻⁵% (w/v) Biotin
 100 mM KH₂PO₄
 pH 6,0

2.3.6 Anzucht von *A. tumefaciens*

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* des Stammes GV3103::pMP90 erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 30°C in sterilem YEB-Vollmedium kultiviert. Selektioniert wurde der Agrobakterium-Stamm GV3103::pMP90 auf Rifampicin (chromosomal) und Gentamycin (Ti-Plasmid). Die mit binären Vektoren transformierten Agrobakterien wiesen zusätzlich eine Kanamycin-Resistenz auf. In der Tabelle 2.5 sind Antibiotika und entsprechende Konzentrationen dargestellt. Durch Zugabe der geeigneten Antibiotika wurden entsprechende Selektionsbedingungen eingestellt (Tabelle 2.5). Zur Aufbewahrung der Bakterienklone wurden diese bei -80°C als Glycerinkultur (13 % (v/v) Glycerin) gelagert.

YEB-Medium: 0,5% (w/v) Beef-Extrakt
 0,1% (w/v) Hefe-Extrakt
 0,5% (w/v) Pepton
 2 mM MgSO₄
 1,5% (w/v) Agar (für Agarplatten)

Tabelle: 2.6 Konzentrationen der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	µg/ml	Stocklösung (mg/ml) [Lösungsmittel]
Rifampicin	100	20 [100 % MeOH]
Gentamycin	25	25 [H ₂ O]
Kanamycin	25	12,5 [H ₂ O]

10 mg/ml Lysozym versetzt worden. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Die DNA der Oberphase wurde durch eine Isopropanolfällung und eine Salz/Ethanol-Präzipitation angereichert und gereinigt.

2.3.11 „In-vitro“-Manipulation von DNA

Die Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas, St.Leon Rot) sowie die Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St.Leon Rot) erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde nach der Methode des „NucleoSpin[®] Extract II-Kit“ (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt.

2.3.12 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von bestimmten DNA-Abschnitten wurde in einem T3-Thermocycler sowie in einem T-Gradient Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Als DNA-Polymerasen wurden die *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) bzw. die *Pfu*-Polymerase mit einer 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Promega, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.3.13 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde nach SAMBROOK *et al.* (1989) in horizontalen Gelapparaturen durchgeführt. Um eine Auftrennung der verschieden großen DNA-Fragmente zu erreichen, wurden 0,8-2% (w/v) Agarosegele verwendet. Als Größenstandard diente der Lambda DNA/PstI Marker (Fermentas, St.Leon-Rot).

2.3.14 DNA-Sequenzanalyse

Zur DNA-Sequenzanalysen wurde der Sequenzierservice des „Zentrum für Nanostrukturtechnologie und molekularbiologische Technologie“ an der Technischen Universität Kaiserslautern (Nano+BioCenter, Kaiserslautern) in Anspruch genommen.

2.3.15 Datenverarbeitung von DNA- und Aminosäuresequenzen

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen wurde mit Hilfe des Programms CloneManager (Version 7) durchgeführt. Die Daten wurden den entsprechenden Datenbanken (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>, <http://www.arabidopsis.org>, <http://ebi.ac.uk>) entnommen. Alignments wurden mittels CLUSALW-Programm (THOMPSON *et al.*, 1997) erstellt, das im Internet unter der Adresse <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw> frei zugänglich ist. Zur manuellen Nachbearbeitung des Protein-Alignments wurde das Programm GENEDOC verwendet (NICHOLAS *et al.*, 1997).

2.3.19 „Northern-Blot“-Analyse

Die Auftrennung von hitzedenaturierter Gesamt-RNA wurde in formaldehydhaltigen Agarosegelen durchgeführt nach SAMBROOK *et al.* (2001). Zur Herstellung der Formaldehyd-Gele wurde 0,5 g Agarose in 36 ml DMPC-H₂O_{bidest} aufgekocht, mit 5 ml 10-fach MOPS-Puffer sowie 9 ml 37%-igen Formaldehyd versetzt und in eine Gelapparatur gegossen. Pro Gelspur wurden 10 µg RNA aufgetrennt. Dazu wurden 10 µl RNA mit 20 µl Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 65°C denaturiert und nach 5-minütigen Abkühlen direkt aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 Volt 60 Minuten in 1-fach konzentriertem MOPS-Puffer. Das Gel wurde nach dem Lauf zweimal 15 Minuten in Wasser geschwenkt und 10 Minuten in 10-fach SSC äquilibriert. Die RNA wurde in 10-fach SSC mittels kapillarem Flüssigkeitsstrom auf Nylonmembran (Nytran-Plus, Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert und anschließend durch UV-Licht bei 254 nm im UV-Ofen (Amersham, Freiburg) kovalent fixiert.

10-fach MOPS-Puffer: 200 mM MOPS,
 10 mM EDTA
 50 mM Natriumacetat
 pH 8,0

Probenpuffer: 15% (v/v) 10-fach MOPS
 25% (w/v) Formaldehyd
 50% Formamid
 10% (v/v) Glycerin/Bromphenolblau
 pH 8,0

10-fach SSC: 1,5 M NaCl
 150 mM Natriumcitrat
 pH 7,0

2.3.20 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Zur Synthese radioaktiv markierter DNA-Sonden wurde das Random-Priming-dCTP-Labeling Kit (Boehringer, Mannheim) nach Angaben des Herstellers herangezogen. Als radioaktiv markiertes Nukleotid diente [α^{32} P]-dCTP (Amersham Biosciences, Freiburg) mit einer Aktivität von 20-100 µCi pro Sonde. Als Matrize für den Markierungsvorgang wurden 50-250 ng DNA eingesetzt. Zum Beenden der Reaktion wurde die DNA über eine Probe Quant TM G-50 Micro Columns (Health Care, Freiburg) von nicht-inkorporierten Nukleotiden getrennt. Die Hybridisierung der Nylonmembranen mit [α^{32} P]-dCTP-markierten Sonden erfolgte bei 65°C für 12 Stunden nach der Methode von SAMBROOK *et al.* (2001) mit „Church-Puffer“ (CHURCH & GILBERT, 1984) als Hybridisierungspuffer. Um die unspezifisch gebundene DNA-Sonde zu entfernen wurden die Membranen zweimal 15 Minuten mit Waschpuffer I bei

65°C und anschließend 10 Minuten mit Waschpuffer II bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem Cyclone Storage Phosphorscreen (Perkin Elmer Life Sciences, Zaventem, Belgium) in einer lichtundurchlässigen Expositionskassette (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert.

Hybridisierungspuffer: 0,25 M Na₂HPO₄
 1 mM EDTA
 1% (w/v) BSA
 7% (w/v) SDS
 pH 7,2

Waschpuffer I: 40 mM Na₂HPO₄
 1 mM EDTA
 0,5% (w/v) BSA
 5% (w/v) SDS
 pH 7,2

Waschpuffer II: 40 mM Na₂HPO₄
 1 mM EDTA
 1% (w/v) SDS
 pH 7,2

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung

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

Bradford- 50 mg/10 ml EtOH_{p.a} Coomassie Brilliant Blue G-250
Farbreagenz: 175 ml 85% ortho-Phosphorsäure
 ad 1 l H₂O

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde nach der Methode von LAEMMLI (1970) durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung zwischen 80-130 Volt in vertikalen Gelapparaturen (BioRad, München) in einem 13%-igen Trenngel, welches nach Polymerisation von einem 5%-igen Sammelgel überzogen wurde. Zur Bestimmung der Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine wurde der „Prestained Protein Marker“ der Firma NEB (Frankfurt) verwendet.

Trenngel:	13% (w/v) Acrylamid 0,44% (w/v) Bisacrylamid 300 mM Tris-HCl 0,08% (w/v) SDS 0,05% (v/v) TEMED 0,05% (w/v) APS pH 8,8
Sammelgel:	3% (w/v) Acrylamid 0,08% (w/v) Bisacrylamid 125 mM Tris-HCl 0,1% (w/v) SDS 0,1% (v/v) TEMED 0,05% (w/v) APS pH 8,8
SDS-Laufpuffer:	192 mM Glycerin 25 mM Tris-HCl 1% (w/v) SDS pH 8,3
5x Gelladepuffer:	0,5 mM Tris-HCl 2% (w/v) SDS 10% (v/v) Glycerin 1% (w/v) Bromphenolblau pH 6,8

Aufgetrennte Proteinbanden konnten mit Hilfe einer Färbelösung, die den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue enthält, sichtbar gemacht werden. Der Hintergrund wurde mit Entfärbelösung über Nacht entfärbt.

Färbelösung:	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 10% (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Methanol
Entfärbelösung:	7% (v/v) Essigsäure 5% (v/v) Methanol

2.4.3 Western-Blot und Antikörpernachweis

Für einen immunologischen Nachweis von Proteinen mit Antikörper wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,2 μm) transferiert. Der Transfer erfolgte in einem MiniTank Elektrobloetter (BioRad, München) für 2-4 Stunden mit 200-500 mA.

Nach dem Blotten wurden unspezifische Bindestellen auf der Nitrocellulosemembran abgesättigt, indem die Membran für 1-2 Stunden in einer TBS-Lösung mit 3% (w/v) BSA

inkubiert wurde. Das überschüssige BSA wurde durch jeweils 10-minütiges Schwenken in TBS-Puffer, TBST-Puffer und TBS-Puffer entfernt. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membran über Nacht mit dem ersten spezifischen Antikörper, der nach Herstellerangaben verdünnt in TBS/BSA-Lösung eingesetzt wurde. Die Membran wurde daraufhin von überschüssiger Antikörperlösung befreit, indem sie wiederum je 5 Minuten 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. Die Detektion der Antikörper-markierten Proteine erfolgte durch die Farbreaktion der am sekundären Antikörper gebundene alkalischen Phosphatase. Für die Immunodetektion wurden 50 ml AP-Puffer mit 220 μ l BCIP (50 mg/ml in 70% (v/v) Dimethylformamid) und 165 μ l NBT (50 mg/ml in 50% (v/v) Dimethylformamid) versetzt und auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Die Reaktion wurde durch Waschen der Membran mit H₂O abgestoppt.

Transferpuffer:	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20% (w/v) Methanol 1% (w/v) SDS pH 8,3
TBS-Puffer:	20 mM Tris-HCl 150 M NaCl pH 7,5
TBST-Puffer:	20 mM Tris-HCl 150 M NaCl 0,1%(w/v) Tween 20 pH 7,5
AP-Puffer:	100 mM Tris-HCl 100 M NaCl 5 mM MgCl ₂ pH 9,5

2.4.4 Aufnahmeversuche an intakten *E. coli*-, *S. cerevisiae*- und *P. pastoris*-Zellen

Zur biochemischen Charakterisierung von AtANTR5 wurden Aufnahmeexperimente mit [¹⁴C]-markierten Glutamat, Glutamin, Methylammonium an intakten *S. cerevisiae*- und *P. pastoris*-Zellen oder mit [³²P]-Phosphat an intakten *E. coli*-Zellen, durchgeführt. Hierzu wurden die *E. coli*-Zellen in YT-Medium (Kap. 2.3.3) angezogen und die Expression des Zielproteins durch IPTG induziert. Die Induktion der heterologen Proteinsynthese in *P. pastoris*-Zellen erfolgte durch Methanol im BMMY-Medium (Kap. 2.3.5). Die *S. cerevisiae*-

Zellen enthielten den pDR196-Konstrukt mit einen Konstitutiven PMA-Promotor und wurden im SC-Medium (Kap. 2.3.4) kultiviert. Die Transportmessungen erfolgten in Anlehnung an die von TJADEN *et al.* (1998) beschriebene Methode mit der „Rapid-Filter-Technik“ (WINKLER *et al.*, 1968).

2.4.5 Rekonstitution von Membranproteinen in Liposomen

Die Rekonstitution von Membranproteinen aus Gesamtproteinextrakten stellt eine gängige Methode zur biochemischen Analyse von Transportproteinen dar (PLANO & WINKLER, 1989; RIGAUD *et al.*, 1995). Hierbei werden hydrophobe Proteine in eine künstliche Membran integriert. Die aus transformierten Bakterien- bzw. Hefezellen isolierten Membranproteine wurden zur biochemischen Charakterisierung von AtANTR5 in Liposomen rekonstituiert.

2.4.6 Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität

Die Glutaminsynthetase-Aktivität wurde anhand der Übertragung von Natriumglutamat auf Hydroxylamin gemessen. Diese Reaktion führt zu dem Endprodukt γ -Glutamylhydroxamat, welches bei 540 nm photometrisch bestimmt werden kann. Dazu wurde Blattgewebe im Extraktionspuffer mit einem Potter (B. Braun AG, Melsungen) homogenisiert. Die Extrakte wurden mit 15000g bei RT zentrifugiert. 100 μ l des Überstandes wurden mit jeweils 250 μ l Reaktionspuffer in einer Blindprobe und einem Reaktionsansatz eingesetzt und 15 Minuten bei 37°C geschüttelt, die Reaktion wurde anschließend mit 500 μ l der Stopplösung gestoppt. Die Blindprobe wurde direkt mit 500 μ l der Stopplösung versetzt, so dass keine GS-katalysierte Reaktion stattfinden konnte. Die Ansätze wurden bei 15000g zentrifugiert und die optische Dichte der Überstände wurde im Photometer (2000 Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bei 540 nm gemessen.

Extraktionspuffer:	50 mM Tris-HCl 1 mM MgSO ₄ 10% (v/v) Glycerol 30 mM Mercaptoethanol pH 7,8
Reaktionspuffer:	100 mM Imidazol 15 mM ATP 50 mM MgSO ₄ 10 mM Hydroxylamin 150 mM L-Natriumglutamat pH 7,2
Stopplösung:	370 mM FeCl ₃ 200 mM Trichloressigsäure in 1 M HCl

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die physiologische Bedeutung des *AtANTR5*-Proteins und dessen Einbindung in den pflanzlichen Stoffwechsel eingehend untersucht. Weiterhin konnte mittels GFP-Fusionskonstrukten und deren transienter Expression die subzelluläre Lokalisierung von *AtANTR5* untersucht und aufgeklärt werden. Mit Hilfe von Promotor-Reportergen-Fusionen wurde die gewebe- und entwicklungsspezifische Expression des *AtANTR5*-Gens untersucht. Außerdem wurden *Arabidopsis thaliana* ANTR5-„knock out“-Linien identifiziert, molekular charakterisiert und komplementiert. Zur Untersuchung der Rolle von *AtANTR5* im Stoffwechsel wurden Wachstum und Entwicklung der „knock out“-Mutanten unter verschiedenen biotischen und abiotischen Einflüssen wie Nährstoffangebot, Salzstress oder Pathogenbefall analysiert.

3.1 Aminosäuresequenzvergleich von *AtANTR5* mit homologen Proteinen

Das putative Membranprotein *AtANTR5* (AGI: At5g44370) aus *Arabidopsis thaliana* wird phylogenetisch in die MFS (major facilitator superfamily) eingruppiert, die zahlreiche Metabolite über verschiedene Membranen transportieren (z. B. Plasmamembran, Tonoplast, Plastidenmembranen etc.). Innerhalb dieser Familie konnte *AtANTR5* anhand eines typischen 7-Aminosäuren-Motivs in der 4. putativen Transmembrandomäne der ACS-Familie (anion cation symporter), 2.A.1.14 (PAO *et al.*, 1998; ROTH *et al.*, 2004), zugeordnet werden (Abb. 3.1). Permeasen dieser Gruppe katalysieren den Transport organischer und anorganischer Anionen. Höchste strukturelle Homologien weist *AtANTR5* zu den tierischen Proteinen dieser Familie, wie den vesikulären Glutamat-Transporter 1-3, den Natrium-Phosphat-Transporter1, oder den Sialintransporter, auf. Wie im Aminosäurealignment (Abb. 3.1) zu sehen ist, besitzen alle dargestellten Proteine 12 vorhergesagten Transmembrandomänen sowie das typische 7-Aminosäuren-Motiv, wobei OcNPT1 und *AtANTR5* durch Substitution eines Glutamats (E) durch ein Glutamin (Q) auffallen. Unter einander weichen diese Proteine besonders in der Länge der C- und N-Termini ab. C- oder N-terminale Aminosäuresequenzen dienen oft der Zielsteuerung eines Proteins nach Translation in die Organellen einer eukaryotischen Zelle. Die bereits charakterisierten Proteine sind in unterschiedlichen Organellen lokalisiert. Während *HsVGLUT1* in den Vesikeln glutamatergen Neuronen zu finden ist, konnten *HsSialin* in der Lysosomenmembran und OcNPT1 in der Plasmamembran lokalisiert werden (BELLOCCHIO *et al.*, 2000; MANCINI *et al.*, 1991; VERHEIJEN *et al.*, 1999).

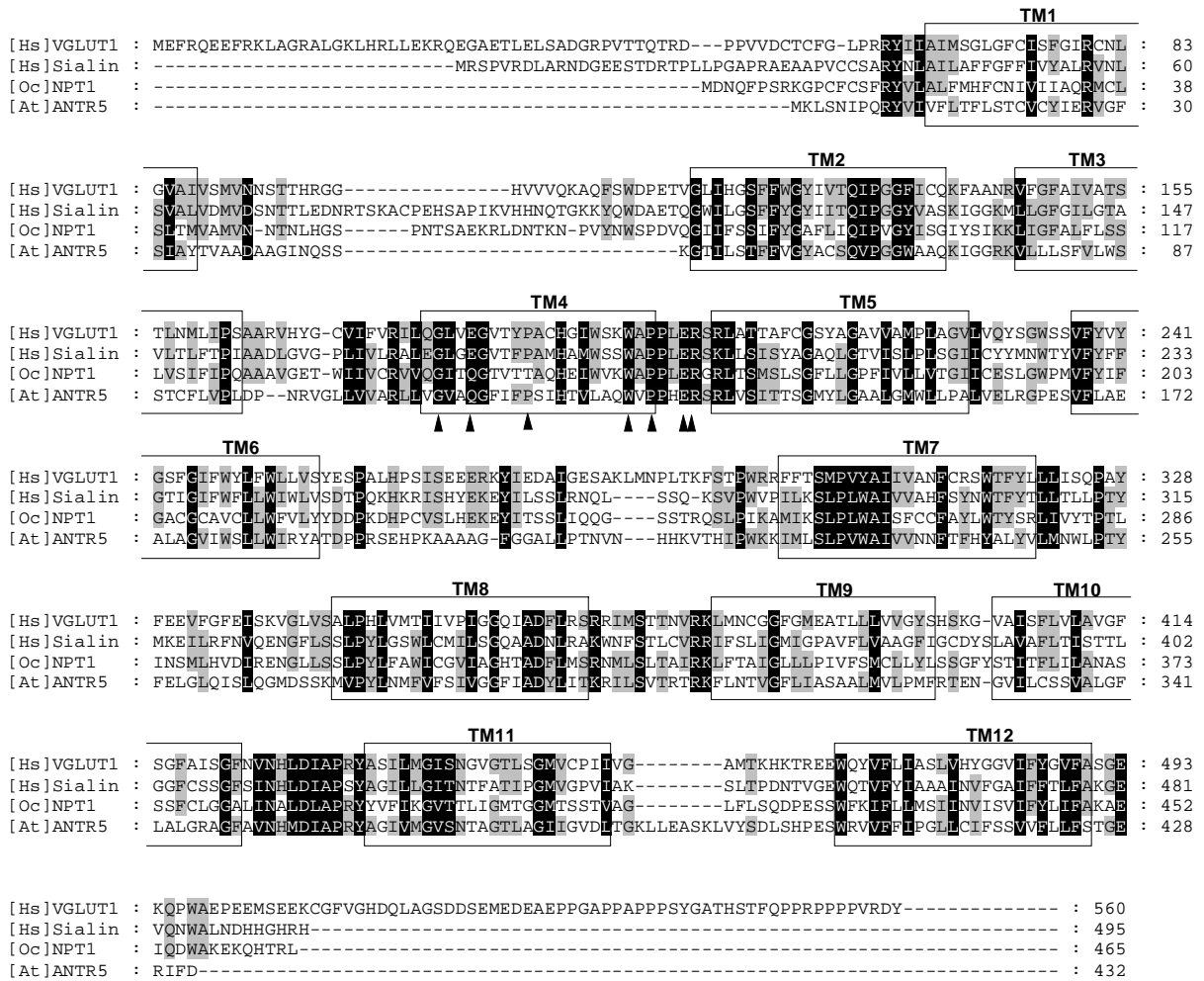


Abbildung 3.1: Aminosäurealignment von *AtANTR5*, *OcNPT1*, *HsSialin* und *HsVGLUT1*. Identische Aminosäuren sind durch schwarze Boxen, ähnliche Aminosäuren durch graue Boxen dargestellt. Die Rahmen TM1-TM12 zeigen die putativen, hydrophoben Transmembrandomänen. Aminosäuren, die mit einem schwarzen Dreieck gekennzeichnet sind, stellen die Konsensussequenz der ACS-Familie dar. Die Bezeichnungen der Proteine sind links und die Aminosäurepositionen sind rechts dargestellt.

Die C- und N-Termini des *AtANTR5* sind verkürzt und weisen keine Ähnlichkeit zu den genannten Proteinen auf, was möglicherweise in einer anderen zellulären Lokalisierung oder in der unterschiedlichen Herkunft der Proteine aus tierischen und pflanzlichen Organismen begründet ist. Die Sequenzähnlichkeiten unter den analysierten Proteinen sind in der Tabelle 3.1 dargestellt. Mit einem Anteil von 24% identischer bzw. 43% ähnlicher Aminosäuren weist *HsSialin* höchste Homologie zu *AtANTR5* auf. *HsVGLUT1* hat einen geringfügig kleineren Anteil identischer (22%) bzw. ähnlicher (39%) Aminosäuren. Zum Protein *OcNPT1* weist *AtANTR5* mit 20% geringste Identität auf, die Ähnlichkeit beträgt 40%. Zwar weisen die Proteine *HsVGLUT1*, *HsSialin* oder *OcNPT1* unter allen bisher charakterisierten Proteinen höchste Homologie zu *AtANTR5* auf, die jedoch verhältnismäßig gering ausfällt, um eine Aussage über seine Funktion zu treffen.

Tabelle 3.1: Prozentualer Anteil identischer und ähnlicher Aminosäuren von *AtANTR5*, *OcNPT1*, *HsSialin* und *HsVGLUT1*.

	Identität/Ähnlichkeit [%]			
	<i>HsVGLUT1</i>	<i>HsSialin</i>	<i>OcNPT1</i>	<i>AtANTR5</i>
<i>HsVGLUT1</i>		31/49	24/41	22/39
<i>HsSialin</i>			34/53	24/43
<i>OcNPT1</i>				20/40
<i>AtANTR5</i>				

3.2 Phylogenetische Analysen der ANTR-Proteinfamilie aus *Oryza sativa*

AtANTR-Proteine stellen eine neuartige Proteingruppe dar, deren physiologische Funktion bislang ungeklärt bleibt. Bisher wurden auch keine homologen Proteine aus anderen Pflanzen charakterisiert. Durch Datenbankrecherchen konnte allerdings eine Proteinfamilie in *Oryza sativa* (Reis) mit hoher Ähnlichkeit zur *AtANTR*-Familie identifiziert werden. Diese Proteinfamilie von *Oryza sativa* besteht insgesamt aus 7 Mitglieder, die auf den folgenden Loci im Reisgenom lokalisiert sind, Os11g08370, Os12g07970, Os01g17240, Os09g39680, Os01g63290, Os05g37820, Os09g38410. Mit Hilfe von Analysen der phylogenetischen Beziehungen und Aminosäuresequenzen konnten die einzelne Proteine den jeweiligen Homologen der *AtANTR*-Familie zugeordnet werden. Jedes der Reis-Proteine weist einen hohen Verwandtschaftsgrad zum einem der ANTR-Gruppe aus *A. thaliana* auf, wobei zwei Proteine der Genom-Loci Os11g08370 und Os12g07970 höchste Ähnlichkeit mit *AtANTR5* besitzen.

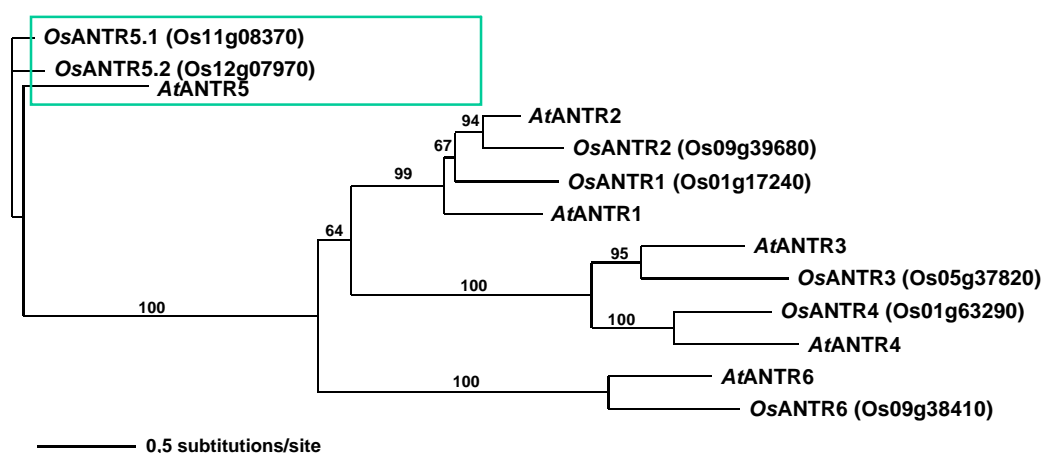


Abbildung 3.2: Phylogenetische Beziehung der ANTR-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*. Die Berechnung des wurzellosen Stammbaumes wurde mit dem Programm PAUP[®] unter Verwendung des GTR+G-Substitutionsmodells (HALL, 2004) durchgeführt. „Bootstrap“-Werte sind Prozentwerte von 1000 Wiederholungen. Die Gruppe der ANTR5-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* ist blau umrandet.

Anhand der Sequenzanalysen (siehe Anhang, Kap. 8.2) und des phylogenetischen Stammbaums (Abb. 3.2) wurden die 7 Proteine aus *Oryza sativa* den entsprechenden AtANTR-Proteinen zugeordnet und werden weiter folgendermaßen bezeichnet OsANTR1 (Os01g17240), OsANTR2 (Os09g39680), OsANTR3 (Os05g37820), OsANTR4 (Os01g63290), OsANTR5.1 (Os11g08370), OsANTR5.2 (Os12g07970), OsANTR6 (Os09g38410). In der Abbildung 3.3 ist ein Aminosäurealignment von AtANTR5, OsANTR5.1 und OsANTR5.2 zu sehen.

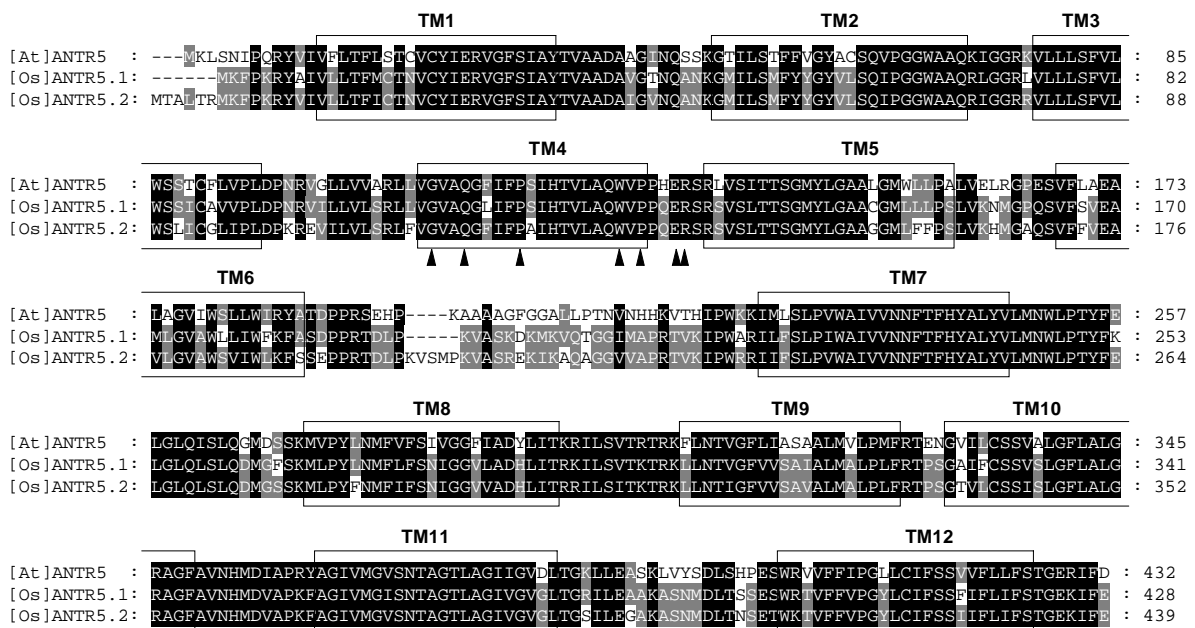


Abbildung 3.3: Aminosäurealignment von AtANTR5, OsANTR5.1 und OsANTR5.2. Identische oder ähnliche Aminosäuren sind durch schwarze Boxen, konservierte Aminosäuren durch graue Boxen dargestellt. Die Vierecke TM1-TM12 zeigen die putativen, hydrophoben Transmembrandomänen. Aminosäuren, die mit einem schwarzen Dreieck gekennzeichnet sind, stellen Konsensussequenz der ACS-Familie dar. Die Bezeichnung der Proteine sind links und Aminosäurepositionen sind rechts dargestellt.

Der Aminosäurealignment (Abb. 3.3) weist eine hohe Homologie zwischen den untersuchten Proteinen auf. Die Sequenzanalyse ergab 68% identische und 83% ähnliche Aminosäuren bei AtANTR5 und OsANTR5.1, sowie 65% identische und 83% ähnliche Aminosäuren bei AtANTR5 und OsANTR5.2. Wie AtANTR5 weisen auch diese beiden Proteine aus *Oryza sativa* das typische 7-Aminosäuren-Motiv auf, wobei diese Konsensussequenz der ACS-Familie bei diesen Reis-Proteinen genau wie bei AtANTR5 und OcNPT1 durch Substitution der zweiten Aminosäure, eines Glutamats (E), durch ein Glutamin (Q) eine Abweichung von *HsVGLUT1* und *HsSialin* darstellt (Kap. 3.1, Abb. 3.1). Weiterhin besitzen OsANTR5.1 und OsANTR5.2 wie AtANTR5 kein N-terminales Transitpeptid und unterscheiden sich dadurch von den übrigen Proteinen der Reis-Familie (Anhang, Kap. 8.2). Darüber hinaus weisen OsANTR5.1, OsANTR5.2 und AtANTR5 die gleiche Genstruktur auf, die aus einem Exon besteht. Im Gegensatz dazu sind die Gene aller anderen ANTR-Proteine aus *A. thaliana* und *O. sativa* aus 4-15 Exons zusammengesetzt.

3.3 Biochemische Charakterisierung von *AtANTR5*

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den Transportern der NaPi1-Familie wurden Phosphat, Chlorid, Glutamat oder organische Säuren als potentielle Transportsubstrate für *AtANTR*-Proteine postuliert (ROTH *et al.*, 2004). Der Einsatz heterologer Expressionssysteme ermöglicht biochemische Charakterisierung einzelner *AtANTR*-Isoformen. Von ROTH *et al.*, (2004) wurden bereits einige Transportstudien an *AtANTR1* und *AtANTR2* durchgeführt. Da diese Proteine plastidäre Lokalisierung aufweisen wurden *AtANTR1* und *AtANTR2* mit und ohne Transitpeptid im heterologen Hefe-System exprimiert und an ganzen Zellen oder im artifiziellen Liposomensystem biochemisch charakterisiert. Jedoch konnte für keinen der Substrate wie Chlorid, Phosphat, Glutamat oder Glutamin Transportaktivität nachgewiesen werden (ROTH *et al.*, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Transporteigenschaften des *AtANTR5*-Proteins untersucht werden. Zur biochemischen Charakterisierung von *AtANTR5* wurde mit unterschiedlichen heterologen Expressionssystemen wie *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* gearbeitet. Dazu wurde die cDNA von *AtANTR5* in die geeignete Expressionsvektoren kloniert, was die Synthese des Fremdproteins in dem heterologen Organismus erlaubt (FROMMER & NINNEMANN, 1995). Die genaue Herstellung der Konstrukte zur heterologen Expression in *E. coli* und *S. cerevisiae* ist im Kapitel 8.3.1 (Anhang) beschrieben. Für die heterologe Expression in *P. pastoris* wurde das Konstrukt pNB7 verwendet (BENTEL, 2006). Zur Untersuchung der Transporteigenschaften wurden Aufnahmestudien an ganzen Zellen oder im Liposomensystem mit den Substraten Phosphat, Glutamat, Glutamin oder Methyl-Ammonium durchgeführt. Jedoch konnte für keine der getesteten Substanzen Transportaktivität nachgewiesen werden. Jedes der verwendeten Systemen hat Vor- und Nachteile, dass es möglicherweise für das rekombinante *AtANTR5*-Protein keine optimalen Bedingungen lieferte. Zwar haben *E. coli*-Zellen nur eine Membran, so dass die heterologen Transportproteine dort inseriert werden und Aufnahmeexperimente an ganzen Zellen ermöglichen, sie besitzen aber kein komplexes Prozessierungs- oder Glycosylierungssystem wie es für Funktionalität vieler sekretorischer Proteine eukariotischer Organismen notwendig ist. Hefe wie *P. pastoris* oder *S. cerevisiae* stellen eukariotische Expressionssysteme dar, die korrekte Glycosylierung und Faltung der Proteine erlauben, aber auch zum Targeting der Proteine in Endomembranen führen können, womit keine Aufnahmen an ganzen Zellen möglich sind. Aufgereinigten Proteine können weiter im Liposomensystem rekonstituiert werden, das allerdings kein Membranpotential, oder Ionengradienten natürlicher Organellen besitzt, was aber für Funktionalität vieler Proteine notwendig ist. Eine fehlende Transportaktivität von *AtANTR5* für getestete Substrate kann demnach durch nicht optimalen Bedingungen verursacht sein,

womit Phosphat, Glutamat, Glutamin oder Methyl-Ammonium als Transportsubstrate nicht völlig ausgeschlossen werden können.

Da die Aufnahmeexperimente keine Hinweise im Bezug auf die physiologische Bedeutung von *AtANTR5* lieferten, sollen nun mit Hilfe von Lokalisierungsstudien, Expressionsanalysen und der reversen Genetik neue Erkenntnisse über seine Rolle im pflanzlichen Metabolismus gewonnen werden.

3.4 Subzelluläre Lokalisierung von *AtANTR5*

Für *AtANTR1* und *AtANTR2* konnte bereits die plastidäre Lokalisierung nachgewiesen werden (ROTH *et al.*, 2004). Des weiteren wurde mit Hilfe der computergestützter Sequenzanalysen auch für andere Proteine der ANTR-Familie putative Plastidtargetsequenzen gefunden (ROTH *et al.*, 2004). In Hinsicht auf *AtANTR5* haben Aminosäuresequenzanalysen gezeigt, dass dieses Protein sich besonders durch das Fehlen der N-terminalen Signalsequenz von den anderen ANTR-Proteinen unterscheidet. Mit Hilfe der Computerprogramme Target-P (EMANUELSSON *et al.*, 2000) und Signal-P (NIELSON *et al.*, 1997) wurde eine subzelluläre Lokalisierung von *AtANTR5* im sekretorischen Weg vorhergesagt. Aufgrund dieser Analysen und des Fehlens einer N-terminalen Plastidtargetsequenz bei *AtANTR5* wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die subzelluläre Lokalisierung von *AtANTR5* detailliert untersucht.

3.4.1 Analyse der subzellulären Lokalisierung von *AtANTR5* mittels GFP-Fusion und transienter Expression in isolierten Protoplasten von *N. tabacum*

Untersuchungen zur Lokalisierung von *AtANTR5* wurden mit Hilfe von GFP (*green fluorescence protein*) durchgeführt. Ursprünglich konnte GFP aus einer Quallenart, *Aequorea victoria*, erfolgreich isoliert, kloniert und anschließend in heterologen Organismen exprimiert werden (CHALFIE *et al.*, 1994; PRASHER *et al.*, 1992; SHIMOMURA *et al.*, 1962). GFP dient nun standardmäßig zur Charakterisierung rekombinanter Proteine in vielen biologischen Systemen (BRANDIZZI *et al.*, 2003). Nach Anregung mit UV-Licht bei $\lambda=488$ nm kann die Fluoreszenz des GFP-Proteins bei $\lambda=509$ nm detektiert werden.

Zur Untersuchung der Lokalisierung wurde *AtANTR5::GFP*-Fusionskonstrukt hergestellt. Dabei wurde der Voll-Längenklon von *AtANTR5* ohne Stopcodon mit dem GFP im offenen Leseraster so fusioniert, dass sich das GFP C-terminal zum *AtANTR5* befindet. Die genaue Herstellung des Konstruktes ist im Kapitel 8.3.2 (Anhang) beschrieben. Das fertige Konstrukt (pLL3) wurde in isolierte Protoplasten von *N. tabacum* transformiert und die Fluoreszenz durch Verwendung des konfokalen Laserscanning-Mikroskops ausgewertet.

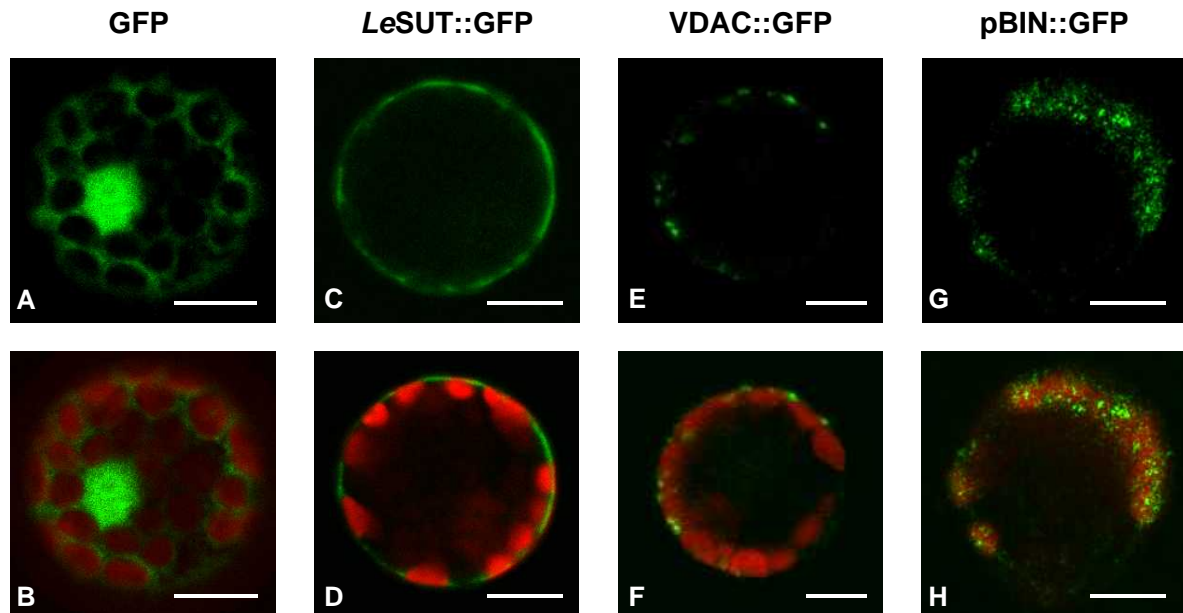


Abbildung 3.4: Fluoreszenzaufnahmen transformierter Protoplasten von *N. tabacum*. A, B: Protoplasten transformiert mit pGFP2; C, D: Protoplasten transformiert mit *LeSUT::GFP*; E, F: Protoplasten transformiert mit *VDAC::GFP*; G, H: Protoplasten transformiert mit *pBIN::GFP*; A, C, E, G: Fluoreszenz des GFP-Proteins (grün); B, D, F, H: Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot) und Fluoreszenz des GFP-Proteins (grün). Teilstrich: 10 μm .

Für die Lokalisierungsanalysen wurden neben den *AtANTR5::GFP*-Fusionskonstrukt mehrere Kontrollen verwendet (Abb. 3.4). Auf eine Chloroplasten-Kontrolle wurde verzichtet, da die Chloroplasten rote Autofluoreszenz aufweisen und so zur Co-Lokalisierung mit dem Zielprotein herangezogen werden können.

Ohne Fusion ist das GFP-Protein 27 kDa gross und ist nicht in der Lage die Membranen der Zellorganellen mit Ausnahme der Kernporen zu überqueren (GREBENOK *et al.*, 1997). Deshalb akkumuliert GFP hauptsächlich im Kern und im Cytosol der Protoplasten (Abb. 3.4 A, B). Die GFP-Fluoreszenz im Cytosol ist gleichmäßig verteilt und weist keine Strukturen auf. Als Kontrolle für die Plasmamembran diente *LeSUT*, ein plasmamembranständiger Saccharosetransporter aus *Lycopersicon esculentum* L. (WARD *et al.*, 1998). Das *LeSUT::GFP*-Fusionsprotein akkumuliert coronaförmig in der Plasmamembran des Protoplasten (Abb. 3.4 C, D). Bei der Mitochondrienkontrolle, *VDAC* (voltage dependent anion channel), handelt es sich um einen in der Mitochondrienmembran lokalisierten spannungsabhängigen Anionenkanal (CLAUSEN *et al.*, 2004). Die Grüne Fluoreszenz des *VDAC::GFP*-Proteins markiert punkartige Strukturen (Abb. 3.4 E, F). Zur Visualisierung der Strukturen des endoplasmatischen Retikulum wurde das Konstrukt *pBIN::GFP* als ER-Kontrolle eingesetzt, das freundlicherweise von Prof. Antje von Schaewen (Universität Münster) zur Verfügung gestellt wurde. Hier sind die fluoreszierenden Strukturen diffus im Protoplasten verteilt (Abb. 3.4 G, H).

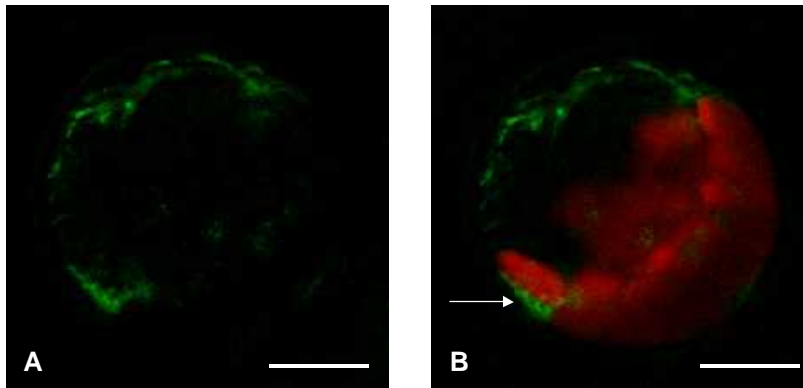


Abbildung 3.5: Fluoreszenzaufnahme des mit *AtANTR5::GFP* transformierten Protoplasten von *N. tabacum*. **A:** Fluoreszenz des *AtANTR5::GFP*-Proteins (grün); **B:** Autofluoreszenz der Chloroplasten (rot) und Fluoreszenz des *AtANTR5::GFP*-Proteins (grün); weißer Pfeil kennzeichnet die grüne Fluoreszenz zwischen der Plasmamembran und dem Chloroplasten. Teilstrich: 10 μm .

Abbildung 3.5 zeigt die Akkumulation der *AtANTR5::GFP*-Proteine in den transformierten Tabakprotoplasten. Die fluoreszierenden Strukturen des *AtANTR5::GFP* haben eine netzförmige bzw. fadenförmige Struktur (Abb. 3.5 A, B). Diese Strukturen weisen keine Ähnlichkeiten mit den Kontrollen *LeSUT::GFP*, *VDAC::GFP* oder *pBIN::GFP* auf (Abb. 3.4). Weiterhin ist zu beobachten, dass die grüne Fluoreszenz des Fusionsproteins nicht deckungsgleich mit Chloroplasten ist, die eine rote Autofluoreszenz des Farbstoffs Chlorophyll aufweisen. Aufgrund der fehlenden Überlagerung der grünen und der roten Fluoreszenz kann eine chloroplastidäre Zielsteuerung von *AtANTR5* ausgeschlossen werden. Die Lokalisierung des *AtANTR5* im Tonoplasten ist ebenfalls unwahrscheinlich. In vegetativen Geweben nimmt die Zentralvakuole ca. 80% des Zellvolumens und damit den größten Raum der Zelle ein (WINTER *et al.*, 1994; MARTY, 1999). Die Vakuole liegt kugelförmig im Protoplasten vor und drückt die Chloroplasten und anderen Zellorganellen an die Plasmamembran, was am Hohlraum in der Mitte der Zelle erkennbar ist (Abb. 3.5). Die Fluoreszenz von *AtANTR5::GFP* ist zwischen einem Chloroplasten und Plasmamembran lokalisiert (weißer Pfeil, Abb. 3.5 A), womit der Tonoplast vermutlich nicht der Zielort des Proteins ist. Die diffuse Fluoreszenz des *AtANTR5::GFP* deutet auf eine mögliche sekretorische Verteilung in der Zelle, wie z. B. in Vesikeln oder im Golgi-Apparat, hin. Auch eine Lokalisierung des Proteins in Peroxisomen kann nicht ausgeschlossen werden. Da anhand der vorliegenden Analysen keine eindeutige subzelluläre Lokalisierung von *AtANTR5* festgestellt werden konnte, soll diese mit Hilfe der transienten Expression in *Arabidopsis*-Suspensionskulturen analysiert werden.

3.4.2 Analyse der subzellulären Lokalisierung von *AtANTR5* mittels GFP-Fusion und transienter Expression in *Arabidopsis*-Suspensionszellkulturen

Durch die weiteren Untersuchungen an *Arabidopsis*-Suspensionszellkultur soll die mögliche Lokalisierung von *AtANTR5* im Golgi-Apparat oder Peroxisomen überprüft werden. Mit Hilfe

eines zweiten Fluoreszenzproteins, DsRed, wird durch Co-Transformation eine Co-Lokalisierung der rekombinanten Proteine mit den Kontrollen ermöglicht. Neben Quallen besitzen vor allem Korallen (*Anthozoa*) fluoreszierende Proteine, von denen bereits über 30 verschiedene Vertreter isoliert, kloniert und charakterisiert wurden (MATZ *et al.*, 1999). DsRed stammt von *Discosoma sp.*, ist 28 kDa groß und besitzt ein Excitationsmaxima bei $\lambda=558\text{nm}$ und ein Emissionsmaxima bei $\lambda=583\text{nm}$. ST::DsRed, eine Sialyltransferase fusioniert mit DsRed, diente während der Co-Transformation als Marker für den Golgi-Apparat (BRANDIZZI *et al.*, 2004; SAINT-JORE *et al.*, 2002; WEE *et al.*, 1998). Als Peroxisomenmarker wurde SKL22::DsRed verwendet, das freundlicherweise von Prof. Ian Small, Evry, zur Verfügung gestellt wurde. Das C-terminale SKL-Motiv stellt die typische Targetingsequenz peroxisomaler Matrixproteine dar, und wurde als PTS1 (peroxisomal targeting signal typ 1) klassifiziert (GOULD *et al.*, 1989; REUMANN, 2004; REUMANN *et al.*, 2004).

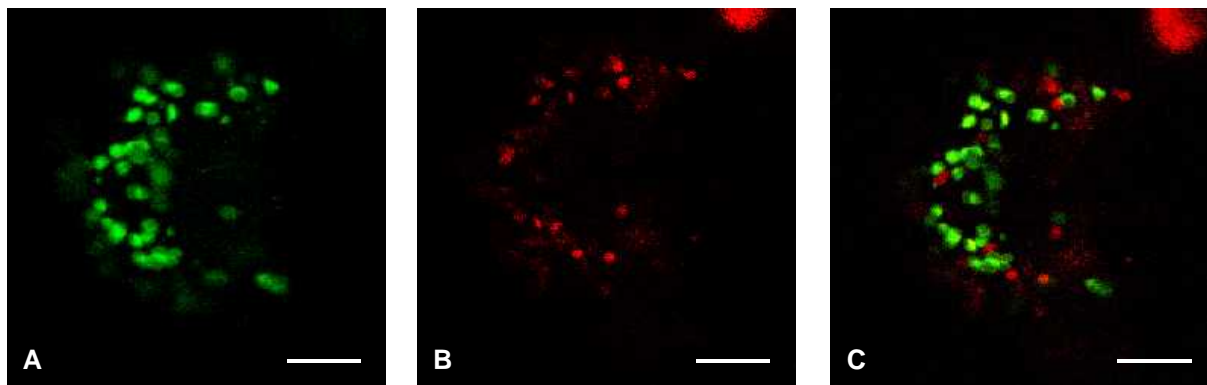


Abbildung 3.6: Fluoreszenzaufnahme der *AtANTR5::GFP* und *SKL22::DsRed* (Marker für Peroxisomen) nach transienter Expression in *Arabidopsis*-Suspensionszellkultur. A: Fluoreszenz von *AtANTR5::GFP*; B: Fluoreszenz von *SKL22::DsRed*; C: Überlagerung der Fluoreszenzen von *AtANTR5::GFP* und *SKL22::DsRed*. Teilstrich: 8 μm .

Die Abbildung 3.6 zeigt die Verteilung der grünen Fluoreszenz des *AtANTR5::GFP*-Proteins (Abb. 3.6 A) sowie der roten Fluoreszenz des *SKL22::DsRed* (Abb. 3.6 B). Bei der Überlagerung der beiden Signale (Abb. 3.6 C) wird deutlich, dass die beiden fluoreszierenden Markerproteine GFP und DsRed jeweils unterschiedliche Strukturen markiert haben, die nebeneinander in der Zelle vorliegen. *AtANTR5::GFP* und *SKL22::DsRed* stimmen in ihrem Deckungsbild nicht überein, womit das Zielort von *AtANTR5* nicht in Peroxisomen zu finden ist. Aufnahmen des Protoplasten in der Abbildung 3.7 zeigen die Fluoreszenzsignale der Co-Transformation mit *AtANTR5::GFP* und ST::DsRed.

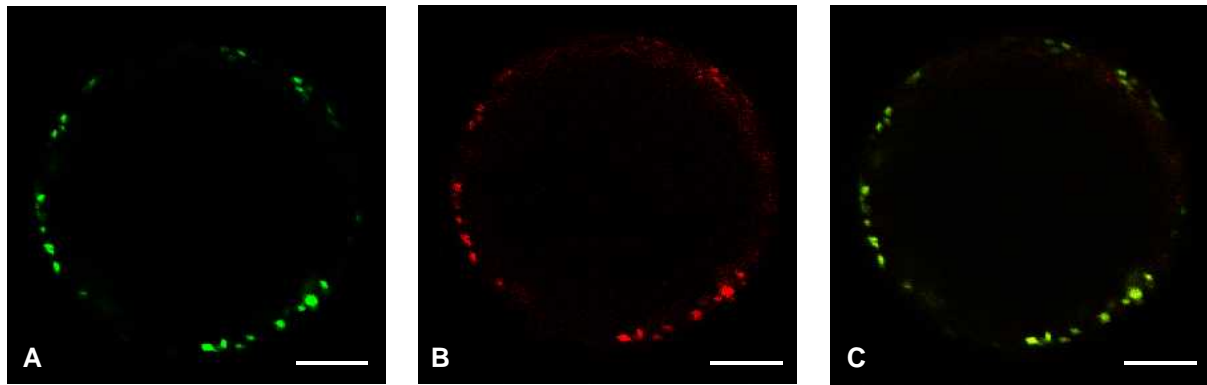


Abbildung 3.7: Fluoreszenzaufnahme der *AtANTR5::GFP* und *ST::DsRed* (Marker für Golgi-Apparat) nach transienter Expression in *Arabidopsis*-Suspensionszellkultur. **A:** Fluoreszenz von *AtANTR5::GFP*; **B:** Fluoreszenz von *ST::DsRed*; **C:** Überlagerung der Fluoreszenzen von *AtANTR5::GFP* und *ST::DsRed*. Teilstrich 8 μm .

Die grüne Fluoreszenz (Abb. 3.7 A) ist in punkartigen Formationen am Rande des Protoplasten zu erkennen. Der große Hohlraum in der Mitte stellt die Zentralvakuole dar, die alle Organellen an die Plasmamembran der Zelle gedrückt hat. Fast die gleiche Verteilung weist auch die rote Fluoreszenz von *ST::DsRed* auf (Abb. 3.7 B), welche die Strukturen des Golgi-Apparats kennzeichnet. Wie man in der Abbildung 3.7 C sehen kann, stimmt die Fluoreszenz von *AtANTR5::GFP* und *ST::DsRed* bei der Überlagerung der Signale überein. Durch die Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz vermischen sich beide Signale, wodurch die gelbe Farbe entsteht. Die beiden Muster sind deckungsgleich, was auf die Lokalisierung der Proteine im gleichen Organell der Zelle zurückzuführen ist. Diese Analysen deuten auf die subzelluläre Lokalisierung von *AtANTR5* im Golgi-Apparat hin.

3.5 Herstellung der *AtANTR5*-c-Myc-Tag-Pflanzen

Mittels *AtANTR5::GFP*-Fusionproteins konnten Hinweise auf eine intrazelluläre Lokalisierung von *AtANTR5* im Golgi-Apparat gewonnen werden. Zur Bestätigung der *AtANTR5*-Lokalisierung mit Hilfe von Immuno-Gold-Labeling in Gewebeschnitten wurden *AtANTR5*-c-Myc-Pflanzen hergestellt. Dabei wurde die *AtANTR5*-Sequenz am C-Terminus um 10 Aminosäuren (c-Myc-Tag) erweitert und unter die Kontrolle des CaMV-35S-Promotors und OCS-Terminators gestellt. Die Herstellung des *AtANTR5*-c-Myc-Konstruktes, pLL14 ist im Detail im Kapitel 8.3.3 beschrieben. In solchen transgenen Pflanzen wird *AtANTR5*-c-Myc konstitutiv exprimiert, so dass das synthetisierte Protein mit einem spezifischen Anti-c-Myc-Tag-Antikörper nachgewiesen werden kann.

Die Transformation der *Arabidopsis* Pflanzen erfolgte durch Verwendung der floralen Dip-Methode. Pflanzen, die das *AtANTR5*-c-Myc-Konstrukt enthielten, konnten über eine erworbene Kanamycin-Resistenz selektiert werden, wobei insgesamt 17 unabhängige Linien entstanden. Die identifizierten *AtANTR5*-c-Myc-Expressionsmutanten wurden auf ihren Transkriptgehalt im Blattmaterial mittels „Northern-Blot“-Analysen überprüft. Als Sonde

wurde der C-terminale Bereich von *AtANTR5-c-Myc* inklusive c-Myc-Tag eingesetzt. In Abbildung 3.8 ist das Ergebnis der „Northern-Blot“-Analyse gezeigt.

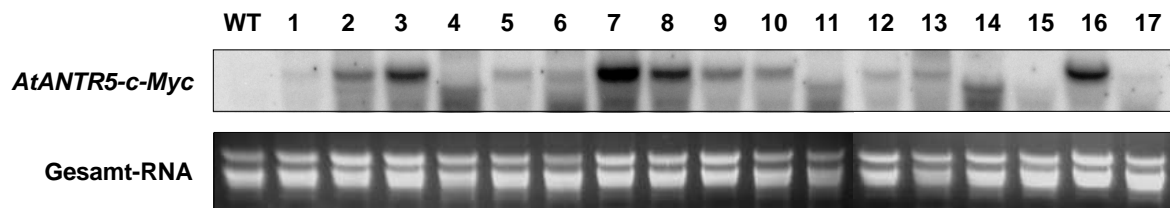


Abbildung 3.8: „Northern-Blot“-Analysen zur Untersuchung der Expression von *AtANTR5-c-Myc* in Expressionsmutanten 1-17. WT: Wildtyppflanzen; 1-17 entsprechen den *AtANTR5-c-Myc*-Expressionslinien 1-17. Pro Spur wurden 10 μg Gesamt-RNA aufgetragen. Gesamt-RNA dient als Beladungskontrolle des Agarosegels.

Durch die „Northern-Blot“-Analysen konnten die Linien 3, 7, 8, und 16 als Überexpressionsmutanten identifiziert werden, die hohe *AtANTR5-c-Myc*-mRNA-Gehalte in den Blättern akkumulierten. Bei den übrigen *AtANTR5-c-Myc*-Expressionsmutanten waren die Detektionssignale deutlich schwächer, was auf geringe Mengen des *AtANTR5.1-c-Myc*-Transkriptes und entsprechend schwächere Expression hindeutet. Bei Wildtyppflanzen, die als Negativkontrolle dienten, konnte keine *AtANTR5-c-Myc*-m-RNA detektiert werden.

Da der mRNA-Gehalt nicht immer mit dem tatsächlichen Gehalt des korrespondierenden Proteins korreliert, wurden im weiteren Verlauf die transgenen Linien 7, 8 und 16 mittels „Western-Blot“-Analyse auf die Proteinexpression überprüft. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der Abbildung 3.9 dargestellt.



Abbildung 3.9: „Western-Blot“-Analyse der *AtANTR5-c-Myc*-Expressionslinien 7, 8 und 16. WT: Wildtyppflanzen. Pro Spur wurde Gesamtmembran mit einem Proteingehalt von 50 μg aufgetragen. *AtANTR5-c-Myc*-Protein wurde mit Hilfe eines Anti-c-Myc-Tag-Antikörpers nachgewiesen.

Bei Wildtyppflanzen konnte mittels Anti-c-Myc-Tag-Antikörper kein Detektionssignal in Gesamt-Membran nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist bei den untersuchten transgenen *AtANTR5-c-Myc*-Überexpressionslinien 7, 8 und 16 eine deutliche Bande zu sehen. Die Proteinbanden sind etwas unterhalb der Höhe von 47,5 kDa zu erkennen, was geringfügig weniger als das theoretische Gewicht 48,5 kDa ist. Solche Unterschiede zwischen der theoretischen und apparenten Proteingröße sind aufgrund hoher Anteile an hydrophoben Aminosäuren bei Membranproteinen nicht ungewöhnlich (PLANO & WINKLER, 1991).

Da die *AtANTR5-c-Myc*-Überexpressionslinie 7 sowohl bei „Northern-Blot“- als auch bei „Western-Blot“-Analysen starke Signale lieferte, ist diese Mutante für Lokalisierungsanalysen am besten geeignet und steht nun für weitere Studien zur Verfügung.

3.6 Expressionsanalyse von *AtANTR5* mittels Promotor-Reporterfusion

Die Analyse der Gewebe- und entwicklungsspezifischen Genexpression in unterschiedlichen kann einen wichtigen Hinweis auf die physiologische Rolle des untersuchten Proteins in der Pflanze liefern. Ein Promotor stellt einen Nukleotidabschnitt vor Start-Codon dar und reguliert die Transkriptionsrate des nachfolgenden Gens. Die Promotor-Reporterfusion stellt eine etablierte Technik um solche Analysen *in planta* wahrzunehmen (JEFFERSON *et al.*, 1997). Für diese Untersuchungen wurde ein *AtANTR5*-Promotor-GUS-Fusionskonstrukt pLL6 hergestellt (siehe Anhang, Kap. 8.3.4). Zur Konstruktherstellung wurde 1037 bp umfassenden *AtANTR5*-Promotorbereich ausgewählt. Um mögliche regulierende Elemente in der Umgebung des Start-Codons zu berücksichtigen, wurden 60 Nukleotide im kodierenden Sequenzabschnitt hinter dem Start-ATG im Leseraster vor das GUS-Gen des pGPTV-Vektors eingebracht.

Nach der Agrobakterien-vermittelten Transformation wurden die transgene Pflanzen mit Hilfe von BASTA, einem Herbizid, selektiert. Die Promotor-Reportergenmutanten exprimieren nun das Strukturgen β -Glucuronidase, das der Kontrolle des *AtANTR5*-Promotors unterliegt und seine Aktivität in jeweiligen Entwicklungsphasen widerspiegelt.

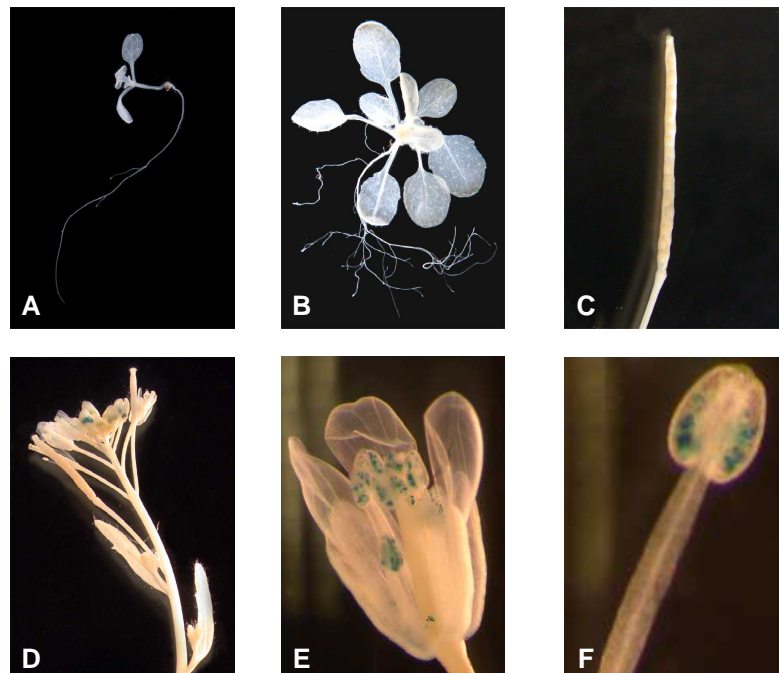


Abbildung 3.10. Histochemischer Nachweis der GUS-Expression unter Kontrolle des *AtANTR5*-Promotors in *Arabidopsis thaliana*. A: 7 Tage alter Keimling B: Rosette einer 3 Wochen alten Pflanze C: Schote D: Sproß, Blüten und Schoten E: Detailaufnahme einer Blüte F: Staubblatt einer Blüte.

Es wurden 15 Linien identifiziert, die eine β -Glucuronidase-Aktivität aufwiesen und lediglich in der Intensität der Färbung variierten. Exemplarisch wurde eine Linie mit charakteristischer Färbung ausgewählt und im Detail in der Abbildung 3.10 dargestellt.

Während der Keimung konnte keine β -Glucuronidase-Aktivität festgestellt werden (Abb. 3.10 A). Auch die Gewebe einer Rosette und des Sprosses, wie junge und alte Blätter, Wurzel, Leit- sowie Meristemgewebe, oder Schoten weisen nur geringe GUS-Aktivität auf (Abb. 3.10 B, C, D). Erhöhte Expression der β -Glucuronidase konnte in den Antheren der Staubblätter lokalisiert werden (Abb. 3.10 E, F). Die GUS-Aktivität war in übrigen Geweben kaum detekterbar. Mit Hilfe von RT-PCR, die eine sensitivere Methode darstellt, konnten jedoch im Blattgewebe der Wildtyppflanzen *AtANTR5*-Transkripte detektiert werden (Kap. 3.7.1, Abb. 3.11 C). Diese Ergebnisse deuten auf eine geringe Expression von *AtANTR5* während der Entwicklung, die unter Detektionsgrenze der GUS-Färbung liegt, jedoch mit anderen sensitiveren Methoden nachweisbar ist.

3.7 Identifizierung und Charakterisierung der *antr5*-Mutante

Mit Hilfe der reversen Genetik soll die Rolle des Membranproteins *AtANTR5* *in vivo* untersucht werden. Reverse Genetik ist eine weit verbreitete Methode in der experimentellen Genetik, wobei mittels Mutagenese das Erbmaterial an einer bestimmten Stelle verändert und untersucht wird, wie sich dies auf den Organismus auswirkt. Aus den beobachteten Veränderungen kann entsprechend auf die Funktion des Gens geschlossen werden. Die Inaktivierung von Genen einer Pflanze erfolgt standardmäßig durch Unterbrechung des Leserasters mittels T-DNA-Insertion. Dadurch unterbleibt die Transkription des betroffenen Gens, womit eine „knock out“-Mutante entsteht (AZPIROZ-LEECHAN & FELDMANN, 1997; KRYSAN *et al.*, 1999).

3.7.1 Molekulare Charakterisierung der *antr5*-Mutante

Eine putativ heterozygote *AtANTR5* „knock out“-Mutante (bezeichnet als *antr5*) wurde von der SAIL-Bibliothek (*Syngenta Arabidopsis Insertion Library*) des Torrey Mesa Research Institute (TMRI, San-Diego, USA) bezogen (SESSIONS *et al.*, 2002). Im Genom der Mutante Garlic_809_B01.1aLb3Fa ist eine T-DNA im Exon von *AtANTR5* inseriert. Die molekulare Charakterisierung der putativen „knock out“-Pflanzen mittels PCR-Analysen soll die T-DNA-Insertionsstelle und die Homozygotie der Mutanten überprüfen.

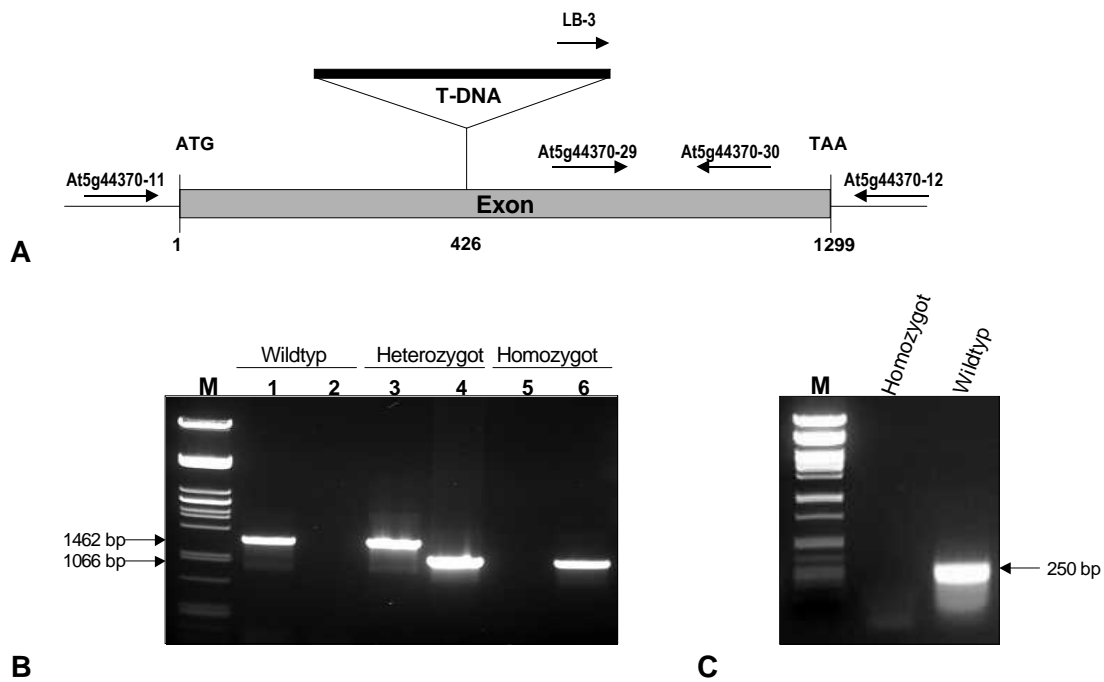


Abbildung 3.11: Molekulare Charakterisierung der *antr5*-„knock out“-Mutante. **A:** schematische Darstellung der T-DNA-Insertion im *AtANTR5*-Gen und Bindstellen der für PCR-Analysen eingesetzten Primer, dargestellt durch Pfeile. **B:** PCR-Analyse auf genomische DNA der Wildtyp-Pflanzen (Spur 1 und 2), heterozygoten (Spur 3 und 4) und homozygoten (Spur 5 und 6) *antr5*-Pflanzen. In Spuren 1, 3, 5 wurde die *AtANTR5*-genspezifische Primerkombination (At5g44370-11/At5g44370-12) und in Spuren 2, 4, 6 die T-DNA-spezifische Primerkombination (LB-3/At5g44370-12) eingesetzt. **C:** RT-PCR-Analyse auf cDNA aus Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen, in beiden Spuren wurden Primer (At5g44370-29/At5g44370-30) verwendet. Durch Pfeile (in B und C) sind die Größen der entstandenen Produkte gekennzeichnet. M: Marker.

Die PCR-Analysen auf genomischer DNA wurden mit Hilfe der genspezifischen und T-DNA-spezifischen Primerkombinationen durchgeführt. Durch den Einsatz der *AtANTR5*-genspezifischen Primer, At5g44370-11/At5g44370-12, (Tab. 2.4), konnte ein Produkt von 1462 bp amplifiziert werden. PCR-Signale dieser Größe sind beim Wildtyp und in heterozygoten Pflanzen, die noch intaktes ein Allel des *AtANTR5*-Gens besitzen, zu erkennen (Abb. 3.11 B, Spuren 1 und 3). Bei der Verwendung der genomischen DNA der homozygoten *antr5*-Pflanzen konnte aufgrund der T-DNA-Insertion kein PCR-Produkt amplifiziert werden (Abb. 3.11 B, Spur 5). Für den Nachweis der inserierten T-DNA in das *AtANTR5*-Gen wurde die Kombination des T-DNA-spezifischen Primer, LB3 mit At5g44370-12, verwendet (Tab. 2.4). Durch diese PCR-Analyse wurde ein Produkt der Größe von 1066 bp bei heterozygoten und homozygoten „knock out“-Pflanzen amplifiziert (Abb. 3.11 B, Spuren 4, 6). Durch Sequenzierung dieses Produktes konnte zudem die Insertionsstelle der T-DNA an Position 426 bp nach dem Start-ATG des *AtANTR5*-Gens ermittelt werden (Abb. 3.11 A). Ferner wurde untersucht, ob durch die Insertion der T-DNA das Unterbrechen des Leserasters des *AtANTR5*-Gens auch zum Fehlen der entsprechenden mRNA führte. Dies wurde mittels RT-PCR auf cDNA von Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen nachgewiesen (Abb. 3.11 C). Mit Hilfe der genspezifischen Primer At5g44370-29 und At5g44370-30 (Tab. 2.4) wurde nur

auf cDNA aus Wildtyppflanzen ein Produkt mit der erwarteten Größe von 250 bp amplifiziert, jedoch nicht bei der cDNA aus *antr5*-Pflanzen. Die Abwesenheit der *AtANTR5*-mRNA in den *antr5*-Pflanzen führt entsprechend zum Fehlen des zugehörigen Proteins.

3.7.2 Phänotyp der homozygoten *antr5*-Mutanten

Die homozygoten *antr5*-Pflanzen zeigen beim Kultivieren auf Erde einen gravierenden Phänotyp im Vergleich zu Wildtypen. Die *antr5*-Pflanzen sind erheblich retardiert im Wachstum und in der Entwicklung. In der Abbildung 3.12 sind die Größenunterschiede der beiden Pflanzen nach 3, 6 bzw. 10 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen auf Erde zu sehen.



Abbildung 3.12: Phänotyp von 3, 6, und 10 Wochen alten Wildtyp und *antr5*-Pflanzen. A: Wildtyppflanzen 3 Wochen alt; B: *antr5*-Pflanzen 3 Wochen alt; C: Wildtyppflanzen 6 Wochen alt; D: *antr5*-Pflanzen 6 Wochen alt; E: Wildtyppflanzen 10 Wochen alt; F: *antr5*-Pflanzen 10 Wochen alt. Pflanzen wurden auf Erde unter Kurztagbedingungen (A, B, C, D) angezogen. Blühinduktion erfolgte unter Langtagbedingungen, nach 8-wöchiger Anzucht im Kurztag (E, F). Teilstrich: 2 cm (A, B, C, D); 4 cm (E, F).

antr5-Mutanten haben zu allen Zeitpunkten der Entwicklung einen bedeutend kleineren Habitus als gleichaltrige Wildtyppflanzen, so dass man in diesem Zusammenhang von einem Zwerg-Phänotyp sprechen kann. Die Form der Blätter ist eingerollt bzw. verdreht (Abb. 3.12 B, D), wodurch keine typische flächige Rosette wie beim Wildtyp entsteht (Abb. 3.12 A, C). Die Entwicklung von Spross, Blüten und Schoten ist verlangsamt (Abb. 3.12 E, F).

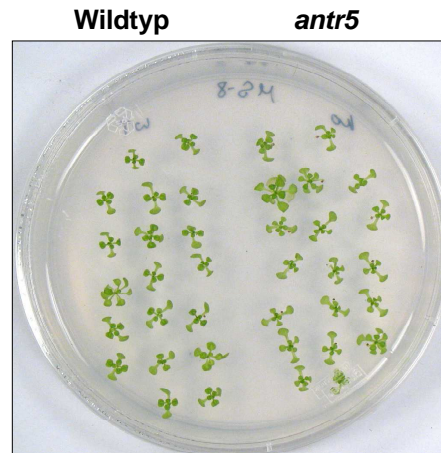


Abbildung 3.13: Phänotyp von 14 Tagen alten Wildtyp und *antr5*-Pflanzen. Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen in Sterilkultur angezogen.

Diese gravierende phänotypische Veränderungen der *antr5*-Pflanzen auf Erde ist jedoch beim Wachstum in Sterilkultur nicht zu beobachten (Abb. 3.13). Die Blätter und der Habitus der Wildtyppflanzen und der Insertionsmutanten zeigen keine auffälligen Unterschiede in der Form oder der Größe.

3.7.3 Komplementation der *antr5*-Mutante

Bei der Herstellung von Insertionsmutanten mit Hilfe von Agrobakterien und dem binären Vektorsystem kann es vorkommen, dass die T-DNA mehrmals ins Genom inseriert wird, wodurch verschiedene Gene inaktiviert werden, die den Phänotyp der „knock out“-Mutanten beeinflussen können. Da keine weitere unabhängige „knock out“-Linie zur Verfügung stand, soll durch Komplementation der *antr5*-Pflanzen der Nachweis erfolgen, dass der beobachtete Phänotyp dieser Mutante auf die Abwesenheit des *AtANTR5*-Proteins zurückzuführen ist. Dabei soll der kodierende Bereich des *AtANTR5*-Gens gemeinsam mit den endogenen Promotor und Terminator in das Genom der *antr5*-Pflanzen eingebracht werden. Die komplementierten Pflanzen besitzen neben dem ursprünglichen inaktivierten Gen eine zusätzliche funktionelle Kopie, die die Transkription ermöglicht und damit möglicherweise den Phänotyp der Mutanten aufhebt.

Für die Komplementation der *antr5*-Pflanzen wurde eine 1257 bp lange Promotorsequenz, sowie der gesamte *AtANTR5* kodierende, 1299 bp lange DNA-Abschnitt gemeinsam mit 361 bp des 5'UTR-Bereichs mittels PCR auf genomischer DNA amplifiziert und in den

Pflanzentransformationsvektor pGreen0029 (Tab. 2.3) kloniert. Das entstandene Konstrukt, pLL7, (Anhang, Kapitel 8.3.5) diente zur Agrobakterien-vermittelten Transformation der *antr5*-Mutanten. Die T-DNA der „knock out“-Mutanten enthält das *bar*-Gen, womit die *antr5*-Pflanzen eine Resistenz gegenüber dem Herbizid BASTA besitzen. Der Pflanzentransformationsvektor pGreen0029 besitzt dagegen das *nptII*-Gen, wodurch die komplementierten *antr5*-Pflanzen eine zusätzliche Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin erlangen und entsprechend selektiert werden können.

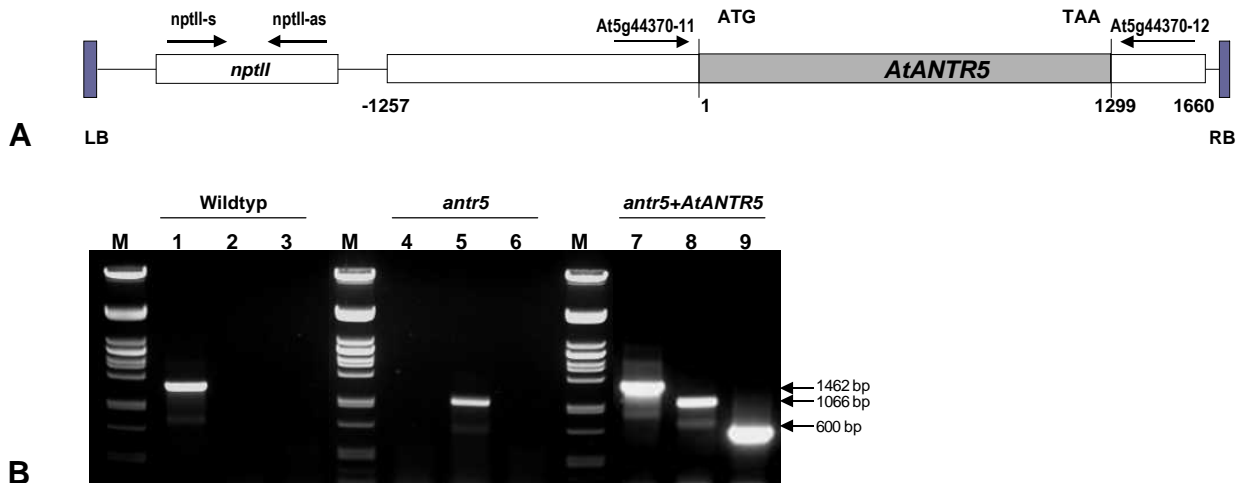


Abbildung 3.14: Molekulare Charakterisierung der komplementierten *antr5+AtANTR5*-Pflanzen. **A:** schematische Darstellung der ins Genom der *antr5*-Pflanzen inserierten Komplementations-*AtANTR5*-DNA und Bindstellen der für PCR-Analysen eingesetzten Primer, dargestellt durch Pfeile; **B:** PCR-Analyse auf genomische DNA der Wildtyp-Pflanzen (Spur 1, 2, 3), *antr5*-Pflanzen (Spur 4, 5, 6) und komplementierten *antr5*-Pflanzen (Spur 7, 8, 9). In Spuren 1, 4, 7 wurde *AtANTR5*-genspezifischen Primerkombination (*At5g44370-11/At5g44370-12*), in Spuren 2, 5, 8 wurden T-DNA-spezifische Primerkombination (*LB-3/At5g44370-12*), in Spuren 3, 6, 9 wurden Kanamycinprimer (*nptII-s/nptII-as*) eingesetzt. Durch Pfeile ist die Größe der entstandenen Produkte gekennzeichnet. M: Marker.

Die komplementierten *antr5*-Mutanten (bezeichnet als *antr5+AtANTR5*) wurden mit Hilfe von PCR-Analysen charakterisiert (Abb. 3.14). Die schematische Darstellung der T-DNA-Insertion der *antr5*-Pflanzen und die eingesetzten Primer für die PCR-Analysen sind der Abbildung 3.11 A (Kap. 3.7.1) zu entnehmen. In der Abbildung 3.14 A ist der Ausschnitt des pLL7-Konstruktes zwischen LB (Left Border) und RB (Right Border) dargestellt, der durch die Transformation ins Genom der *antr5*-Pflanzen inseriert wurde. Die PCR-Analysen auf genomischer DNA wurden mit Hilfe der gen-, T-DNA- und *nptII*-spezifischen Primerkombinationen durchgeführt. Bei Verwendung der genspezifischen Primer (*At5g44370-11/At5g44370-12*, Tab. 2.4) entsteht beim Wildtyp ein 1462 bp großes PCR-Produkt (Abb. 3.14 B, Spur 1). Die T-DNA- und *nptII*-spezifischen Primer (*LB-3/At5g44370-12*, *nptII-s/nptII-as*, Tab. 2.4) ergeben dagegen keine Signale. Bei der PCR-Analyse der genomischen DNA von *antr5*-Pflanzen konnte nur ein T-DNA-spezifisches Produkt amplifiziert werden (Abb. 3.14 B, Spur 5). Bei komplementierten *antr5+AtANTR5*-Mutanten

ist das genspezifische PCR-Produkt, das durch die intakte Genkopie des im Genom inserierten Komplementationskonstruktes entstanden ist, in der Spur 7 zu erkennen. Neben dem T-DNA-spezifischen Bande auf der Höhe von 1066 bp, kann auch das *nptII*-Produkt von 600 bp amplifiziert werden (Abb. 3.14 B, Spur 8, 9).

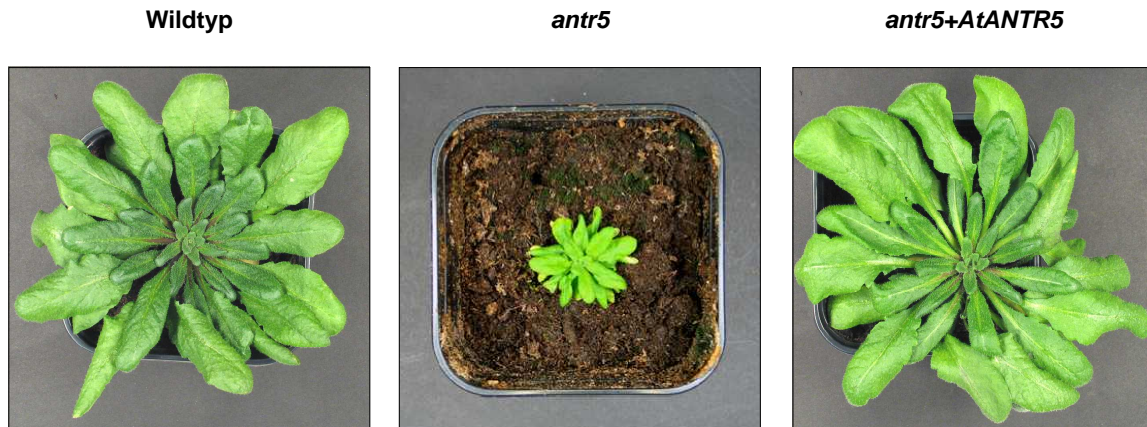


Abbildung 3.15: Phänotyp der *antr5*-Mutanten und der komplementierten *antr5+AtANTR5* Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen nach 8 Wochen Wachstum.

Anhand der molekularbiologischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die komplementierten *antr5*-Pflanzen neben dem durch T-DNA inaktivierten *AtANTR5*-Gen dessen intakte Kopie enthalten. Die Auswertung des Phänotyps dieser Pflanzen ist in der Abbildung 3.15 dargestellt.

Die komplementierten *antr5+AtANTR5*-Pflanzen unterscheiden sich weder im Wachstum noch in der Entwicklung von den Wildtyppflanzen, der zwerghafte Phänotyp der *antr5*-Pflanzen ist vollständig aufgehoben (Abb. 3.15). Die erfolgreiche Komplementation der Mutanten liefert somit den Nachweis, dass den phänotypischen Veränderungen die Inaktivierung des *AtANTR5*-Gens zugrunde liegt.

3.8 Herstellung von *AtANTR5*-„Antisense“-Pflanzen

Für Forschungsarbeiten mit Hilfe der Reversen Genetik ist es von Vorteil mit mehreren unabhängigen Mutanten mit herunterregulierter Expression des betroffenen Gens zu arbeiten, um den beobachteten Phänotyp bestätigen zu können. Aufgrund des Fehlens einer weiteren unabhängigen *AtANTR5*-„knock out“-Linie, wurden zusätzlich zu *antr5+AtANTR5*-Komplementationslinien *AtANTR5*-Antisense-Pflanzen hergestellt. Die „Antisense“-Technologie liefert neben der T-DNA-Insertion eine weitere Möglichkeit die Expression eines Gens zu unterdrücken (BOURQUE, 1995; VAN DER KROL *et al.*, 1988). Um die Aktivität des *AtANTR5*-Proteins zu verringern, wurde korrespondierende cDNA in „antisense“-Orientierung unter Kontrolle des CAMV-35S-Promotors und OCS-Terminators gestellt und ins Genom von *A. thaliana* integriert (Konstrukt pLL9, Kapitel 8.3.6). Dadurch

wird bei der Transkription ein RNA-Strang synthetisiert, der komplementär zu der mRNA des endogenen Gens ist so dass Beide RNA-Spezies miteinander hybridisieren und einen RNA-Doppelstrang bilden. Der RNA-Doppelstrang kann nicht mehr translatiert werden und wird durch Nukleasen abgebaut (ECKER & DAVIS, 1986; JIANG *et al.*, 1994).

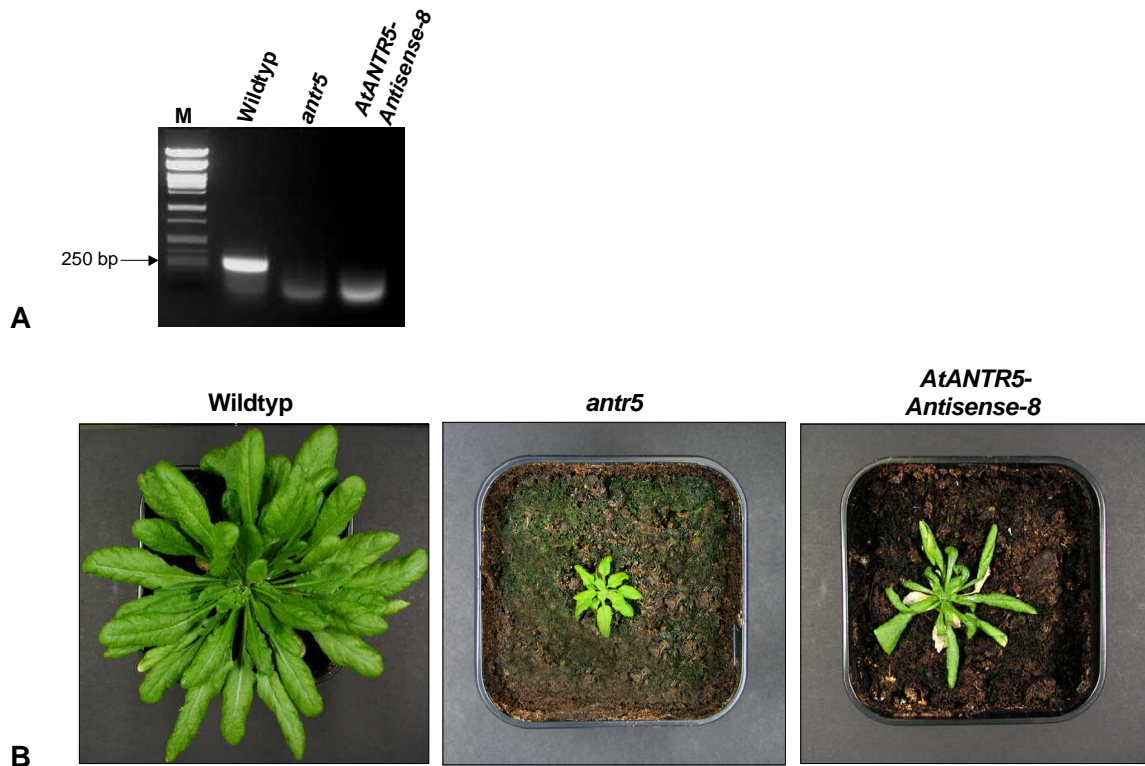


Abbildung 3.16: Molekulare und phänotypische Charakterisierung der *AtANTR5-Antisense-Linie 8*. **A:** RT-PCR-Analyse auf cDNA aus dem Blattgewebe von Wildtyp,- *antr5*-Pflanzen, und *AtANTR5-Antisense-Linie 8* mit den Primern (At5g44370-29/At5g44370-30). Durch Pfeile ist die Größe der entstandenen Produkte gekennzeichnet. M: Marker. **B:** Phänotyp der *AtANTR5-Antisense-Linie 8* im Vergleich zu Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten.

Die Pflanzen, bei denen das Antisensekonstrukt in das Genom integriert wurde, konnten durch Anzucht auf kanamycinhaltigen MS-Agarplatten selektiert werden. Dadurch wurden 26 verschiedene transgene „Antisense“-Linien erhalten, die durch RT-PCR-Analysen auf *AtANTR5*-cDNA näher untersucht wurden. Die stärkste Reduktion der korrespondierenden mRNA konnten bei Linie 8 festgestellt werden. Während die RT-PCR auf cDNA der Wildtyppflanzen mit Hilfe der Primer At5g44370-29 und At5g44370-30 (Tab. 2.4) ein 250 bp großes Produkt ergibt, kann weder auf cDNA der *antr5*-Mutanten noch auf cDNA der *AtANTR5*-antisense-Linie 8 ein Produkt amplifiziert werden (Abb. 3.16 A), was auf eine sehr starke oder fast vollständige Reduktion des *AtANTR5*-Transkripts deutet. Der Phänotyp der *AtANTR5-Antisense-Linie 8* ähnelt sehr stark dem Phänotyp der *antr5*-Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp ein stark retardiertes Wachstum und eingerollte Blätter aufweisen (Abb. 3.16 B). Die *AtANTR5-Antisense-Linie 8* hat einen etwas größeren Habitus als *antr5*-

Mutanten, was möglicherweise auf noch vorhandene, geringe Gehalte der mRNA zurückzuführen ist, wobei diese mit der RT-PCR nicht detektierbar waren.

Weiterhin können hergestellte Antisense-Pflanzen zur physiologischen Untersuchung der Rolle von *AtANTR5* beitragen. Vollständige Inaktivierung des *AtANTR5*-Gens verursacht einen dramatischen Phänotyp bei den betroffenen „knock out“-Mutanten. Antisense-Pflanzen dagegen stellen Dosis-Mutanten dar, die unterschiedlich reduzierte Transkriptmengen eines Gens aufweisen. Die erhaltenen 26 *AtANTR5-antisense*-Linien könnten nun weiterverwendet werden, um unterstützende Analysen zusätzlich zu *AtANTR5*-„knock out“-Mutanten durchzuführen.

3.9 Expression von *OsANTR5.1* in Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten

Neben den „knock out“-Mutanten, die durch Inaktivierung eines Gens Aufschlüsse über dessen Funktion liefern, können auch Überexpressionsmutanten weitere Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung eines Gens beisteuern. Die Effizienz einer Überexpression eines Gens im gleichen Organismus kann aber in Anbetracht des „silencing“ sehr gering sein. Dabei wird das integrierte Gen inaktiviert, so das korrespondierende Protein nicht mehr synthetisiert werden kann (MATZKE & MATZKE, 1995). Das „silencing“-Phänomen beruht auf der Sequenzhomologie des endogenen und des inserierten Gene und kann Inaktivierung beider Gene zur Folge haben, was entsprechend als „cosuppression“ bezeichnet wird (HAVKINS *et al.*, 2000; MATZKE *et al.*, 2001).

Um solche „silencing“-Effekte zu vermeiden, wurde für die Herstellung transgener Überexpressionsmutanten statt der *AtANTR5*-cDNA eine Sequenz aus *Oryza sativa* verwendet. Für die Überexpression wurde *OsANTR5.1* gewählt, da das Protein mit 68% identischen Aminosäuren die höchste Ähnlichkeit zu *AtANTR5* aufweist (Kap. 3.2). Um die funktionelle Verwandtschaft von *AtANTR5* und *OsANTR5.1* zu bestätigen wurde das Reis-Homolog zunächst in *antr5*-Insertionsmutanten überexprimiert. Das Aufheben des Phänotyps durch Komplementation der *antr5*-Pflanzen mit *OsANTR5.1* würde die gleiche Funktion der *AtANTR5*- und *OsANTR5.1*-Proteine bestätigen.

Für die Herstellung der Überexpressionsmutanten wurde der Voll-Längenklon von *OsANTR5.1* ohne Stopcodon mit C-terminalen His-Tag im offenen Leseraster fusioniert. Da das Targeting-Signal sich vermutlich N-terminal befindet, wurde der His-Tag am C-Terminus fusioniert, damit die Zielsteuerung des Proteins nicht affektiert wird. Der His-Tag ermöglichte die Aufreinigung des synthetisierten Proteins aus Überexpressionspflanzen und die Detektion mit einem spezifischen Antikörper. Das *OsANTR5.1-His*-Konstrukt (pNB4) wurde unter die Kontrolle von CaMV-35-S-Promotor und OSC-Terminator gestellt, die eine konstitutive Expression in der Pflanze bewirken (BENTEL, 2006). Dieses Konstrukt enthält das *nptII*-Gen, das den transformierten Pflanzen Resistenz gegenüber Kanamycin verleiht.

entsteht kein *AtANTR5*-genspezifisches PCR-Produkt (Abb. 3.17 B, Spur 7). Neben dem T-DNA-spezifischen Signal (Abb. 3.17, B Spur 8) kann jedoch das *OsANTR5.1*-genspezifische Produkt von 900 bp amplifiziert werden (Abb. 3.17, B Spur 9).

Anhand der molekularbiologischen Analysen konnte bestätigt werden, dass im Genom der komplementierten *antr5+OsANTR5.1-His*-Pflanzen das Konstrukt mit *OsANTR5.1-His* inseriert ist. Die Auswertung des Phänotyps dieser Pflanzen ist in der Abbildung 3.18 dargestellt.

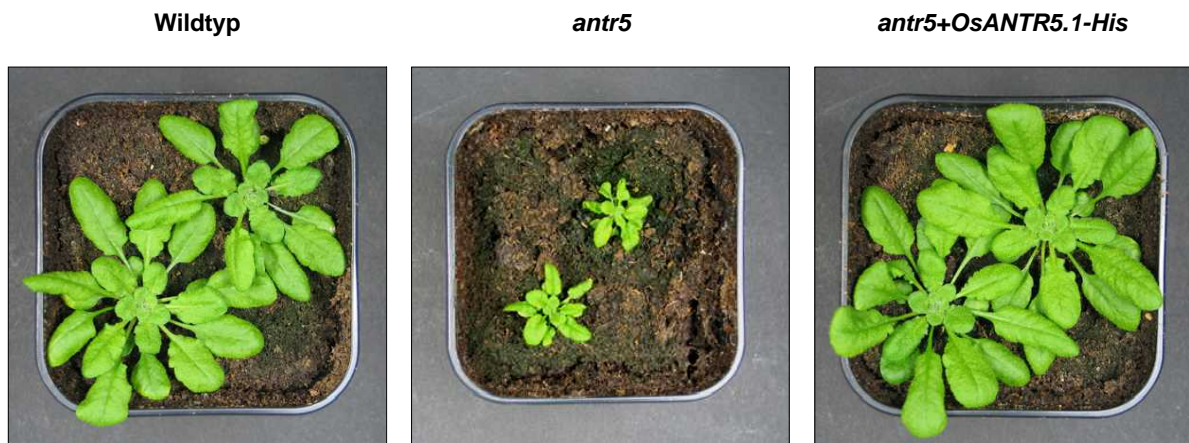


Abbildung 3.18: Phänotyp der *antr5*-Mutanten und der komplementierten *antr5+OsANTR5.1-His* Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen nach 5 Wochen Wachstum.

Die komplementierten *antr5+OsANTR5.1-His*-Pflanzen unterscheiden sich nicht im Wachstum oder Entwicklung von den Wildtyppflanzen, der Phänotyp der *antr5*-Pflanzen ist vollständig aufgehoben (Abb. 3.18).

Durch PCR-Analysen wurde bestätigt, dass das *AtANTR5*-Gen der *antr5+OsANTR5.1-His*-Mutante durch T-DNA inaktiviert bleibt, und das Aufheben des Phänotyps nur durch das *OsANTR5.1-His* aus Reis möglich ist. Der C-terminale His-Tag scheint die Proteinkonformation nicht zu stören, so dass es trotz der Verlängerung um 10 Histidine seine Funktionalität nicht verliert und in der *antr5*-Insertionsmutante das ursprüngliche *AtANTR5*-Protein ersetzt. Hiermit ist die funktionelle Verwandtschaft der beiden Gene nachgewiesen, so dass *OsANTR5.1-His* für die Überexpressionsstudien in Wildtyppflanzen verwendet werden kann.

3.9.2 Expression von *OsANTR5.1* in Wildtyppflanzen

Zur Herstellung der Überexpressionsmutanten wurde das pNB4 Konstrukt (BENTEL, 2006) mit *OsANTR5.1-His* mit Hilfe der *Agrobakterien* ins Genom der Wildtyppflanzen integriert. Pflanzen, die das *OsANTR5.1-His* Konstrukt enthielten, konnten über eine erworbene Kanamycin-Resistenz selektiert werden. Dabei konnten insgesamt 13 unabhängige transgene Linien identifiziert werden, die weiter als *OsANTR5.1-His*-Expressionsmutanten bezeichnet werden. Da die Expression des Gens in den einzelnen Linien variieren kann, wurde zunächst die Akkumulation der *OsANTR5.1*-mRNA in transgenen Pflanzen mittels „Northern-

Blot“-Analysen überprüft. Als Sonde wurde der C-terminale Bereich von *OsANTR5.1* inklusive His-Tag eingesetzt.

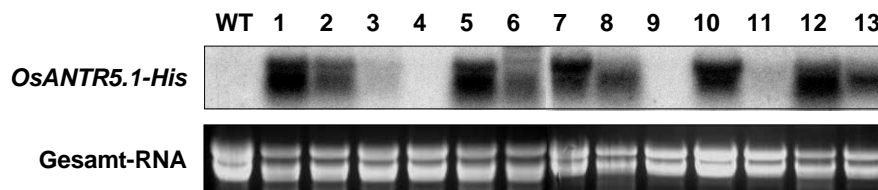


Abbildung 3.19: „Northern-Blot“-Analysen zur Untersuchung der Expression von *OsANTR5.1-His* in *OsANTR5.1-His*-Expressionslinien 1 bis 13. WT: Wildtyppflanzen. Pro Spur wurden 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Gesamt-RNA dient als Beladungskontrolle des Agarosegels.

In der Abbildung 3.19 ist das Ergebnis der „Northern-Blot“-Analyse der Blattgewebe von *OsANTR5.1-His*-Expressionsmutanten dargestellt. Die Akkumulation der *OsANTR5.1-His*-Transkripte variierte sehr stark bei den *OsANTR5.1-His*-Expressionsmutanten. Während bei den Linien 1, 5, 7, 10 und 12 besonders hohe Gehalte an *OsANTR5.1-His*-mRNA detektiert wurden, war die Expression in den Linien 2, 3, 6, 8, 11 und 13 deutlich schwächer. Bei den Linien 4 und 9 konnte gar keine *OsANTR5.1*-mRNA nachgewiesen werden. Da der mRNA-Gehalt einer Pflanze nicht zwangsläufig Aufschluss über den tatsächlichen Gehalt des korrespondierenden Proteins gibt, wurden im weiteren Verlauf die transgenen Linien 1, 5, 7, 10 und 12 mittels „Western-Blot“-Analyse auf die Proteinexpression überprüft.

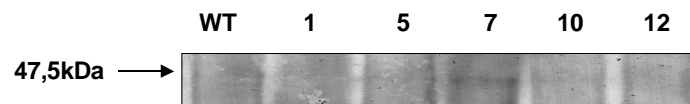


Abbildung 3.20: „Western-Blot“-Analyse der *OsANTR5.1-His*-Expressionsmutanten Linien 1, 5, 7, 10 und 12. WT: Wildtyppflanzen. Pro Spur wurde Gesamtmembran mit einem Proteingehalt von 50 µg aufgetragen. *OsANTR5.1-His*-Protein wurde mittels Anti-His-Tag-Antikörpers nachgewiesen.

Wie in der Abbildung 3.20 zu sehen ist, lieferte das überexprimierte *OsANTR5.1-His*-Protein nur schwache Detektionssignale. Bei *OsANTR5.1-His*-Überexpressionslinie 7 ist eine Bande auf der Höhe von 47,5 kDa zu erkennen, das vom theoretischen Gewicht 48,5 kDa geringfügig abweicht. Solche Unterschiede werden meist durch den hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren des Membranproteins verursacht (PLANO & WINKLER, 1991). In anderen *OsANTR5.1-His*-Expressionslinien konnte das Protein kaum bzw. nicht detektiert werden. Bei den Gesamt-Membranen der Wildtyppflanzen war ebenfalls kein Detektionssignal zu sehen. Die *OsANTR5.1-His*-Expressionslinie 7 stellt eine *Arabidopsis*-Pflanze dar, die zusätzlich zu *AtANTR5* ein Homolog aus *Oryza sativa* *OsANTR5.1* überexprimiert. Diese Linie steht nun für weitere Analysen zur Verfügung, um die Untersuchung der physiologischen Funktion von *AtANTR5* zu unterstützen.

3.10 Charakterisierung der *antr5*-Mutanten

Die *antr5*-Mutante soll im Folgenden eingehend untersucht und dadurch Hinweise auf die Rolle des AtANTR5 in physiologischen Prozessen und Stoffwechselwegen gewonnen werden. Als eine mögliche Ursache für retardiertes Wachstum wurde die photosynthetische Leistung der *antr5*-Mutante überprüft. Des Weiteren wurde die Rolle von AtANTR5 in der Phosphathomöostase und in den stickstoffabhängigen Stoffwechselprozessen mit Hilfe der *antr5*-Insertionsmutante untersucht.

3.10.1 Analyse der Chlorophyllgehalte und der photosynthetischen Leistung der *antr5*-Mutanten

Zur Analyse der Ursachen für den zwergenhaften Wuchs der *antr5*-Mutante soll die Photosynthesekapazität der Pflanzen näher untersucht werden. Durch die Photosynthese sind Pflanzen in der Lage die Lichtenergie der Sonne zu absorbieren, diese in chemische Energie zur Herstellung organischer Verbindungen umzuwandeln und dadurch Biomasse aufzubauen. Die Absorption des Lichtes erfolgt in erster Linie durch Chlorophylle, die als Bestandteil der Reaktionszentren der Photosysteme die wichtigste Gruppe der photosynthetischen Pigmente darstellen. Für die Bestimmung der Photosynthesekapazität wurde der Gesamtchlorophyllgehalt von 4 Wochen alten Pflanzen photometrisch quantifiziert. Bei diesen Analysen konnte kein Unterschied im Chlorophyllgehalt festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Mit $0,88 \pm 0,08$ mg Chlorophyll \times gFG^{-1} bei Wildtyppflanzen und mit $0,96 \pm 0,06$ mg Chlorophyll \times gFG^{-1} bei *antr5*-Mutanten besaßen die untersuchten Pflanzen jeweils die gleichen Chlorophyll/Frischgewichts-Verhältnisse.

Die photosynthetische Leistung der Pflanzen kann weiterhin anhand der Aktivität von Photosystem II (PSII) bestimmt werden. Dabei gibt die relative Quantenausbeute, die mittels Chlorophyllfluoreszenz gemessen wird, Aufschluss über die Aktivität von PSII (MAXWELL & JOHNSON, 2000). Für die Quantifizierung der Chlorophyllfluoreszenz wurden 4 Wochen alten Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen verwendet. Bei diesen Untersuchungen wurden für Wildtyp- und *antr5*-Insertionsmutanten jeweils der Wert 0,7 [$F_v \times F_m^{-1}$] der maximalen Quantenausbeute von PSII ermittelt und damit keine Unterschiede festgestellt. Die vorliegenden Ergebnisse der Chlorophyllbestimmung und der Quantenausbeute lassen den Rückschluss zu, dass die photosynthetische Leistung der *antr5*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyppflanzen nicht beeinträchtigt ist.

3.10.2 Analyse der Veränderungen in der Phosphathomöostase der *antr5*-Pflanzen

Phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass eine Verwandtschaft zwischen den AtANTR-Proteinen und der NaPi1-Familie besteht. Neben dem OcNPT1, einen Phosphattransporter, weisen viele andere Mitglieder dieser Familie neben dem eigentlichen Transportsubstrat eine

gewisse Leitfähigkeit für Phosphat auf. So wurden z. B. VGLUT1 und VGLUT2 zunächst als Phosphattransporter beschrieben, konnten aber nach weiteren Untersuchungen als Glutamattransporter charakterisiert werden. Über ihre biochemische Eigenschaft einen Phosphattransport zu katalysieren wird weiterhin spekuliert (OTIS, 2001; TAKAMORI *et al.*, 2000). Im Folgenden soll nun untersucht werden inwiefern *antr5*-Mutanten einen veränderten Phosphathaushalt aufweisen, was Rückschlüsse auf Phosphat als Substrat des AtANTR5-Proteins zulassen würde.

3.10.2.1 Analyse der Phosphatgehalte im Blattgewebe der Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten

Um mögliche Veränderungen in der Phosphathomöostase der *antr5*-Mutanten festzustellen wurden Phosphatgehalte quantifiziert. Dazu wurden *antr5*- und Wildtyppflanzen 4 Wochen lang unter Kurztagbedingungen angezogen und anschließend die Phosphatgehalte in Rosettenblättern bestimmt. Hierbei weisen die untersuchten Pflanzen keine signifikante Unterschiede in der Phosphatakkumulation auf. Rosettenblätter der Wildtyppflanzen beinhalten $2,27 \pm 0,47 \mu\text{mol Phosphat} \times \text{gFG}^{-1}$, die Blätter der *antr5*-Mutanten enthielten $2,21 \pm 0,34 \mu\text{mol Phosphat} \text{gFG}^{-1}$.

3.10.2.2 Einfluss exogener Phosphatzugabe auf das Wachstum von Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten

Mit Hilfe von „Gießexperimenten“ soll nun der Einfluss steigender Phosphatverfügbarkeit auf Wachstum und Entwicklung der *antr5*-Mutanten überprüft werden. Während eines 4wöchigen Gießversuches wurde den Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen KH_2PO_4 oder NaH_2PO_4 in Konzentration von 25 mM mit dem Gießwasser zugeführt. Durch Verwendung dieser unterschiedlichen Phosphatsalze soll eine Wirkung von Kalium oder Natrium ausgeschlossen und der Einfluss von Phosphat bestätigt werden.

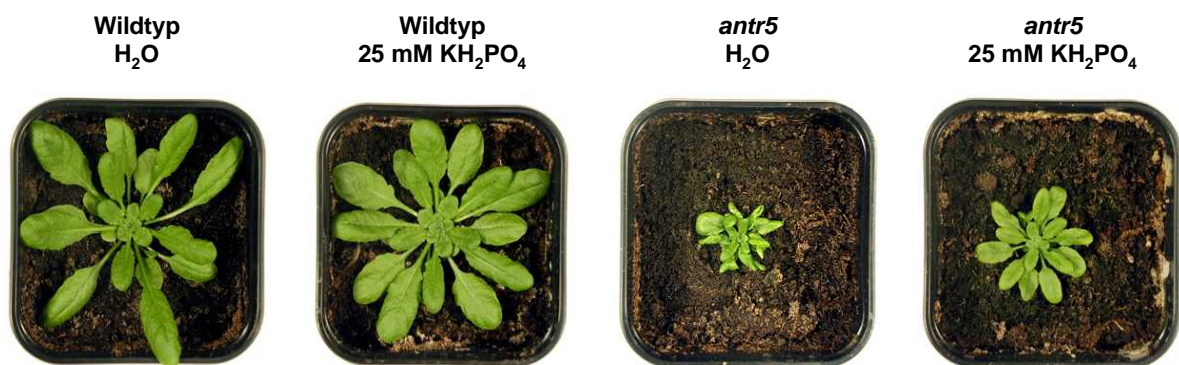


Abbildung 3.21: Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen nach 4 Wochen Phosphat-Gießversuch. Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen, und mit H_2O oder KH_2PO_4 gegossen.

Abbildung 3.21 zeigt die jeweiligen Pflanzen nach 4 Wochen exogener KH_2PO_4 -Zufuhr, zur Kontrolle wurden Pflanzen mit Wasser gegossen. Phosphat hatte nur geringe, fördernde Wirkung auf das Wachstum der Wildtyppflanzen. Im Gegensatz dazu ändert sich der Phänotyp der *antr5*-Insertionsmutanten bei Phosphat-Zugabe. Im Vergleich zur Wasserkontrolle sind die Blätter entrollt, der Habitus der Pflanze ist insgesamt größer. In der Gegenüberstellung zu beiden Wildtyppflanzen kann man jedoch feststellen, dass die *antr5*-Mutanten nach wie vor viel kleiner sind und der zwergenhafte Wuchs durch exogene Phosphatzugabe nicht aufgehoben werden kann. NaH_2PO_4 zeigte eine äquivalente Wirkung auf die Pflanzen wie KH_2PO_4 (Daten nicht gezeigt).

3.10.2.3 Einfluss von Phosphatlimitierung auf das Wachstum von Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten

Phosphat gehört zu den wichtigsten Substanzen, das einen Bestandteil der Makromolekülen wie ATP, DNA, RNA oder phosphorylierten Intermediaten. Pflanzen haben viele Strategien entwickelt um sich der variierenden Verfügbarkeit des Phosphats im Habitat anzupassen. Phosphatlimitierung ruft zahlreiche Veränderungen hervor, die als typische Reaktionen der Pflanzen beobachtet und quantifiziert werden können. Bei Phosphatmangel verändert sich unter anderem Morphologie und Architektur der Wurzeln, Stresspigmente wie Anthocyane akkumulieren, Phosphatasen und organische Säuren werden in die Rhizosphäre sekretiert (RAGHOTAMA, 1999).

Mit Hilfe von Anzuchtversuchen in Sterilkultur wurde Ausprägung durch Phosphatmangel induzierten Veränderungen bei Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen untersucht. Durch unterschiedliche Phosphatkonzentrationen im Anzuchtsmedium wurden variierende limitierende Bedingungen hergestellt und dabei das Wachstum der *antr5*-Mutanten mit Wildtyppflanzen verglichen. Dem Phosphat-Mangelmedium wurden 0 mM, 60 μM , 625 μM , 1,25 mM, 3 mM und 20 mM KH_2PO_4 oder NaH_2PO_4 zugefügt und die Pflanzen bei Kurztagbedingungen kultiviert.

Während der Anzucht in Sterilkultur mit verschiedenen Phosphatkonzentrationen im Nährmedium konnten keine Wachstumsunterschiede zwischen Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen festgestellt werden. Die Entwicklung der Wurzel und der Blätter bei Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen war bei allen getesteten Phosphatkonzentrationen, Phosphatsalzen (KH_2PO_4 oder NaH_2PO_4) Phosphatmangel und gleich (Daten nicht gezeigt).

3.10.2.4 Anthocyangehalt der Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten

Anthocyane sind als Stresspigmente bekannt und werden bei vielen Stressbedingungen wie Starklicht, Kälte, Ozon, aber auch bei Phosphatmangel synthetisiert. Daher wurden unter verschiedenen Bedingungen kultivierte Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen auf die Anthocyan-

Akkumulation hin untersucht. Dabei wurden Pflanzen auf Erde und in Sterilkultur mit und ohne Phosphat 3 Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen. Anthocyane wurden aus Rosettenblätter isoliert und photometrisch quantifiziert.

Während der Anzucht auf Erde bildeten weder Wildtyppflanzen noch *antr5*-Mutanten Anthocyane. Auch in Sterilkultur mit Phosphat konnten im Blattgewebe keine Anthocyane detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Fehlt im Gegensatz dazu Phosphat im Nährmedium, akkumulieren sowohl *antr5*-Mutanten als auch Wildtyppflanzen hohe Mengen an Anthocyanen. Im Vergleich zu einander weisen jedoch die gemessene Absorptionswerte bei Wildtyppflanzen mit $0,175 \pm 0,03$ [$E_{353} \times \text{gFG}^{-1}$] und *antr5*-Insertionsmutanten mit $0,168 \pm 0,01$ [$E_{353} \times \text{gFG}^{-1}$] und keine signifikante Unterschiede auf.

3.10.2.5 Histochemische Detektion von Phosphatasen unter Phosphatlimitierung bei Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten

Als Anpassung auf Phosphatlimitierung haben Pflanzen viele Schutzmechanismen entwickelt. So werden unter Phosphatmangel zahlreiche hydrolytische Enzyme exprimiert, die Phosphat mobilisieren und für die Pflanze verfügbar machen. Zu solchen Enzymen gehören unter anderem saure Phosphatasen, die in die Rhizosphäre sekretiert werden und dort die Freisetzung von anorganischem Phosphat aus organischen Verbindungen katalysieren (DINKELACKER & MARSCHNER 1992; TADANO *et al.*, 1993). Um weitere Erkenntnisse über die Phosphathomöostase der *antr5*-Insertionsmutanten zu gewinnen, wurden diese einem histochemischen Phosphatase-Test unterzogen. Dazu wurden die Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen in Sterilkultur mit Phosphat (1,25 mM KH_2PO_4) und ohne Phosphat unter Kurztagbedingungen angezogen und mit Hilfe von BCIP gefärbt. Die Phosphatasen spalten den Phosphatrest von BCIP (5-Brom-4Chlor-3-Indolylphosphat) ab, wodurch ein unlöslicher blauer Niederschlag entsteht. Die Intensität der Blaufärbung steht im direktem Bezug zur Phosphataseaktivität.

Bei Wachstum auf phosphathaltigen Nährmedium konnte weder bei Wildtyp- noch bei *antr5*-Keimlingen eine Blaufärbung der Wurzel detektiert werden, was auf fehlende bzw. sehr geringe Phosphataseaktivität bei den untersuchten Keimlingen hinweist. Wenn jedoch kein Phosphat im Nährmedium vorhanden ist, erscheint die Wurzel der beiden Keimlinge blau. Die gleiche Intensität der Blaufärbung in Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen lässt vermuten, dass die Phosphataseaktivitäten in den Wurzeln ebenfalls vergleichbar sind (Daten nicht gezeigt).

3.10.2.6 Einfluss von Phosphat auf die Expression von *AtANTR5*

Neben den Phosphateffekten auf die *antr5*-Insertionsmutanten wurde der direkte Einfluss von exogenen Phosphatzugabe auf die *AtANTR5*-Expression untersucht. Hierzu wurden Blattscheiben (\varnothing 7 mm) aus Rosettenblättern von *A. thaliana* Wildtyppflanzen ausgestanzt

und im Dunkeln in MES-gepufferten Medien mit 20 mM KH_2PO_4 oder NaH_2PO_4 inkubiert. Als Kontrolle diente MES-gepufferte Lösung ohne Phosphat. Für die „Northern-Blot“-Analysen wurden Proben nach 0, 2, 4, 8, 12 und 24 h Stunden entnommen und Gesamt-RNA isoliert. Die Detektion der *AtANTR5*-mRNA erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, *AtANTR5*-spezifischen DNA-Sonde. Dabei wurden keine Anreicherung oder Verringerung der *AtANTR5*-Transkripte festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.10.3 Analyse der Veränderungen im Stickstoffwechsel der *antr5*-Mutanten

Sequenzanalysen haben gezeigt, dass *AtANTR*-Proteine Ähnlichkeit zu den Transportern der NaPi1-Familie aufweisen, darunter VGLUT1-3, die Glutamattransport über vesikuläre Membranen glutamaterger Neuronen katalysieren (BELLOCCHIO *et al.*, 2000; ROTH *et al.*, 2004; TAKAMORI *et al.*, 2000). In Pflanzen spielt Glutamat als ein zentrales Intermediat der Stickstofffixierung und des Aminosäurenstoffwechsels eine besondere Rolle. Für *AtANTR*-Proteine wurde bereits eine mögliche Funktion als Glutamattransporter diskutiert, konnte aber mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen für *AtANTR1* oder *AtANTR2* nicht nachgewiesen werden (ROTH *et al.*, 2004). So wurde eine mögliche Beteiligung von *AtANTR5* an den stickstoffmetabolisierenden Stoffwechselprozessen im Rahmen dieser Arbeit überprüft.

3.10.3.1 Quantifizierung der Aminosäuregehalte bei Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten

Freie oder in Proteinen gebundene Aminosäuren stellen die dominante Gruppe der stickstoffhaltigen Verbindungen der Pflanzen dar. Außerdem repräsentieren Aminosäuren die häufigste Transportform des organischen Stickstoffs bei den meisten Pflanzenarten. Um Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des *AtANTR5* am Stickstoffmetabolismus zu gewinnen wurden die Gehalte der freien Aminosäuren bei Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen bestimmt. Dazu wurden Blätter von 4 Wochen alten Pflanzen 2 Stunden nach dem Beginn der Lichtphase geerntet und der Aminosäuregehalt mit Hilfe der HPLC quantifiziert und in der Abbildung 3.22 dargestellt.

Der Gesamtgehalt der Aminosäuren bei *antr5*-Pflanzen betrug 97% des Aminosäuregehaltes der Wildtyppflanzen und war damit geringfügig niedriger. Bei Wildtyppflanzen war der Gehalt der Aminosäuren Cystein mit 366,46 [nmol x gFG⁻¹], Glutamat mit 1309,99 [nmol x gFG⁻¹] und Glutamin mit 371,43 [nmol x gFG⁻¹] etwas höher als bei *antr5*-Mutanten, die 274,72 [nmol x gFG⁻¹] an Cystein, 1163,07 [nmol x gFG⁻¹], an Glutamat und 308,45 [nmol x gFG⁻¹] an Glutamin enthielten.

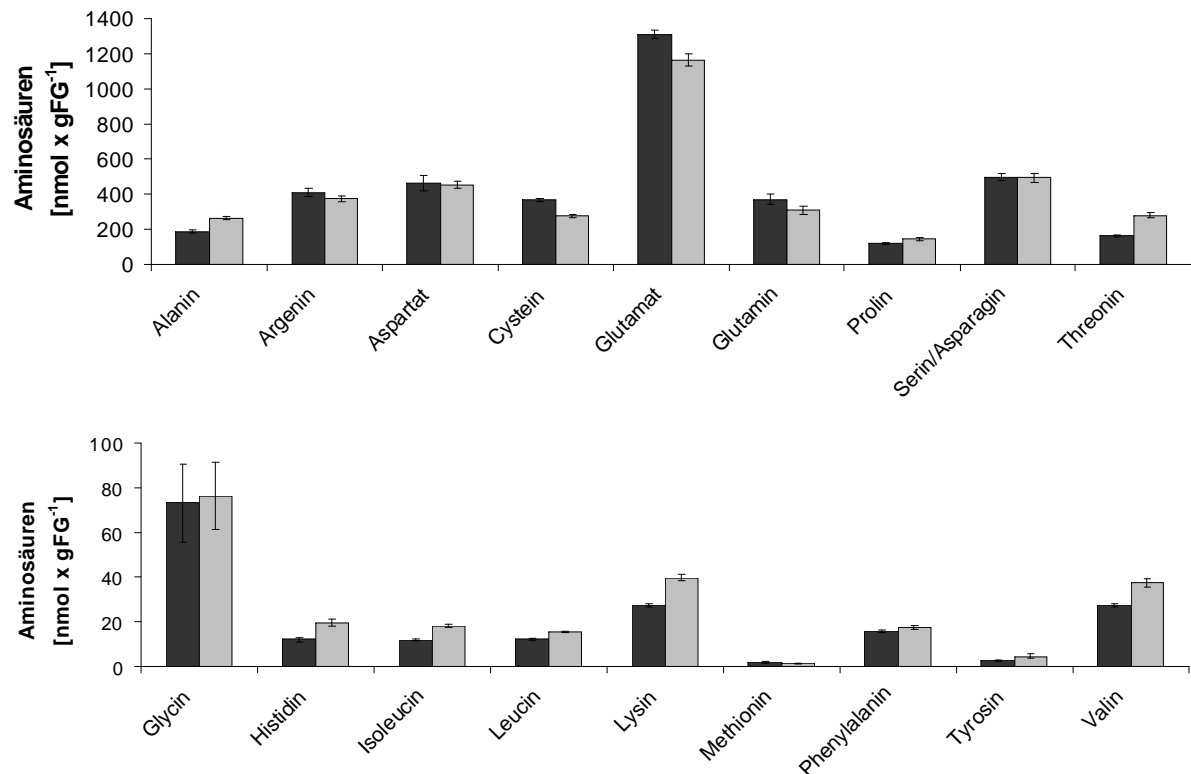


Abbildung 3.22: Aminosäure-Gehalte bei Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen. ■ Wildtyppflanzen; ■ *antr5*-Mutanten.

Im Gegensatz dazu waren die Gehalte an Alanin mit $262,06 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$, Threonin mit $278,8 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$, Histidin mit $19,5 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$, Leucin $15,57 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$, Isoleucin $18,12 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$, Lysin $39,93 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$ und Valin mit $37,52 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$ bei *antr5*-höher als bei Wildtyppflanzen die entsprechend $187,12 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$ Alanin, Threonin $162,86 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$, $12,11 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$ Histidin, $12,35 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$ Leucin, Isoleucin $11,8 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$, $27,56 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$ Lysin und $27,6 \text{ [nmol} \times \text{gFG}^{-1}]$ Valin enthielten. Die Aminosäuren Serin und Asparagin konnten nicht aufgetrennt werden, so dass die Werte $494,83 \text{ nmol} \times \text{gFG}^{-1}$ bei Wildtyppflanzen und $492,46 \text{ nmol} \times \text{gFG}^{-1}$ bei *antr5*-Insertionsmutanten beide Aminosäuren enthalten. Außerdem konnte Tryptophan nicht quantifiziert werden. Insgesamt wiesen die Aminosäuregehalte nur geringfügige Unterschiede zwischen Wildtyppflanzen und *antr5*-Insertionsmutanten auf.

3.10.3.2 Einfluss der Aminosäuren auf Wachstum der Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten in Sterilkultur

Zur Untersuchung der Veränderungen im Stickstoffmetabolismus wurde der Einfluss verschiedener Aminosäuren auf das Wachstum der *antr5*-Insertionsmutanten getestet. Hierzu wurden Wildtyp- und *antr5*-Keimlinge in Sterilkultur angezogen. Das MS-Nährmedium enthielt zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen an proteinogenen Aminosäuren. Da die

Toleranz der Pflanzen für einzelne Aminosäuren variierte, wurden ihre Konzentrationen den Toxizitätsgrenzen angepasst. So wurden bei Aspartat, Glutamin und Glutamat neben den Konzentrationen 2 mM, 5 mM, 10 mM wie bei allen anderen Aminosäuren auch 20 mM eingesetzt. Als Kontrolle wurde MS-Medium ohne zusätzliche Aminosäuren verwendet. Abbildung 3.23 stellt exemplarisch Sterilkulturen mit ausgewählten Aminosäuren, die keine, bzw. geringe oder stark hemmende Effekte auf Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen aufwiesen, dar.

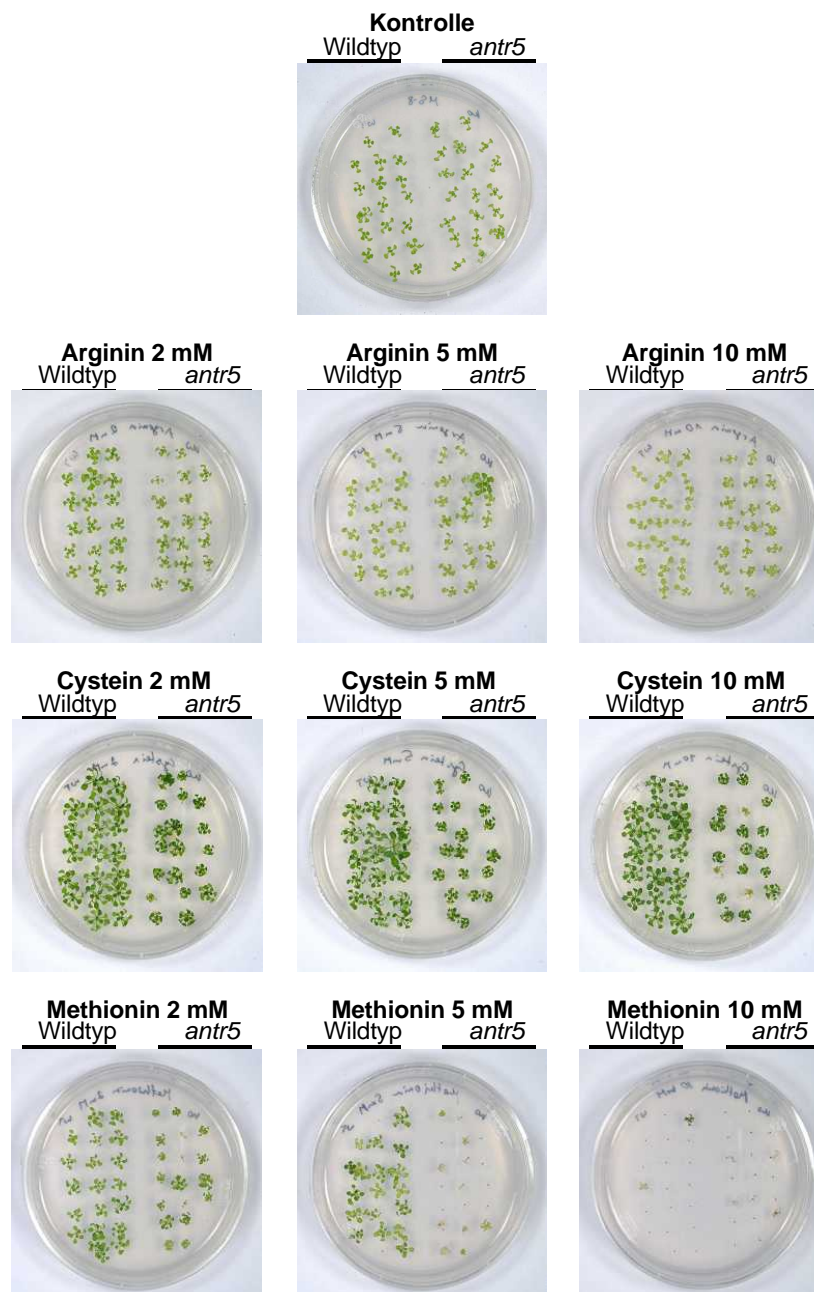


Abbildung 3.23: Wachstumsvergleich von 21 Tage alten Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen in Sterilkultur die mit den Aminosäuren Arginin, Histidin und Methionin versetzt waren.

Cystein hatte nur auf *antr5*-Mutanten einen Hemmungseffekt, der gleichermaßen bei 2 mM, 5 mM und 10 mM Cystein im Nährmedium zu sehen war. Methionin-Zugabe hatte einen

besonders starken hemmenden Effekt auf das Wachstum der Insertionsmutanten, die Wachstumsunterschiede im Vergleich zu Wildtyppflanzen sind besonders stark bei einer Konzentration von 5 mM ausgeprägt. Darüber hinaus verursachten steigende Konzentrationen an Methionin (10 mM) eine Wachstumshemmung nicht nur bei *antr5*-Mutanten sondern auch bei Wildtypkeimlingen. Im Gegensatz dazu rief Arginin weder bei Wildtyppflanzen noch bei *antr5*-Mutanten hemmende Effekte hervor (Abb. 2.23). In der Tabelle 3.2 ist die wachstumshemmende Wirkung der getesteten Aminosäuren auf die *antr5*- und Wildtypkeimlinge zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Hemmende Wirkung proteinogener Aminosäuren auf das Wachstum von Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen in Sterilkultur. Hemmungseinstufung: (-) keine Wachstumshemmung; (•) schwache Wachstumshemmung; (••) mittlere bis starke Hemmung; (•••) starke Hemmung; (Ø) nicht gekeimt; (n.a.) nicht getestet.

Aminosäure	2 mM		5 mM		10 mM		20 mM	
	Wildtyp	<i>antr5</i>	Wildtyp	<i>antr5</i>	Wildtyp	<i>antr5</i>	Wildtyp	<i>antr5</i>
Alalin	-	•	-	••	-	•••	n.a.	n.a.
Arginin	-	-	-	-	-	-	n.a.	n.a.
Asparagin	-	-	-	-	-	•	n.a.	n.a.
Aspartat	-	-	-	-	-	-	-	-
Cystein	-	•	-	•	-	•	n.a.	n.a.
Glutamat	-	-	-	-	-	-	-	•
Glutamin	-	-	-	-	-	-	•	•
Glycin	-	-	-	•	•	•••	n.a.	n.a.
Histidin	-	•	-	••	-	•••	n.a.	n.a.
Isoleucin	-	•	-	•••	•	•••	n.a.	n.a.
Leucin	-	••	-	•••	•••	•••	n.a.	n.a.
Lysin	••	••	•••	•••	•••	•••	n.a.	n.a.
Methionin	-	•	-	•••	•••	•••	n.a.	n.a.
Phenylalanin	-	••	•••	•••	•••	•••	n.a.	n.a.
Prolin	-	-	-	••	-	•••	n.a.	n.a.
Serin	-	•••	••	•••	•••	•••	n.a.	n.a.
Threonin	•	••	••	•••	•••	•••	n.a.	n.a.
Tryptophan	••	••	Ø	Ø	Ø	Ø	n.a.	n.a.
Tyrosin	-	•	Ø	Ø	Ø	Ø	n.a.	n.a.
Valin	-	•••	•••	•••	Ø	Ø	n.a.	n.a.

Bei den Aminosäuren Arginin, Aspartat, Glutamin, Lysin und Tryptophan traten hemmende Effekte gleichermaßen bei Wildtypkeimlingen und Insertionsmutanten auf. Die Zugabe von Aminosäuren wie Asparagin, Cystein, Glutamat, Threonin und Tyrosin verursachten bei *antr5*-Insertionsmutanten eine etwas stärkere Wachstumshemmung im Vergleich zu

Wildtypkeimlingen. Besonders starke hemmende Effekte auf das Wachstum der *antr5*-Insertionsmutanten konnten bei Alanin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin und Valin beobachtet werden.

3.10.3.3 Einfluss von Nitrat und Ammonium auf das Wachstum von Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten in Sterilkultur

Pflanzen enthalten einen hohen Anteil an Stickstoff, der als Bestandteil in Proteinen, Nucleinsäuren und vielen anderen Makromolekülen vorkommt. Zwar können die Pflanzen organischen Stickstoff nutzen (NÄSHOLM *et al.*, 1998), anorganischer Stickstoff ist jedoch die Haupt-N-Quelle und notwendig für das Wachstum von Pflanzen (HAYNES & GOH, 1978).

Mit Hilfe von Sterilanzucht mit unterschiedlichen Stickstoffquellen wurde das Wachstum der *antr5*-Insertionsmutanten im Vergleich zu Wildtyppflanzen untersucht. Hierzu wurden Keimlinge auf Stickstoff-Mangelmedium mit jeweils Ammonium oder Nitrat als einzige Stickstoffquelle unter Kurztagbedingungen kultiviert. Dabei wurden für ammoniumhaltiges Medium entweder 10 mM NH_4Cl oder 10 mM NH_4PO_4 verwendet, für nitrathaltiges Medium wurde 10 mM KNO_3 oder 10 mM NaNO_3 eingesetzt. Durch die Verwendung unterschiedlicher Salze sollten artifizielle Effekte durch Chlorid, Phosphat, Kalium oder Natrium ausgeschlossen und der Einfluss der jeweiligen Stickstoffquelle bestätigt werden. Als Kontrolle wurden dem Stickstoff-Mangelmedium 10 mM NH_4NO_3 und 9 mM KNO_3 beigefügt, das der Nährstoffzusammensetzung des standardisierten MS-Mediums für die Pflanzenanzucht in Sterilkultur entspricht. Außerdem wurden die Keimlinge auf Stickstoff-Mangelmedium ohne jegliche organische oder anorganische Stickstoffquelle angezogen, so dass auch das Wachstum der Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen unter Stickstoffmangel untersucht werden konnte. In der Abbildung 3.24 sind Keimlinge in Sterilkultur mit 10 mM NH_4Cl als ammoniumhaltiges Medium abgebildet, 10 mM NH_4PO_4 hatte die gleiche Wirkung auf die Pflanzen (Daten nicht gezeigt).

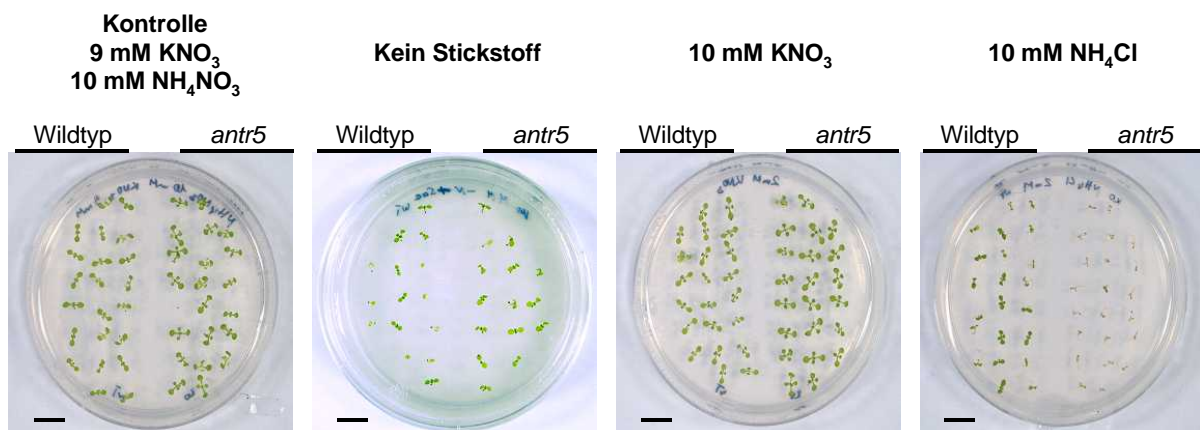


Abbildung 3.24: Wachstumsvergleich von 5 Tage alten Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen in Sterilkultur mit 10 mM NH_4Cl oder 10 mM KNO_3 als einzige Stickstoffquelle, 10 mM NH_4NO_3 und 9 mM KNO_3 als Kontrolle und ohne Stickstoff. Teilstrich: 1 cm.

Außerdem zeigt die Abbildung 3.24 Sterilkultur mit 10 mM KNO_3 als nitrathaltiges Medium, das den gleichen Einfluss wie 10 mM NaNO_3 auf die Keimlinge hatte (Daten nicht gezeigt). Damit konnte die Wirkung von Chlorid, Phosphat, Kalium und Natrium ausgeschlossen werden. Wie in der Abbildung 3.24 zu sehen ist, weisen Kontrollpflanzen mit 10 mM NH_4NO_3 und 9 mM KNO_3 keine Unterschiede im Wachstum auf. Bei Anzucht auf Stickstoffmangelmedium sind Wildtyp- und *antr5*-Keimlinge im Vergleich zu Kontrollpflanzen kleiner, aber sie unterscheiden sich nicht in ihrer Größe untereinander. Ist im Medium Nitrat als einzige Stickstoffquelle vorhanden (10 mM KNO_3), entwickeln sich die Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen ähnlich zur Kontrolle, wobei *antr5*-Mutanten geringfügig größer als Wildtypen sind. Steht dagegen Ammonium (10 mM NH_4Cl) den Pflanzen als einzige Stickstoffquelle zur Verfügung, wird ihr Wachstum deutlich gehemmt. Die Wildtyppflanzen sind viel kleiner als korrespondierende Kontroll-Pflanzen oder Pflanzen die mit Nitrat versorgt wurden. Die Wachstumshemmung der *antr5*-Keimlinge fällt im Vergleich zu Wildtyppflanzen deutlich stärker aus, *antr5*-Keimlinge sterben nach der Keimung ab, während die Wildtypen vital bleiben und langsam wachsen. Zusammenfassend kann man feststellen, dass eine ausschließliche Ammonium-Versorgung einen starken hemmenden Effekt auf beide Pflanzen hat. Diese Nährstoffzusammensetzung wirkt sich wachstumshemmend auf die Wildtypkeimlinge und letal auf die *antr5*-Keimlinge aus. Nitrat weist dagegen keinerlei toxische Einflüsse auf beide Pflanzen auf.

3.10.3.4 Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität bei Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten

Pflanzen nehmen anorganische Stickstoffverbindungen aus dem Boden auf, reduzieren sie, und wandeln sie in organische Verbindungen um. Glutaminsynthetase (GS) stellt einen entscheidenden Schritt der Stickstoffassimilation dar, sie katalysiert den Einbau der Ammoniumionen in organische Verbindungen. Mit dieser Aufgabe spielt die Glutaminsynthetase eine wichtige Rolle im Stickstoffhaushalt der Pflanze und unterliegt einer vielschichtigen Regulation. In Pflanzen gibt es zwei Glutaminsynthetase-Isoformen, die cytosolische (GS1) und die plastidäre (GS2). Der plastidären GS2 wird die Funktion der Primärassimilation des Stickstoffs sowie der Refixierung des photorespiratorisch freigesetzten Ammoniums zugeschrieben (LAM *et al.*, 1995; KEYS *et al.*, 1978; FRANZ *et al.*, 1982). Bei GS1 wird eine Rolle beim Export des Stickstoffs aus seneszenten Blättern vermutet, wobei das Ammonium, das bei der Degradation von Proteinen und Nukleinsäuren entsteht, als Glutamin refixiert und in die „sink“-Organe der Pflanze verteilt wird (GIVAN, 1979; KAWAKAMI & WATANABE, 1988; KAMACHI *et al.*, 1991; BRUGIERE *et al.*, 2000).

Die Aktivität der Glutaminsynthetase stellt einen entscheidenden Faktor im Stickstoffmetabolismus dar, deren Veränderung zu weitreichenden Auswirkungen in der

Pflanze führen kann. Da für die Regulation der GS-Aktivität in Pflanzen auch posttranslationale Mechanismen diskutiert werden (TEMPLE *et al.*, 1998), wurde ein GS-Aktivitätstest bei Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen durchgeführt und miteinander verglichen. Dabei wurde Gesamtprotein aus dem Blattmaterial der Pflanzen isoliert, so dass die gemessene GS-Aktivität beide Isoformen, GS1 und GS2, umfasst. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte 2 Stunden nach Beginn der Lichtphase. Die Blätter der Wildtyp und *antr5*-Pflanzen wiesen jeweils gleiche Glutaminsynthetase-Aktivität auf. Die GS-Aktivität beträgt $0,39 \pm 0,006$ [U x mg Protein⁻¹] für Wildtyppflanzen und $0,38 \pm 0,014$ [U x mg Protein⁻¹] für *antr5*-Insertionsmutanten.

3.10.3.5 Einfluss von Nitrat, Ammonium, Glutamat und Glutamin auf die Expression von AtANTR5

Mittels „Northern-Blot“-Analysen wurde der Einfluss der verschiedenen stickstoffhaltigen Verbindungen auf die Regulation der *AtANTR5*-Expression untersucht. Hierzu wurden Blattscheiben (\varnothing 7 mm) aus Rosettenblättern von *A. thaliana* Wildtyppflanzen ausgestanzt und im Dunkeln in MES-gepufferten Medien mit 20 mM KNO₃, NH₄Cl, Glutamat oder Glutamin inkubiert. Als Kontrolle diente MES-gepufferte Lösung. Für die „Northern-Blot“-Analysen wurden Proben nach 0, 2, 4, 8, 12 und 24 h Stunden entnommen und Gesamt-RNA isoliert. Die Detektion der *AtANTR5*-mRNA erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, *AtANTR5*-spezifischen DNA-Sonde. Dabei wurden keine Anreicherung oder Verringerung der *AtANTR5*-Transkripte festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.11 Quantifizierung der Resistenz der *antr5*-Mutanten

Computergestützte Analysen von Expressionsdatenbanken sowie Microarray-Analysen haben im Vorfeld gezeigt, dass Phytopathogene wie *Meloidogyne incognita* oder *Pseudomonas syringae* einen Einfluss auf die *AtANTR5*-Expression ausüben (HAMMES *et al.*, 2005). Um die Rolle von *AtANTR5* in der Pflanze-Pathogen-Interaktion oder in der Pathogenabwehr zu untersuchen wurden bei *antr5*-Insertionsmutanten Akkumulation der mit Pathogenabwehr assoziierten Signalmolekülen oder abwehrrelevanter Substanzen analysiert. Des Weiteren wurde die Pflanze-Pathogen-Interaktion und das Abwehrpotential der *antr5*-Insertionsmutanten untersucht.

3.11.1 Detektion phenolischer Metaboliten

Die Autofluoreszenz wird durch die Biosynthese phenolischer Verbindungen wie Phytoalexine oder zellwandgebundener Substanzen wie Lignin oder Suberin verursacht. Zur Detektion der autofluoreszierender Verbindungen wurden 4 Wochen alten auf Erde angezogenen Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten unter dem Mikroskop untersucht. In der Abbildung 3.25 sind die jeweiligen Blattgewebe der untersuchten Pflanzen unter UV-Licht zu sehen.

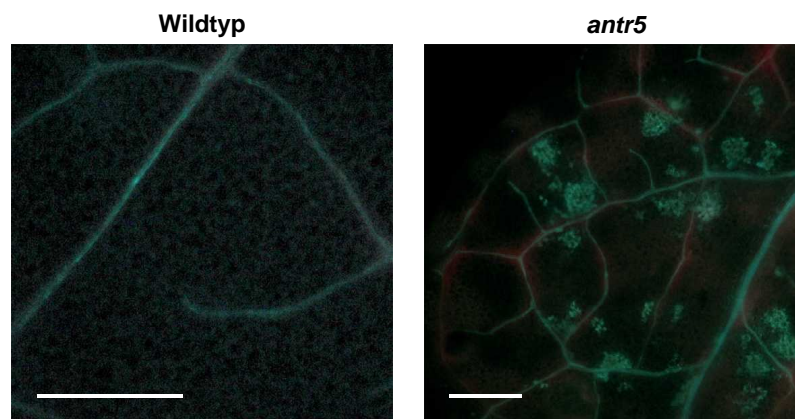


Abbildung 3.25: Detektion der Autofluoreszenz bei Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen.
Teilstrich: 0,5 mm.

Während beim Blattgewebe der Wildtyppflanzen nur Leitgefäßen zu erkennen sind, können bei *antr5*-Pflanzen neben den Leitelementen viele leuchtende Areale festgestellt werden. Dabei handelt sich um Zellen, die einzeln oder in Gruppen vorkommen und unter UV-Licht fluoreszieren. Als histochemischer Marker ist die Autofluoreszenz mit dem programmierten Zelltod in Verbindung mit Pathogenabwehr assoziiert (KOGA *et al.*, 1980; MAYAMA & SHISHIYAMA 1976; YU *et al.*, 1993). Die *antr5*-Pflanzen jedoch akkumulieren phenolische Verbindungen ohne mit Pflanzenpathogenen infiziert worden zu sein.

3.11.2 Visualisierung abgestorbener Zellen bei *antr5*-Mutanten

Trypanblau-Färbung kann zur Unterscheidung zwischen den lebenden und absterbenden oder bereits toten Zellen genutzt werden. Da der Trypanblau-Farbstoff nicht über intakte Membranen diffundieren kann (HUNG *et al.*, 1986), wurden nur abgestorbene bzw. geschädigte Zellen angefärbt. Bei Betrachtung der Blattstruktur der *antr5*-Mutanten konnten keine sichtbaren Veränderungen in der Anatomie oder Morphologie der Blätter festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Durch die Trypanblau-Färbung der auf Erde angezogenen 4 Wochen alten *antr5*- und Wildtyppflanzen konnten jedoch mikroskopisch kleine Läsionen bei *antr5*-Mutanten entdeckt werden, die aus nur wenigen Zellen bestehen (Abb. 3.26).

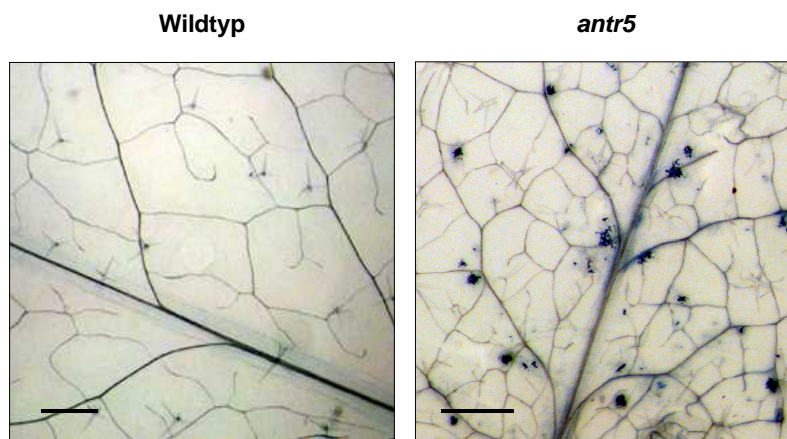


Abbildung 3.26 Trypanblau-Färbung der Blattgewebe von Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen
Teilstrich: 1 mm.

Die Trypanblau-Färbung zeigt kleine abgestorbene Zellpopulationen in den Blättern der *antr5*-Mutante, während Wildtyppflanzen keine Schäden oder Läsionen dieser Art aufweisen (Abb. 3.26). Diese Läsionen sind in ihrer Form ähnlich den mikro-HR, die durch kleine lokal begrenzte Akkumulation an reaktiven Sauerstoffspezies entstehen. Solche „oxidativ bursts“ sind systemisch und entstehen in Verbindung mit Etablierung der Immunität ausgelöst durch SAR (ALVAREZ *et al.*, 1998).

3.11.3 Histochemische Detektion von Wasserstoffperoxid-Akkumulation

Wasserstoffperoxid, eines der reaktiven Sauerstoffspezies, stellt ein wichtiges Signalmolekül dar, das besonders bei Pathogenbefall eine entscheidende Rolle spielt (BEERS & MCDOWELL, 2001; LAMB & DIXON, 1997). Die apoplastische Akkumulation von H_2O_2 wurde bei den Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten in Quantität und Lokalisation verglichen. Der histochemische Nachweis erfolgte mit Hilfe von Diaminobenzidin (DAB), das in Anwesenheit von H_2O_2 zu einem braunroten, unlöslichen Komplex polymerisiert (THORDAL-CHRISTENSEN *et al.*, 1997). Für diese Nachweismethode wurden auf Erde angezogene *antr5*- und Wildtyppflanzen im Alter von 4 Wochen verwendet.

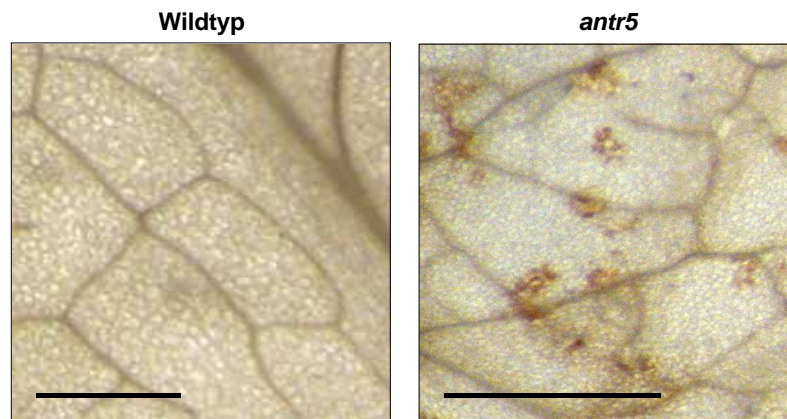


Abbildung 3.27: Detektion von H_2O_2 bei Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen. Teilstrich 0,5 mm.

Wie in der Abbildung 3.27 zu sehen ist, konnte beim Wildtyp-Blattgewebe keine DAB-Färbung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu weisen Blätter der *antr5*-Pflanzen braune Areale auf, die sich in der Größe und Intensität unterscheiden und unregelmäßig im Blatt verteilt sind. Diese Verfärbung wurde durch Akkumulation von H_2O_2 in einzelnen Zellen oder Zellgruppen hervorgerufen.

3.11.4 Bestimmung der Salizylsäuregehalte

Zur Überprüfung einer Beteiligung anderer Signalmoleküle an der Entstehung von Läsionen bei *antr5*-Mutanten wurden die Gehalte von freier und konjugierter Salizylsäure gemessen. Salizylsäure stellt ein endogenes Signalmolekül dar und spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen und bei Etablierung der systemisch erworbenen Resistenz (DURNER *et al.*, 1997).

SA-gehalte von nichtinfizierten, 4 Wochen alten *antr5*- und Wildtyppflanzen wurde mittels HPLC quantifiziert.

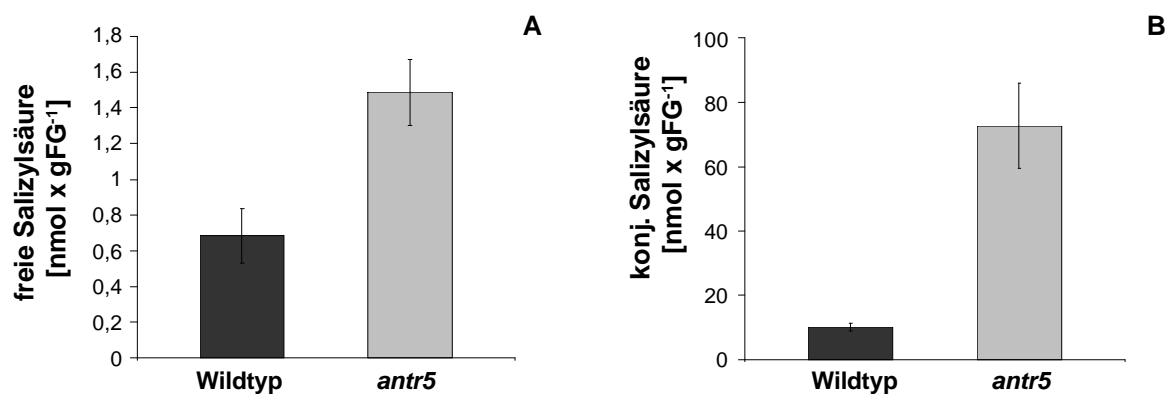


Abbildung 3.28: Bestimmung der freien (A) und konjugierten (B) Salizylsäure im Blattgewebe der Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen.

In der Abbildung 3.28 ist zu erkennen, dass der Gehalt an freien und konjugierten Salizylsäure im Blattgewebe der *antr5*-Mutanten deutlich höher als im Blattgewebe der Wildtyppflanzen ist. Der Gehalt an freien SA liegt bei *antr5*-Insertionsmutanten bei $1,5 \text{ nmol} \times \text{gFG}^{-1}$ und bei Wildtyppflanzen bei $0,68 \text{ nmol} \times \text{gFG}^{-1}$. Mit ca. $77 \text{ nmol} \times \text{gFG}^{-1}$ beträgt Gehalt der konjugierten SA der *antr5*-Pflanzen fast das 8-fache des Gehalts der Wildtyppflanzen, das bei $10 \text{ nmol} \times \text{gFG}^{-1}$ liegt.

3.11.5 Histochemische Detektion von Callose

Callose, ein β -1-3-Glucan, dient zur Verstärkung der Zellwände beim Pathogenbefall, sie bietet eine physikalische Barriere und verhindert Penetration der Zellen (KAUSS *et al.*, 1989; KAUSS 1992). Mittels einer histochemischen Färbung mit Anilinblau wurden Blätter der 4 Wochen alten Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen auf Akkumulation von Callose unter UV-Licht untersucht (Abb. 3.29).

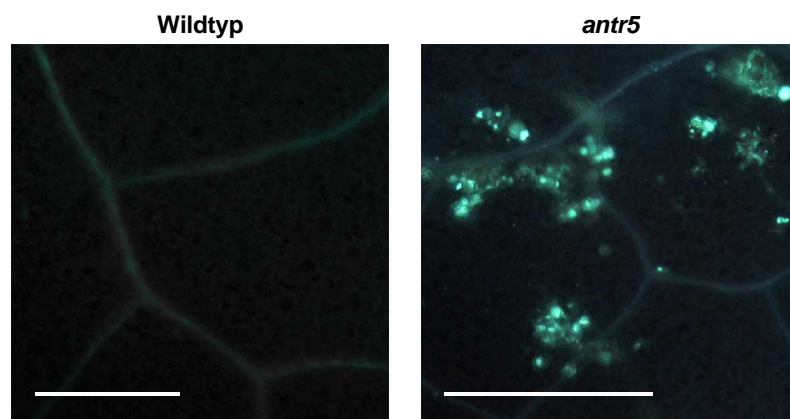


Abbildung 3.29: Detektion von Callose bei Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen. Teilstrich: 0,5 cm.

Bei Wildtyppflanzen sind nur Leitgefäße zu sehen, es konnten keine anderen Signale, die auf Einlagerungen von Callose hinweisen, detektiert werden (Abb.3.29). Das Blattgewebe der *antr5*-Pflanzen weist dagegen viele Fluoreszenzsignale auf, die im gesamten Blatt verteilt sind. Anhand dieser histochemischen Analysen konnte festgestellt werden, dass *antr5*-Pflanzen Callose unter normalen Wachstumsbedingungen und ohne Inokulation mit Pathogenen akkumulieren.

3.11.6 Expressionsanalysen der abwehrrelevanten Proteinen

Nach einem Pathogenbefall exprimieren Pflanzen eine Vielzahl an Proteinen, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind (DONG *et al.*, 1991). Expression einiger solcher Proteine wie PR1, PR2, PAL, GST6 und PDF1.2 wurde bei Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen analysiert. PR1 ist ein Abwehrgen des salizylsäureabhängigen Signalweges, dessen genaue Funktion

jedoch nicht eindeutig geklärt ist (VAN LOON, VAN STRIEN, 1999). *PR2* kodiert eine β -1-3-Glucanase, die ebenfalls salizylsäure-abhängig ist. Die Induktion dieser Gene kann durch eine Vielzahl von Pathogenen erfolgen. In *Arabidopsis thaliana* gelten *PR1* und *PR2* als Marker-Gene sowohl für lokale Resistenzantwort als auch für die SAR (DURNER *et al.*, 1997). PAL stellt ein zentrales Enzym des Phenylpropanoidstoffwechsels dar, das für die Biosynthese von SA aber auch anderer phenolischer Verbindungen, wie Phytoalexine, benötigt wird (WEISSHAAR & JENKINS, 1998). Im *Arabidopsis*-Genom wurden mehrere GST-Isoformen identifiziert, die zahlreiche endobiotische und xenobiotische Substanzen entgiften können (LIEBERHERR *et al.*, 2003). Die Glutathion-S-Transferase (GST) fungiert als Marker für oxidativen Stress, der durch Verletzung, Pathogene, Ozon oder Ethylen ausgelöst werden kann (GRANT *et al.*, 2000). *PDF1.2* kodiert ein pflanzliches Defensin mit antimikrobiellen Eigenschaften, dessen Transkription nach Pathogenbefall induziert wird. Während *PR1* und *PR2* klassische Proteine einer salizylsäure-abhängigen Abwehr darstellen und oft als SAR-Marker fungieren (UKNES *et al.*, 1993; DEMPSEY *et al.*, 1999), wird *PDF1.2* nicht durch Salizylsäure, sondern durch Jasmonsäure oder Ethylen induziert (PENNINCKX *et al.*, 1996; PENNINGCKX *et al.*, 1998). Für die Expressionsanalysen dieser abwehrrelevanten Gene wurden 4 Wochen alte nicht inokulierte Pflanzen verwendet.

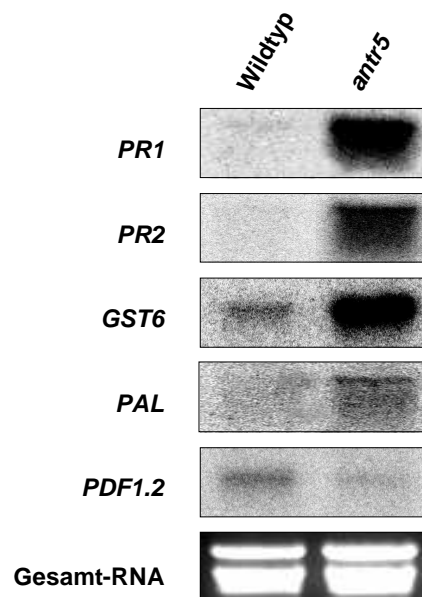


Abbildung 3.30 „Northern-Blot“-Analysen zur Untersuchung der Expression von *PR1*, *PR2*, *GST6*, *PAL* und *PDF1.2* Gene bei Wildtyp und *antr5*-Pflanzen. Pro Spur wurden 10 μ g Gesamt-RNA aufgetragen. Gesamt-RNA dient als Beladungskontrolle des Agarosegels.

In der Abbildung 3.30 sind die „Northern-Blot“-Analysen der Blattgewebe von Wildtyp und *antr5*-Pflanzen dargestellt. Bei *antr5*-Mutanten sind auf dem „Northern-Blot“ sehr starke Signale der mRNA von *PR1*, *PR2*, und *GST6* zu sehen. Bei Wildtyppflanzen sind *PR1*- und *PR2*-Transkripte nicht detektierbar. *PAL*, *GST6* und *PDF1.2* liefern nur schwache Signale,

wobei hier *PDF1.2*-mRNA stärker akkumuliert als in *antr5*-Pflanzen. Akkumulation der *PAL*-mRNA ist in *antr5*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyppflanzen deutlich erhöht, weist aber keine vergleichbar starke Signale wie *PR1* und *PR2*-mRNA auf. Die vorliegenden „Northern-Blot“-Analysen der *antr5*-Mutanten weisen auf eine konstitutive Überexpression von *PR1* und *PR2* hin, während im Wildtypgewebe keine Transkripte dieser Gene detektiert werden konnte.

3.11.7 Expressionsanalysen der *PR1*- und *PR2*-Gene unter verschiedenen Anzuchtbedingungen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die phänotypische Veränderungen der *antr5*-Insertionsmutanten unter verschiedenen Anzuchtbedingungen variieren kann. Während bei Anzucht auf Erde ein zwerghafter Phänotyp bei den *antr5*-Pflanzen auftritt, zeigen auf MS-Medium kultivierten Mutanten keinen Unterschied in Wachstum im Vergleich zu Wildtyppflanzen (Kap. 3.7.2). Mittels „Northern-Blot“-Analysen wurde die Korrelation des Phänotyps mit der mRNA-Akkumulation von PR-Proteinen überprüft. Für die Untersuchung wurden auf Erde und in Sterilkultur kultivierten *antr5*- und Wildtyppflanzen verwendet.

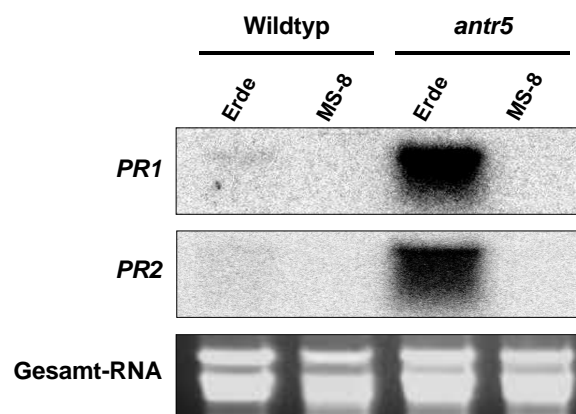


Abbildung 3.31: „Northern-Blot“-Analysen zur Untersuchung der Expression von *PR1*- und *PR2*-Proteinen bei Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen nach Anzucht auf Erde oder in Sterilkultur. Pro Spur wurden 10 μ g Gesamt-RNA aufgetragen. Gesamt-RNA dient als Beladungskontrolle des Agarosegels.

Mittels „Northern-Blot“-Analysen wurde die mRNA-Akkumulation der Proteine *PR1* und *PR2* bei Wildtyppflanzen und *antr5*-Insertionsmutanten untersucht. Wie in der Abbildung 3.31 zu sehen ist, konnte bei den Wildtyppflanzen keine *PR1*- oder *PR2*-mRNA bei den untersuchten Anzuchtbedingungen festgestellt werden. Auf Erde angezogene *antr5*-Pflanzen wiesen dagegen starke Signale für beide Proteine auf. Bei Anzucht in Sterilkultur konnte bei *antr5*-Mutanten jedoch keine mRNA der beiden PR-Proteine detektiert werden. Diese Untersuchungen zeigen, dass nur auf Erde angezogene *antr5*-Mutanten, die auch einen entsprechenden zwerghaften Phänotyp aufweisen, die Abwehrproteine *PR1* und *PR2*

konstitutiv überexprimieren. Bei Anzucht auf in Sterilkultur wird der Phänotyp aufgehoben, was entsprechend mit dem Verlust der konstitutiven Überexpression der untersuchten PR-Proteine einhergeht.

3.11.8 Pathogenversuche mit *Pseudomonas syringae*

Bisher konnte gezeigt werden, dass *antr5*-Mutanten viele molekulare und zytologische Merkmale wie Läsionen, Akkumulation von H₂O₂, Callose, Salizylsäure oder PR-Proteinen aufweisen. Alle diese Merkmale treten in Verbindung mit Pathogenbefall auf und tragen zur Abwehrreaktion der Pflanze bei. Außerdem erscheinen diese Merkmale während der systemisch erworbenen Resistenz, die zu einer erhöhten Resistenz gegen Befall mit virulenten Bakterien in distalen Geweben führt. Daher wurde untersucht, inwiefern die beobachteten Eigenschaften der *antr5*-Mutanten mit einer erhöhten Resistenz bei einer Pathogeninfektion korrelieren.

Um die Pflanze-Pathogen-Interaktion bei *antr5*-Insertionsmutanten zu überprüfen, wurden Pathogenversuche mit dem bakteriellen Krankheitserreger *Pseudomonas syringae* pv *tomato* durchgeführt. *P. syringae* ist ein Gram-negatives, obligat aerobes, stäbchenförmiges und polar begeißeltes Bakterium, welches phylogenetisch zur γ -Gruppe der Proteobakterien gehört. Für die Pathogenversuche wurden jeweils ein virulenter Stamm DC3000 und ein avirulenter Stamm DC3000*AvrRpt2* eingesetzt. Die Avirulenz des DC3000*AvrRpt2* Stammes beruht auf den Genen *AvrRpt2* seitens *P. syringae* und *RPS2* seitens *A. thaliana* und verursacht eine Krankheitsresistenz, die als „gene for gene resistance“ bekannt ist (FLOR, 1971). Dabei kommt es nach Pathogenbefall zur Interaktion der beiden Gen-Produkte und dadurch zu einer schnellen Erkennung des Pathogens, Aktivierung der Abwehrmechanismen der Pflanze und der hypersensitiven Reaktion (INNES *et al.*, 1993; KUNKEL *et al.*, 1993). Dagegen verläuft die Infektion des virulenten Stammes erfolgreich, dabei vermehren sich die Bakterien und die Krankheitssymptome entstehen. Zur Untersuchung der Pflanzen-Pathogen-Interaktion wurden Blätter von 4 Wochen alten Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen mit einer Bakteriensuspension inokuliert. Nach Inokulation wurden Proben für „Northern-Blot“-Analysen entnommen, Wachstum der Bakterien im Blattgewebe bestimmt sowie die Entwicklung der Krankheitssymptome oder hypersensitiven Reaktion dokumentiert.

3.11.8.1 Expressionsanalysen von *AtANTR5* nach Inokulation mit *P. syringae*

Um weitere Erkenntnisse zur physiologischen Bedeutung von *AtANTR5* zu gewinnen wurde untersucht inwiefern Pathogenbefall einen Einfluss auf seine Genexpression hat. Für die Expressionsanalysen wurden Wildtyppflanzen mit virulenten und avirulenten *Pseudomonas*-Bakterien inokuliert. Zur Kontrolle wurden die Pflanzen entsprechend mit MgCl₂-Lösung

behandelt. Für „Nothern-Blot“-Analyse wurden 0, 4, 8, 12 und 24 Stunden nach Inokulation Proben entnommen und auf die Akkumulation der *AtANTR5*-mRNA hin untersucht.

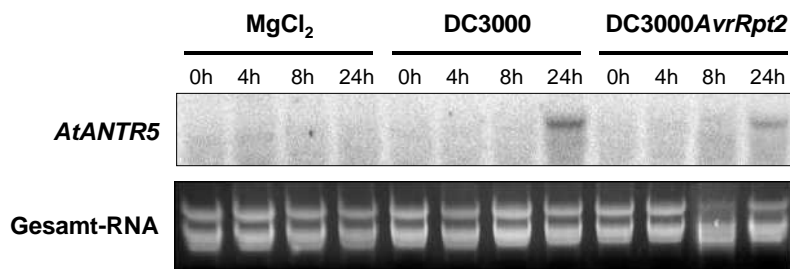


Abbildung 3.32: „Nothern-Blot“-Analysen zur Untersuchung der Expression von *AtANTR5* nach Inokulation von *Arabidopsis*-Blättern mit den *P.syringae*-Stämmen DC3000 bzw. DC3000AvrRpt2 sowie MgCl₂-Lösung (Kontrolle). 0h, 4h, 8h, 24h entsprechen 0, 4, 8, 24 Stunden nach Inokulation. Pro Spur wurden 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Gesamt-RNA dient als Beladungskontrolle des Agarosegels.

In Abbildung 3.32 ist deutlich zu erkennen, dass *AtANTR5*-Expression in den Rosettenblätter ohne Induktion grundsätzlich sehr gering ist und unter der Detektionsgrenze der verwendeten Methode liegt. So sind keine Signale bei der Kontrolle (MgCl₂) und zur Beginn der Infektion (0h, 4h und 8h). Die *AtANTR5*-mRNA akkumulierte stark 24 Stunden nach Inokulation sowohl mit dem virulenten als auch dem avirulenten *Pseudomonas*-Stamm. Wobei Inokulation mit virulenten *P.syringae* (DC3000) eine etwas höhere Transkriptionsrate von *AtANTR5* verursachte. Im Gegensatz dazu rief die Behandlung mit MgCl₂-Lösung keinen Anstieg im mRNA-Gehalt hervor.

3.11.8.2 Entstehung von Blattschäden bei Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten nach Pathogenbehandlung

Für die Untersuchung der Pflanze-Pathogen-Interaktion wurden die *antr5*- und Wildtyppflanzen mit virulenten und avirulenten *Pseudomonas*-Stämmen inokuliert, als Kontrolle wurde MgCl₂-Lösung verwendet. 3 Tagen nach der Inokulation wurde die Entwicklung der Krankheitssymptome bei *antr5*- und Wildtyppflanzen dokumentiert.

Die Inkubation der Pflanzen mit der Kontroll-Lösung hatte keine sichtbaren Auswirkungen, weder auf die Wildtyppflanzen noch auf die *antr5*-Insertionsmutanten (Abb. 3.33). Das Blattgewebe der mit dem virulenten *P. syringae*-Stamm DC3000 inokulierten Wildtyppflanzen war stark geschädigt und zeigte die typischen Symptome einer Infektion. Die Blätter zeigen deutlich verfärbte nekrotische Bereiche. Im Gegensatz dazu waren die mit dem avirulenten *P. syringae*-Stamm DC3000AvrRpt2 inokulierten Wildtyppflanzen kaum angegriffen, bis auf wenige Stellen der hypersensitiven Reaktion (HR). Die HR war auf einen bestimmten Blattabschnitt in unmittelbarer Nähe der Infektionsstelle beschränkt und dehnte sich nicht auf weitere Teile des Blattes aus.

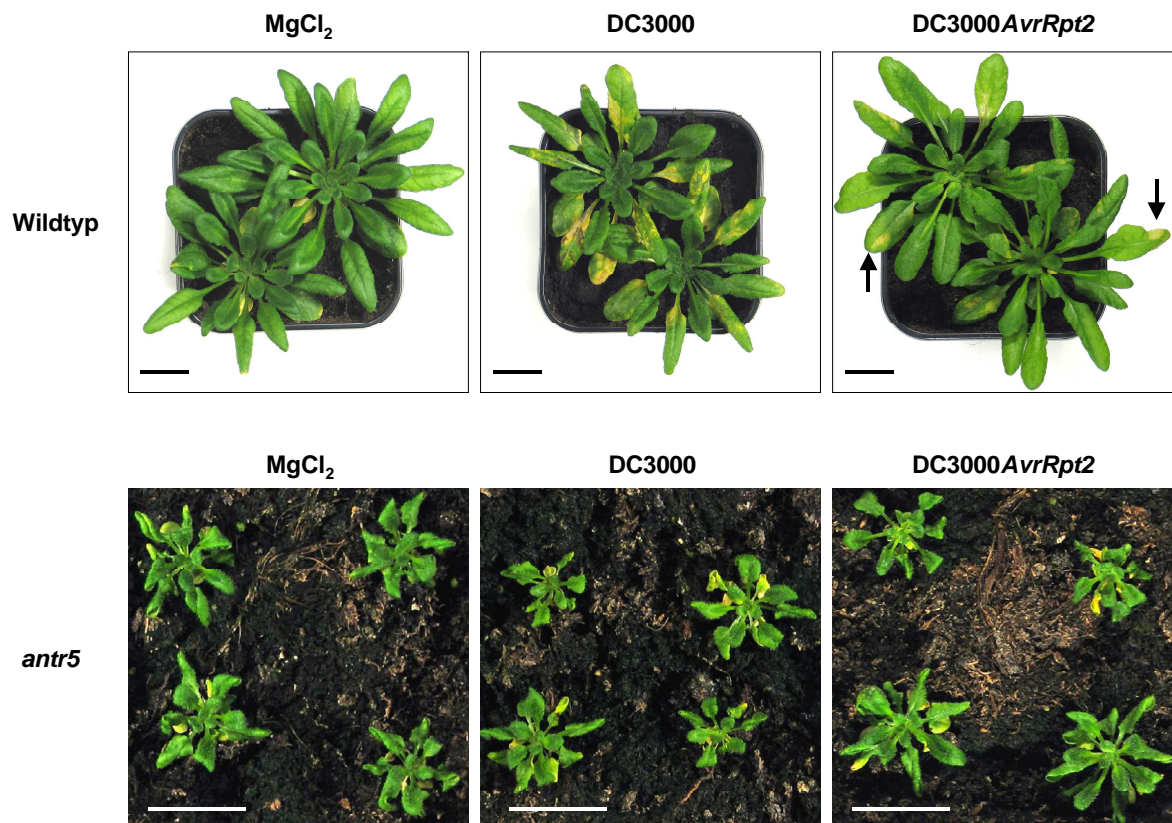


Abbildung 3.33: Effekt der Inokulation der *antr5*- und Wildtyppflanzen mit den *P. syringae*-Stämmen DC3000 bzw. DC3000AvrRpt2 sowie MgCl₂-Lösung (Kontrolle). HR dargestellt durch Pfeile. Inokulierte Bakteriendichte: 1×10^7 cfu x ml⁻¹. Teilstrich: 2 cm.

Die Inokulation der *antr5*-Mutanten mit den beiden *P. syringae*-Stämmen rief keine eindeutig ausgebildeten Infektionssymptome hervor, nur wenige Blätter der *antr5*-Pflanzen wiesen kleine Chlorosen auf. In der *antr5*-Mutante sind keine bzw. nur sehr schwache Krankheitssymptome zu erkennen, während der korrespondierende Wildtyp ausgeprägte Krankheitsmerkmale aufweist (Abb. 3.33).

3.11.8.3 Bakterienausbreitung in Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten

Um die geringe Anfälligkeit der *antr5*-Insertiosmutante gegenüber den verwendeten *P. syringae*-Stämmen zu verifizieren wurde in Wachstumskurven die Ausbreitung der Bakterien in der Pflanze bestimmt. Hierzu wurden Bakteriensuspensionen der *P. syringae*-Stämme DC3000 und DC3000AvrRpt2 in die Blätter der Wildtypen und *antr5*-Mutanten infiltriert. Nach einer mehrtägigen Inkubation in einer Feuchtkammer wurden die Bakterien aus den Blättern isoliert und quantifiziert. Nach Infiltration mit einem avirulenten Bakterienstamm *P. syringae* DC3000AvrRpt2 zeigen die untersuchten Wildtyppflanzen sowie die *antr5*-Mutanten einen ähnlichen Verlauf des Bakterienwachstums in den Blättern (Abb. 3.34). Nach 3-tägiger Inkubation betrug die Bakterienmenge jeweils ca. 1×10^7 cfu x cm⁻² Blattoberfläche.

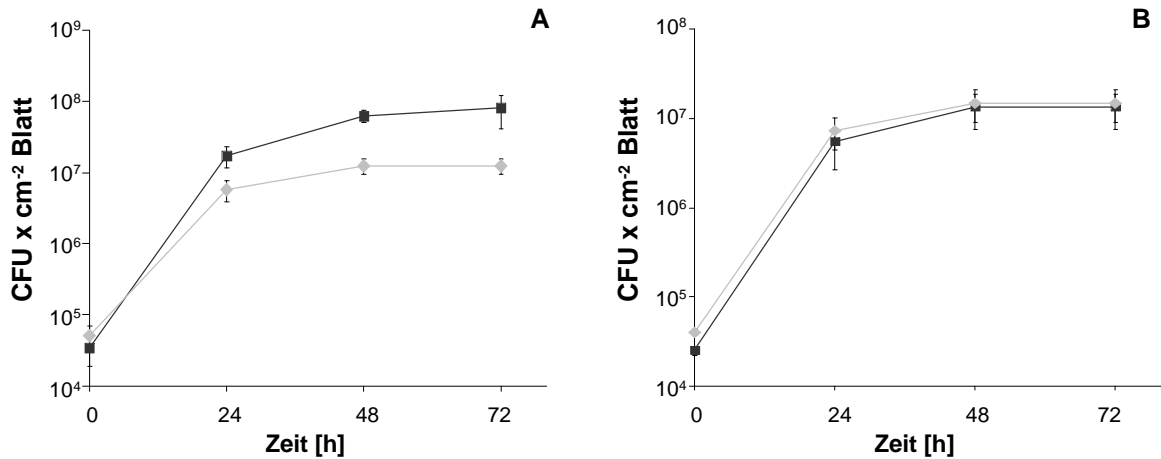


Abbildung 3.34: Wachstumskurve von *P. syringae* (A) DC3000 und (B) DC3000AvrRpt2 nach Infiltration in Wildtyp- und *antr5*-Blattgewebe. —■— Wildtyppflanzen; —◆— *antr5*-Mutanten; Infiltrierte Bakteriendichte: 5×10^5 cfu x ml⁻¹.

Im Vergleich zu dieser Pflanzen-Pathogen-Interaktion war das Bakterienwachstum nach Infiltration mit dem virulenten Stamm DC3000 bei Wildtyppflanzen mit ca. 1×10^8 cfu x cm⁻² Blattoberfläche etwa 10 mal höher. Im Gegensatz dazu konnte eine zehnfach reduzierte Bakterienmenge des virulenten Stammes im Blattgewebe der *antr5*-Mutante festgestellt werden. Diese Wachstumsunterschiede korrelieren mit der zuvor beobachteten Reduktion der Blattschäden und Krankheitssymptomen nach Inokulation mit *P. syringae* DC3000 (Kap. 3.11.8.2).

3.11.8.4 Expressionsanalysen bei Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten nach Inokulation mit *P. syringae*

Mit Hilfe der „Northern-Blot“-Analysen wurde die Transkript-Akkumulation von *PR1*- und *PR2*-Genen, deren Expression durch einen Pathogenbefall induziert werden, untersucht. Die Analysen der Genexpression in Blättern von *antr5*-Mutante und Wildtyppflanzen erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 12, 24, 48 und 72 Stunden) nach Infiltration von *P. syringae* DC3000 oder DC3000AvrRpt2. Neben den Bakteriensuspensionen wurde zur Kontrolle 10 mM MgCl₂ infiltriert und in der Feuchtkammer inkubiert.

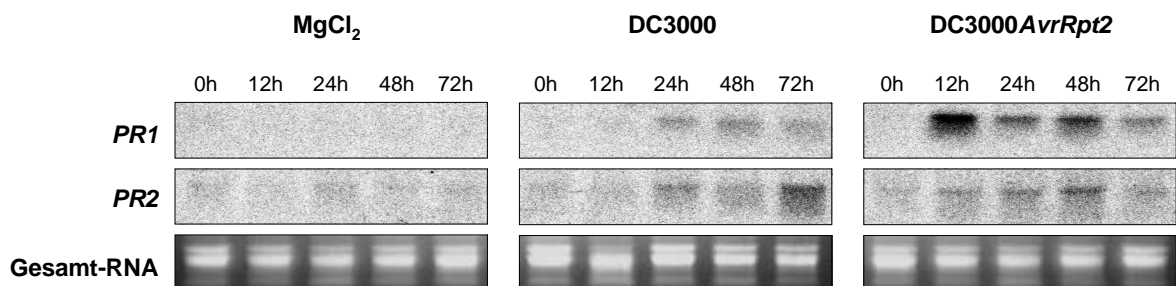


Abbildung 3.35: „Northern-Blot“-Analysen zur Untersuchung der Expression von *PR1* und *PR2* nach Inokulation von Wildtyp-Blättern mit den *P. syringae*-Stämmen DC3000 bzw. DC3000AvrRpt2 sowie MgCl₂-Lösung (Kontrolle). Infiltrierte Bakteriendichte: 1×10^7 cfu x ml⁻¹. Pro Spur wurden 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen. rRNA dient zur Beladungskontrolle des Agarosegels.

Nach Infiltration der Blätter der Wildtyppflanzen mit der $MgCl_2$ -Lösung konnte keine Akkumulation der *PR1*- oder *PR2*-Transkripte detektiert werden (Abb. 3.35). Nach Inokulation der Wildtyppflanzen mit der Bakteriensuspension des virulenten Stammes *Pseudomonas syringae* DC3000 waren sowohl zum Zeitpunkt der Inokulation (0 h) als auch 12 Stunden später keine Signale auf dem „Northern-Blot“ zu sehen. 24 Stunden nach Infiltration konnte eine Transkript-Anreicherung der *PR1*- und *PR2*-Gene festgestellt werden, die auch nach 48 und 72 Stunden detektierbar waren. Die Infiltration mit den avirulenten Bakterien DC3000*AvrRpt2* verursachte ebenfalls mRNA-Akkumulation der beiden *PR*-Gene, wobei diese bereits nach 12 Stunden auftrat. Die Transkript-Gehalte des *PR1*-Gens waren zu allen Zeitpunkten deutlich höher als nach Inokulation mit virulenten Bakterien, die mRNA-Gehalte des *PR2*-Gens waren vergleichbar nach Inokulation mit beiden Bakterienstämmen.

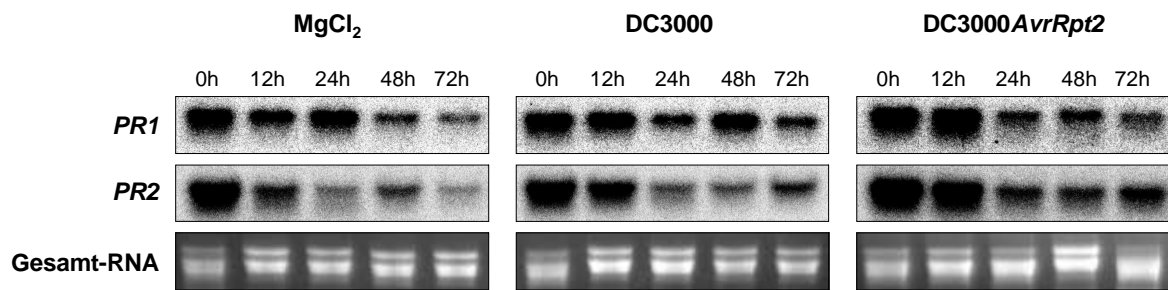


Abbildung 3.36: „Northern-Blot“-Analysen zur Untersuchung der Expression von *PR1* und *PR2* nach Inokulation von *antr5*-Blättern mit den *P. syringae*-Stämmen DC3000 bzw. DC3000*AvrRpt2* sowie $MgCl_2$ -Lösung (Kontrolle). Infiltrierte Bakteriendichte: 1×10^7 cfu \times ml⁻¹. Pro Spur wurden 10 μ g Gesamt-RNA aufgetragen. Gesamt-RNA dient als Beladungskontrolle des Agarosegels.

Nach Infiltration der Blätter der *antr5*-Pflanzen mit der $MgCl_2$ -Lösung wurde eine sehr starke Akkumulation der *PR1*- oder *PR2*-Transkripte bereits zum Zeitpunkt der Infiltration (0h) festgestellt (Abb. 3.36). Diese Anreicherung der mRNA-Gehalte entsteht durch konstitutive Expression von *PR1* und *PR2* und wurde bereits nachgewiesen (Kap. 3.11.6). Im Verlauf des Experiments verringerten sich die Transkript-Gehalte der beiden Gene, was sich in einer kontinuierlichen Abnahme der mRNA im Zeitrahmen von 0 bis 72 Stunden äußerte. Ein ähnliches Expression-Muster der beiden *PR*-Gene wurde auch nach Inokulation mit virulenten und avirulenten *P. syringae*-Stämmen beobachtet. Inokulation mit einem Krankheitserreger *Pseudomonas syringae* hatte keinen Einfluss auf die Expression der *PR1*- und *PR2*-Gene in *antr5*-Insertionsmutanten, während bei Wildtyppflanzen normale Induzierbarkeit der *PR1*- und *PR2*-Gene durch Pathogenbefall beobachtet werden konnte (Abb. 3.35).

Die beobachtete Abnahme der *PR1*- und *PR2*-Transkripte wurde möglicherweise durch die $MgCl_2$ -Lösung oder die hohe Luftfeuchtigkeit während der Inkubation in der Feuchtkammer

verursacht. Luftfeuchtigkeit spielt im Pathogenbefall der Pflanze eine große Rolle, die nicht nur für die Sporenkeimung bei pathogenen Pilzen, sondern auch für die Aktivierung und Beweglichkeit der Bakterien und Nematoden notwendig ist. Weiterhin scheint eine hohe Luftfeuchtigkeit auch die Pflanze selbst, Aktivierung der Abwehrmechanismen und Resistenz zu beeinflussen (HAMMOND-KOSACK *et al.*, 1996; MAY *et al.*, 1996). Im Folgenden wurde der Einfluss der Luftfeuchte auf die Expression der *PR*-Gene bei *antr5*-Mutanten während der Pathogenversuche überprüft um eine mögliche Auswirkung der $MgCl_2$ -Lösung auszuschließen. Dazu wurden *antr5*-Pflanzen bei Kurztagbedingungen und relativer Luftfeuchtigkeit von 60% 4 Wochen lang angezogen und unbehandelt in eine Feuchtkammer mit 90% Luftfeuchte gestellt. Um den Verlauf der Transkript-Akkumulation zu überprüfen wurden nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden Proben für „Northern-Blot“-Analysen entnommen.

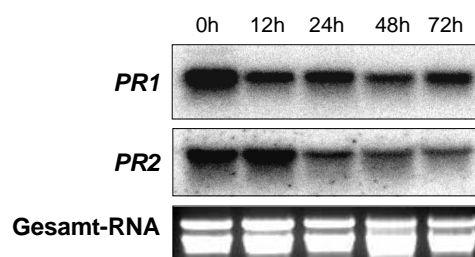


Abbildung 3.37: „Northern-Blot“-Analysen zur Untersuchung der Expression von *PR1* und *PR2* bei *antr5*-Pflanzen bei hoher Luftfeuchtigkeit. Luftfeuchtigkeit betrug ca. 90%. Pro Spur wurden 10 μ g Gesamt-RNA aufgetragen. Gesamt-RNA dient als Beladungskontrolle des Agarosegels.

Wie in der Abbildung 3.37 zu sehen ist, hatte die hohe Luftfeuchtigkeit einen Einfluss auf die Expression der *PR*-Gene bei *antr5*-Insertionsmutanten. Das Expressionsmuster der beiden Gene wies einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie bei Pathogen- oder $MgCl_2$ -behandelten Pflanzen (Abb. 3.36). Zum Zeitpunkt 0 konnten höchsten Mengen an *PR1*- und *PR2*-Transkripten auf dem „Northern-Blot“ detektiert werden, die auf konstitutive Expression zurückzuführen sind. Während der 72 stündigen Inkubation in der Feuchtkammer nahm die mRNA-Akkumulation beider Gene kontinuierlich ab. Auf Grund der vorliegenden „Northern-Blot“-Analysen kann die Auswirkung der $MgCl_2$ -Lösung auf die Expression der *PR*-Gene ausgeschlossen werden.

3.11.9 Einfluss von *nahG*-Expression auf die *antr5*-Mutanten

Die „Northern-Blot“-Analysen von *antr5*-Mutanten lassen vermuten, dass die Expression der *PR*-Proteine konstitutiv erhöht ist und mit den erhöhten Salizylsäuregehalten korreliert (Kap. 3.11.4 und Kap. 3.11.6). SA ist ein Signalmolekül in der pflanzlichen Abwehr und spielt eine Rolle bei der Induktion von SAR und HR (MURPHY *et al.*, 1999; GAFFNEY *et al.*, 1993; SHAH, 2003). Um den Einfluss der Salizylsäure auf den Phänotyp und die Aktivierung der Abwehrmechanismen der *antr5*-Insertionsmutanten zu überprüfen, sollten die Salizylsäure-

Gehalte mittels *nahG*-Expression reduziert werden. Das *nahG*-Gen codiert für eine Salizylathydroxylase aus *Pseudomonas putida*, die neben 13 weiteren Enzymen *nahA* bis *nahM*, am Abbau von Naphthalen zu Pyruvat und Acetylaldehyd beteiligt ist (YEN & GUNSALUS, 1982). Da Salizylathydroxylase die NADH-abhängige Umwandlung von Salizylsäure zu Catechol katalysiert, können transgene Pflanzen, die dieses Enzym exprimieren, selbst nach Inokulation mit Pathogenen nur extrem geringe Mengen an SA akkumulieren (DELANEY, 1997; GAFFNEY *et al.*, 1993; VAN WEES & GLAZERBROOK, 2003).

3.11.9.1 Herstellung der *antr5+nahG*-Pflanzen

Für die Reduktion der SA-Gehalte in den *antr5*-Insertionsmutanten wurde das *NahG*-Gen (Konstrukt pCIB200-NahG, Tab. 2.3) mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation in das Genom der *antr5*-Mutanten inseriert und damit *antr5+nahG*-Pflanzen generiert. Pflanzen, die das *antr5+nahG*-Konstrukt enthielten, konnten über eine erworbene Kanamycin-Resistenz selektiert werden, wobei insgesamt 5 unabhängige Linien entstanden. Die identifizierten *antr5+nahG*-Überexpressionsmutanten wurden auf ihren Transkriptgehalt im Blattmaterial mittels „Northern-Blot“-Analysen mit einer spezifischen *nahG*-Sonde überprüft. Als Kontrolle wurde Gesamt-RNA der *antr5*-Insertionsmutanten aufgetragen (Abb. 3.38). Bei allen untersuchten *antr5+nahG*-Linien konnten hohe *nahG*-mRNA-Gehalte detektiert werden.

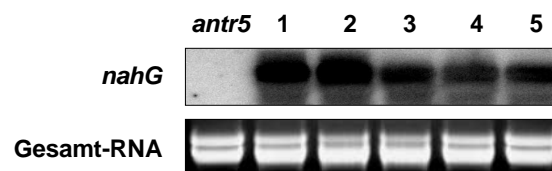


Abbildung 3.38: „Northern-Blot“-Analysen zur Untersuchung der *nahG*-Expression in *antr5+nahG*-Überexpressionsmutanten. *antr5*: *antr5*-Insertionsmutanten; 1-5 entsprechen den *antr5+nahG*-Überexpressionslinien 1-5. Pro Spur wurden 10 μ g Gesamt-RNA aufgetragen. Gesamt-RNA dient als Beladungskontrolle des Agarosegels.

Für weitere Analysen wurde die Linie 1 verwendet, da sie eine der stärksten Überexpressionslinien war und besonders stark *nahG*-Transkripte im Blattgewebe akkumulierte.

3.11.9.2 Bestimmung der Salizylsäure-Gehalte bei *antr5+nahG*-Mutanten

Die Wirkung des *nahG*-Enzyms in *antr5+nahG*-Überexpressionsmutanten wurde anhand der Salizylsäure-Gehalten überprüft. Um den Effekt bei *antr5+nahG*-Überexpressionsmutanten zu bestätigen wurde SA aus Blattgewebe von Wildtyp-, *antr5*- und *antr5+nahG*-Pflanzen extrahiert und mittels HPLC bestimmt (Abb. 3.39).

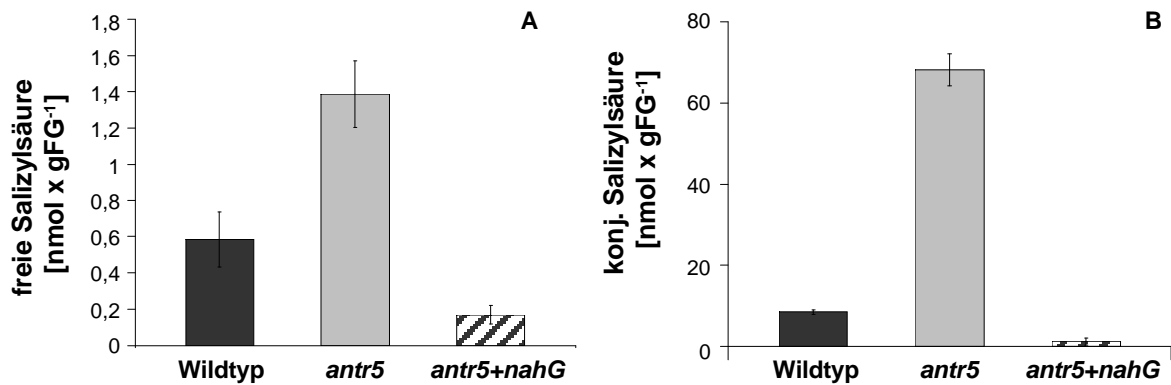


Abbildung 3.39: Bestimmung der freien und konjugierten Salizylsäure im Blattgewebe der Wildtyppflanzen, *antr5*- und *antr5+nahG*-Mutanten.

Wie in der Abbildung 3.39 zu sehen ist, wurde der Salizylsäure-Gehalt durch die *nahG*-Expression in *antr5*-Insertionsmutanten deutlich reduziert. Während im Blattgewebe der Wildtyppflanzen insgesamt 0,58 nmol freie und 7,46 nmol konjugierte SA detektiert wurde, war die SA-Menge in *antr5*-Insertionsmutanten mit 1,39 nmol x gFG⁻¹ freie und 58,13 nmol x gFG⁻¹ konjugierte SA deutlich höher. Durch die Expression des *nahG*-Gens wurde die Salizylsäure durch die Aktivität der Salizylhydroxylase auf 0,17 nmol x gFG⁻¹ und 1,19 nmol x gFG⁻¹ reduziert.

3.11.9.3 Expressionsanalysen der *PR1*- und *PR2*-Gene bei *antr5+nahG*-Mutanten

Um herauszufinden inwiefern die konstitutiv erhöhte Expression der Pathogenabwehrproteine *PR1* und *PR2* bei der *antr5*-Insertionsmutante (Kap.3.11.6) von den erhöhten SA-Mengen abhängig ist, wurden *antr5-nahG*-Mutanten auf die Akkumulation der *PR1*- und *PR2*-Transkripte hin untersucht. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus dem Blattgewebe der *antr5+nahG*-Mutanten isoliert, aufgetrennt und mit *PR1* und *PR2* spezifischen Sonden detektiert. Als Kontrolle diente Gesamt-RNA von Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen (Abb. 3.40).

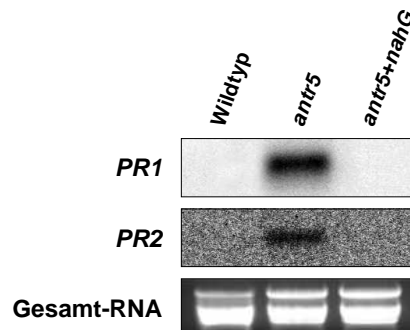


Abbildung 3.40: „Nothern-Blot“-Analysen zur Untersuchung der Expression von *PR1*- und *PR2*-Genen bei Wildtyppflanzen, *antr5*- und *antr5+nahG*-Mutanten. Pro Spur wurden 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Gesamt-RNA dient als Beladungskontrolle des Agarosegels.

Die „Northern-Blot“-Analysen haben gezeigt, dass nur bei *antr5*-Insertionsmutanten *PR1*- und *PR2*-mRNA akkumulieren. Die *nahG*-Überexpression in *antr5*-Mutanten verhindert die erhöhte Expression der beiden PR-Gene, deren Transkripte bei *antr5+nahG*-Mutanten wie bei Wildtyppflanzen nicht mehr detektierbar waren. Die vorliegenden „Northern-Blot“-Analysen zeigen, dass die konstitutive Expression der PR-Gene bei *antr5*-Mutanten von endogener Salizylsäure abhängig ist.

3.11.9.4 Visualisierung abgestorbenen Zellen

Salizylsäure ist ein zentrales Molekül der Pathogenabwehr und verursacht möglicherweise bei *antr5*-Insertionsmutanten die Entstehung der HR-ähnlichen Läsionen. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurde Einfluss der Salizylsäure auf die Läsionbildung bei *antr5*- und *antr5+nahG*-Mutanten untersucht. Dazu wurden Rosettenblätter der 4 Wochen Wildtyppflanzen und der beiden Mutanten der Trypanblau-Färbung unterzogen. Abbildung 3.41 zeigt die mittels Trypanblau visualisierte abgestorbene Zellen im Blattgewebe. Wildtypblätter weisen keine Blaufärbung und damit keine toten Zellen auf. Blätter der *antr5*- und *antr5+nahG*-Mutanten sind durch blaue Areale gekennzeichnet, die auf Gewebeschädigung und tote Zellen hinweisen.

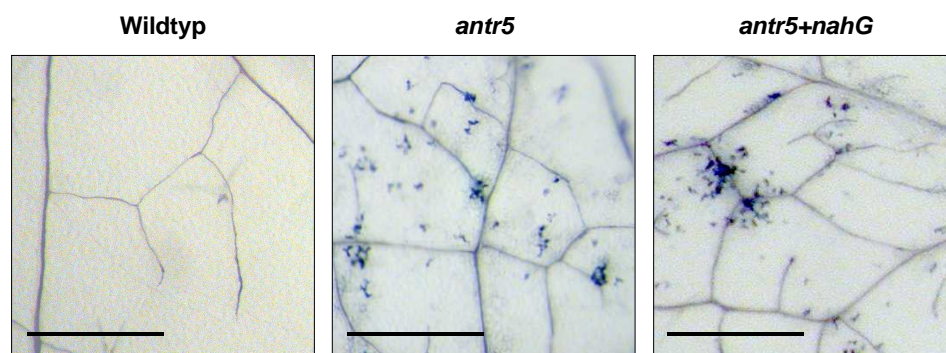


Abbildung 3.41: Trypanblau-Färbung der Blattgewebe von Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen
Teilstrich: 1 mm.

Die Überexpression von *nahG* und daraus resultierende, reduzierte Salizylsäure-Gehalte konnten die Entstehung der Läsionen nicht verhindern. Damit ist die Bildung von Läsionen bei *antr5*-Insertionsmutanten unabhängig von Salizylsäure-Akkumulation.

3.11.9.5 Phänotyp der *antr5+nahG*-Mutanten

antr5-Insertionsmutanten weisen einen zwergenhaften Phänotypen und verlangsamte Entwicklung bei Wachstum auf Erde auf. Mittels *antr5+nahG*-Mutanten wurde die Bedeutung der Salizylsäure für den phänotypische Veränderungen bei *antr5*-Insertionsmutanten untersucht. Dazu wurden die Wildtyppflanzen, *antr5*- und *antr5+nahG*-Mutanten 3 Wochen lang auf Erde auf Erde angezogen und miteinander verglichen (Abb. 3.42).

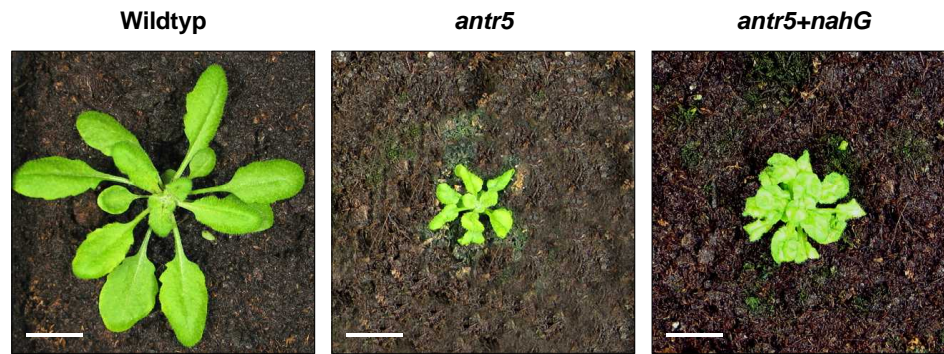


Abbildung 3.42: Phänotyp von 3 Wochen alten Wildtyppflanzen, *antr5*- und *antr5+nahG*-Mutanten. Pflanzen wurden auf Erde unter Kurztagbedingungen angezogen. Teilstrich: 1 cm.

Durch die *nahG*-Überexpression und Reduktion von Salizylsäure konnte der zwerghafte Phänotyp der *antr5*-Insertionsmutanten nicht aufgehoben werden. Zwar war der Habitus der *antr5+nahG*-Mutanten etwas größer als der Habitus der *antr5*-Mutanten, wies aber im Vergleich zu Wildtyp ein retardiertes Wachstum auf. Des Weiteren zeigten die Blätter wie bei *antr5*-Pflanzen verdrehte bzw. gekräuselte Struktur.

3.12 Wachstumsanalysen der Wildtyppflanzen und *antr5*-Mutanten bei Salzstress

Neben den biotischen Faktoren wie Pathogenbefall können auch abiotische Faktoren wie z. B. Trockenheit, Licht- oder Salinität Stresssituationen für die Pflanzen darstellen und weltweit enorme Ernteeinbußen verursachen (BOYER, 1982). Hohe Salzkonzentrationen verursachen Störungen im Ionen- und Wasserhaushalt der Zelle und können den programmierten Zelltod auslösen (HUH *et al.*, 2002; KATSUHARA, 1997).

Da *antr5*-Insertionsmutanten spontanes Absterben der Zellen aufweisen (Kap. 3.11.2), wurde in diesem Zusammenhang die NaCl-Wirkung auf die *antr5*-Pflanzen untersucht. Hierzu wurden die Wildtyp- und *antr5*-Keimlinge in Sterilkultur angezogen. Dabei wurde dem MS-Nährmedium 100 mM NaCl beigefügt, als Kontrolle diente MS-Medium ohne NaCl.

In der Abbildung 3.43 zeigen die Kontrollpflanzen der Sterilkultur keine Unterschiede im Wachstum oder Entwicklung, *antr5*- und Wildtypkeimlinge weisen jeweils eine ähnliche Größe und Wurzelarchitektur auf. Im Vergleich zur Kontrollanzucht sind die auf 100 mM NaCl kultivierten Wildtyppflanzen im Wachstum gehemmt und bilden kürzere Wurzeln aus. Bei *antr5*-Pflanzen ist die durch NaCl verursachte Wachstumshemmung noch deutlicher ausgeprägt und wirkt sich besonders auf die Wurzeln aus. Die Wurzeln dieser Pflanzen sind dramatisch verkürzt, zeigen einen höheren Verzweigungsgrad und stark angeschwollene Wurzelspitzen auf (Abb. 3.43).

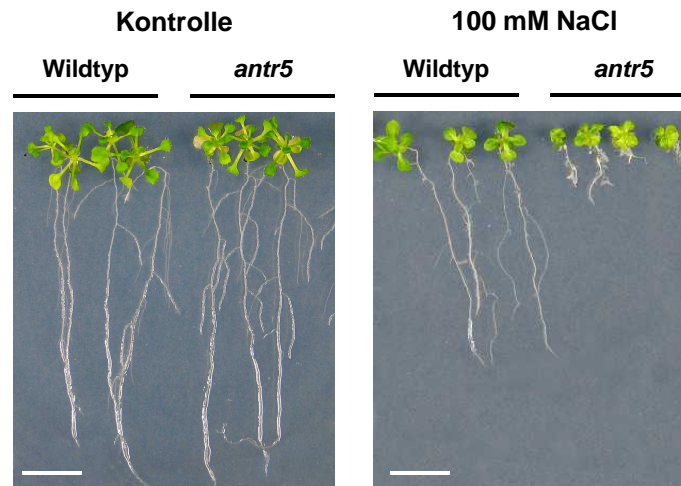


Abbildung 3.43: Wachstumsvergleich von 21 Tage alten Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen in Sterilkultur mit und ohne NaCl. Teilstrich: 0,5 cm.

In der Abbildung 3.44 sind Detailaufnahmen der Wurzelspitzen zu sehen. Auf Kontrollplatten gekeimten *antr5*- und Wildtyppflanzen zeigen keine Veränderungen im äußeren Erscheinungsbild. Während die Morphologie der Wildtyp-Wurzelspitzen auch durch NaCl-Zugabe sich nicht verändert, sind die Wurzeln bei *antr5*-Keimlingen deutlich dicker im Durchmesser und erscheinen im Ganzen angeschwollen. Auch die Wurzelhaare der *antr5*-Keimlinge sind dicker und unregelmäßig in ihrem Wachstum.

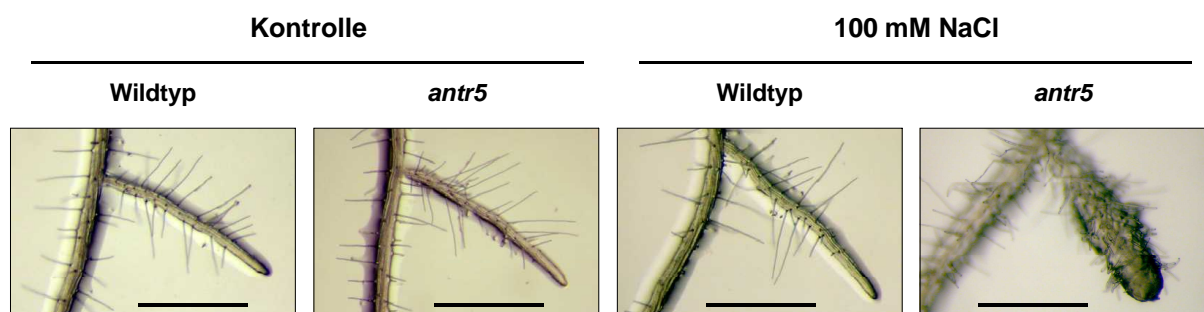


Abbildung 3.44: Detailaufnahme der Wurzelspitzen von 21 Tage alten Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen in Sterilkultur mit und ohne NaCl. Teilstrich: 1 mm.

Um den Ursachen dieser Störung auf den Grund zu gehen wurden von den Wurzelspitzen der Wildtyp- und *antr5*-Keimlinge Dünnschnitte angefertigt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Wie in der Abbildung 3.45 zu sehen ist, unterscheiden sich die Wurzelspitzen der untersuchten Pflanzen beim Wachstum auf Kontrollplatten nicht von einander.

In der Teilungszone befinden sich die Apikalmeristeme der jeweiligen Wurzeln. Das Meristemgewebe teilt sich und liefert dadurch neue Zellen für das Wurzelwachstum. Dieses Gewebe beinhaltet kleine Zellen ohne große Zentralvakuolen aus, außerdem ist das Chromatin während der Teilung kondensiert, so dass die Zellkerne als dunkle Punkte sichtbar sind (Abb. 3.45). Die Teilungszone geht in die Streckungszone über, wo sich die einzelnen

Zellen verlängern und dadurch dem Längenwachstum der Wurzeln dienen. Die beschriebenen Wachstumszonen der Wurzelspitzen von Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen stimmen in ihrer Erscheinung bei Kontrollanzucht ohne NaCl überein.

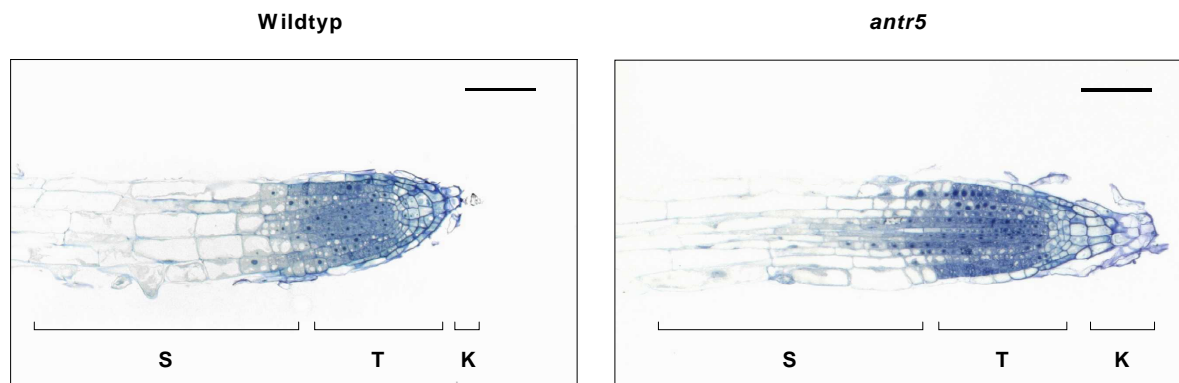


Abbildung 3.45: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Dünnschnitte im Bereich der Wurzelspitzen von 21 Tage alten Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen in Sterilkultur auf Kontrollplatten ohne NaCl. S: Streckungszone; T: Teilungszone K: Kalyptra. Teilstrich: 50 μm .

In der Abbildung 3.46 sind die Unterschiede zwischen Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen bei Sterilanzucht mit 100 mM NaCl deutlich zu sehen. Wie zuvor beobachtet, verursacht NaCl bei Wildtypkeimlingen keine Veränderungen in der Morphologie der Wurzelspitzen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.44; Abb. 3.46). Bei *antr5*-Wurzelspitzen treten starke Veränderungen im Apikalmeristem der Teilungszone auf. Im Vergleich zu korrespondierenden Wildtyppflanzen oder *antr5*-Keimlingen aus der Kontrollanzucht (Abb. 3.46) sind hier nur wenige meristematischen Zellen zu finden. Die Zellen der Streckungszone sind im Vergleich zum Wildtyp viel größer, bauchig aufgebläht und erscheinen ungeordnet im Zellverband.

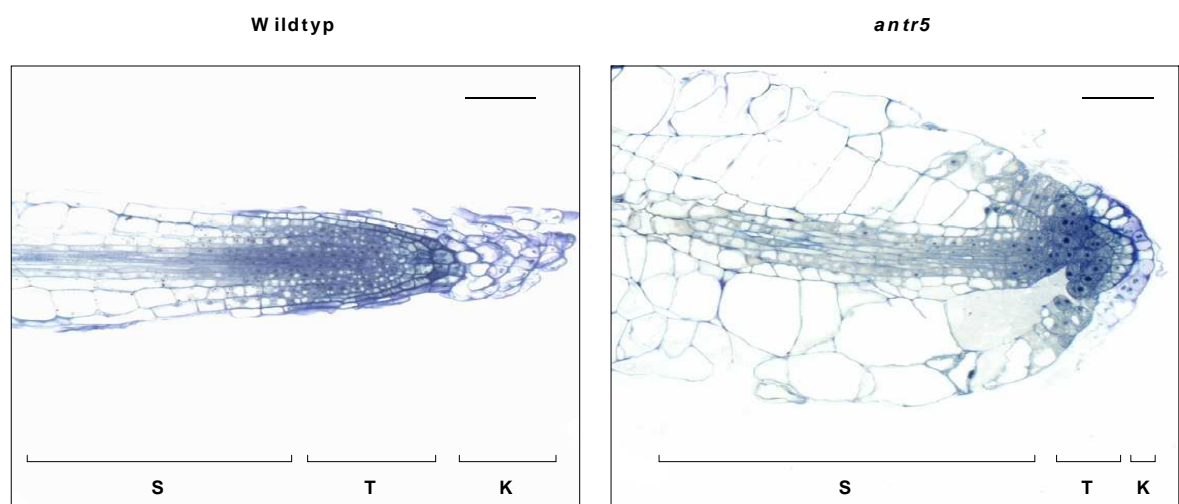


Abbildung 3.46: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Dünnschnitte im Bereich der Wurzelspitzen von 21 Tage alten Wildtyp- und *antr5*-Keimlingen in Sterilkultur mit 100 mM NaCl. S: Streckungszone; T: Teilungszone K: Kalyptra. Teilstrich: 50 μm .

Grundsätzlich ist die Wurzelspitze von einer Wurzelhaube, sogenannten Kalyptra, bedeckt, die das Meristemgewebe schützt. Während der Präparation der Dünnschnitte geht dieser lockerer Zellenverband meist verloren, wie das bei den Wildtypkeimlingen auf Kontrollplatten der Fall ist (Abb. 3. 45). Aus diesem Grund wurde die Entwicklung der Kalyptra in die Auswertung nicht miteinbezogen, sondern nur zur Orientierung gekennzeichnet.

3.12.1 Visualisierung abgestorbener Zellen von *antr5*-Keimlingen bei Salzstress

Wachstumsanalysen bei Salzstress haben bereits gezeigt, dass *antr5*-Mutanten empfindlicher auf Salz reagieren als Wildtyppflanzen. Mit Hilfe von Trypanblau-Färbung wurden durch Salzstress verursachte Gewebeschäden visualisiert. Hierzu wurden die Wildtyp- und *antr5*-Keimlinge in Sterilanzucht mit 100 mM NaCl im Nährmedium für 3 Wochen kultiviert und anschließend der Trypanblau-Färbung unterzogen. Als Kontrolle wurden korrespondierende Keimlinge in Sterilkultur ohne NaCl-Zugabe verwendet. Bei Kontrollpflanzen konnte weder bei Wildtyp noch *antr5*-Mutanten Blaufärbung detektiert und damit abgestorbenen Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

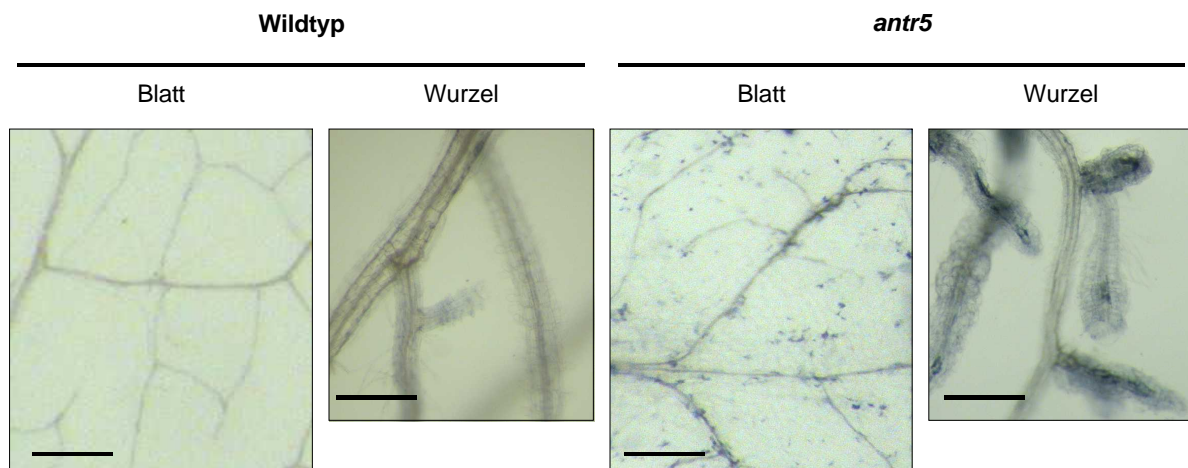


Abbildung 3.47: Trypanblau-Färbung der Blatt- und Wurzelgewebe von 21-Tage alten Wildtyp und *antr5*-Keimlingen in Sterilkultur mit 100 mM NaCl im MS-Nährmedium. Teilstrich: 0,125 mm.

Keine der untersuchten Gewebetypen der Wildtypkeimlinge weisen Blaufärbung auf (Abb. 3.47), weder im Blatt oder Wurzel konnten abgestorbenen Zellen nachgewiesen werden. Das Gewebe der *antr5*-Keimlingen zeigt dagegen deutlich angefärbte Areale, was in Blatt und Wurzel auf abgestorbene Zellpopulation hindeutet.

antr5-Insertionsmutanten reagieren deutlich sensitiver als Wildtyppflanzen auf Salzstress, was sich in einer deutlichen Wachstumshemmung, veränderten Wurzel- und Zellmorphologie sowie im Auftreten abgestorbenen Zellen äußert.

4 Diskussion

Erst kürzlich wurde eine neuartige Proteinfamilie, ANTR genannt, in *Arabidopsis thaliana* entdeckt, die nach bisherigen Erkenntnissen als erste pflanzliche Proteingruppe der Familie der Anion-Cation-Symporter zugeordnet wurde (ROTH *et al.*, 2004). Die AtANTR-Proteine weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu den tierischen Transportern der NaPi1-Familie auf, zu der neben dem plasmamembranständigen Natrium-Phosphat-Transporter auch lysosomale Sialintransporter oder vesikuläre Glutamatttransporter gehören. Diese AtANTR-Proteinfamilie aus *Arabidopsis thaliana* umfasst 6 putative Membranproteine, AtANTR1-6. Von ROTH *et al.* (2004) wurden bereits umfassende Untersuchungen an AtANTR1 und AtANTR2 durchgeführt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den tierischen NaPi1-Transportern wurden Phosphat, Chlorid, Glutamat oder andere organische Säuren als potentielle Transportsubstrate postuliert. Die Aufklärung der physiologischen Bedeutung eines weiteren Proteins der AtANTR-Familie, AtANTR5, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Dabei wurde die Rolle von AtANTR5 in der Phosphathomöostase und in stickstoffabhängigen Prozessen überprüft. Außerdem wurde der Einfluss biotischer und abiotischer Faktoren auf eine *antr5*-Insertionsmutante untersucht und insbesondere die Abwehrreaktion und die Resistenz gegen Phytopathogene (*Pseudomonas syringae*) analysiert. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit 7 weitere Proteine aus *Oryza sativa* ebenfalls als ANTR-Proteine identifiziert und eine enge funktionelle Verwandtschaft zwischen AtANTR5 und OsANTR5.1 mittels Komplementation der *antr5*-Mutanten nachgewiesen.

4.1 Subzelluläre Lokalisierung des AtANTR5-Proteins

Alle AtANTR-Proteine, außer AtANTR5, besitzen eine plastidäre Targetsequenz am N-Terminus der Polypeptidkette. Plastiden, als typische pflanzliche Organellen, sind durch Endosymbiose mit einem cyanobakterien-ähnlichen Prokaryoten entstanden (MCFADDEN, 1999). Während der pflanzlichen Evolution sind mehr als 95% der Gene des Endosymbionten entweder verloren gegangen oder in den Nukleus der Wirtszelle transferiert worden (MARTIN & HERRMANN, 1998). Diese kernkodierte plastidären Proteine besitzen eine spaltbare Signalsequenz, die für ihren korrekten Transport in die Plastiden essentiell ist. Solche Proteine werden im Cytosol synthetisiert und mit Hilfe des N-terminalen Targetingsignals post-translational in die Organellen transportiert (CHEN & SCHNELL, 1999; SOLL, 2002). Mittels GFP-Fusion wurde der Plastid als Zielorganell von AtANTR1 bestätigt. Ferner wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper AtANTR2 in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten identifiziert (ROTH *et al.*, 2004). Dem AtANTR5-Protein fehlt die N-terminale Signalsequenz, die notwendig ist um Proteine korrekt in die plastidäre Membran zu

transportieren. Jedoch konnten bisher zwei Proteine identifiziert werden, QORH (*quinone oxidoreductase*) und IEP32 (*inner envelope protein 32*), die kein N-terminales Signal besitzen und trotzdem eine plastidäre Lokalisierung aufweisen (NADA & SOLL, 2004, MIRAS *et al.*, 2002). Demzufolge schließt die Abwesenheit des typischen Targetingsignals nicht zwingend eine plastidäre Lokalisierung eines Proteins aus.

Mit Hilfe des *AtANTR5::GFP*-Fusionsproteins sollte vor diesem Hintergrund das Zielorganell des *AtANTR5* identifiziert und überprüft werden, inwiefern alle *AtANTR*-Proteine, *AtANTR5* einbezogen, ein plastidäres Targeting aufweisen oder ob *AtANTR5* eine Besonderheit innerhalb der Familie darstellt und in einem anderen Kompartiment lokalisiert ist. Die Lokalisierungsstudien an *Arabidopsis*-Suspensionszellkultur haben gezeigt, dass der Golgi-Apparat vermutlich das Zielorganell von *AtANTR5* ist. Die Co-Expression des mit DsRedII fusionierten Golgi-Markerenzym Sialyltransferase (BRANDIZZI *et al.*, 2004; SAINT-JORE *et al.*, 2002; WEE *et al.*, 1998) und des *AtANTR5::GFP*-Fusionsproteins zeigten eine exakte Überlagerung der Fluoreszenzsignale (Kap. 3.4.2).

Der Golgi-Apparat ist das zentrale zelluläre Kompartiment im sekretorischen Transportweg der Proteine. Beim sekretorischen Komplex handelt es sich um ein System von Endomembranen welches das Endoplasmatische Retikulum (ER), den Golgi-Apparat, Endosomen, prevakuoläre Kompartimente, die Vakuole und Lysomen beinhaltet (OKITA & ROGERS, 1996). Eine Vielzahl von Proteinen und Zellwandkomponenten werden dort synthetisiert und prozessiert. Die sekretorischen Proteine werden bereits beim Synthetisieren der Polypeptidkette durch Ribosomen ins ER sezerniert, dort mit Hilfe der Chaperone gefaltet, glykosyliert, und in Vesikeln verpackt zum Golgi-Apparat transportiert. Proteine durchwandern den Golgi-Apparat von der *cis*- zur *trans*-Seite, werden dabei prozessiert und in Vesikeln zum Bestimmungsort geleitet (MATLACK *et al.*, 1998; MIZUNO & SINGER, 1993; STAEHELIN, 1997; STAEHELIN & MOORE, 1995). Neben dem Endoplasmatischen Retikulum stellt der Golgi-Apparat ein Kompartiment dar, in dem Glykosylierung und Phosphorylierung von Proteinen, Proteoglycanen oder Lipiden stattfinden (OKITA & ROGERS, 1996). Mittels sekretorischen Transportes werden neben Proteinen auch Lipide und Zellwandkomponenten, jedoch nicht Cellulose oder Callose transportiert. Sekretion ist in vielen unterschiedlichen Prozessen der Pflanzenentwicklung und des Zellwachstums wie z. B. Zellwandentstehung, Wachstum des Pollenkeimschlauchs, Xylemdifferenzierung oder Schleimbildung der Wurzelspitzen involviert (BATTEY & BLACKBOURN, 1993; THIEL & BATTEY, 1998). Es ist zu vermuten, dass *AtANTR5* bei einem dieser Prozesse eine Rolle spielt.

4.2 Expressionsanalysen von *AtANTR5*

Von den 6 Isoformen der *AtANTR*-Proteine wurden bisher nur bei *AtANTR1* und *AtANTR2* Untersuchungen bezüglich ihrer Expression durchgeführt (ROTH *et al.*, 2004). „Western-Blot“-

Analysen und Immunolokalisierungsstudien dienten zur Analyse der gewebespezifischen und entwicklungsabhängigen Expression der beiden Proteine. Dabei konnte *AtANTR2* in den Blättern, im Spross, in grünen, sich entwickelnden Schoten und während der Entwicklung der Samen detektiert werden. Die Expression von *AtANTR1* war in allen untersuchten Geweben und Entwicklungsstadien sehr gering bzw. nicht detektierbar (ROTH *et al.*, 2004).

Mit Hilfe der *AtANTR5*-Promotor-GUS-Fusion wurden erstmals Expressionsanalysen von *AtANTR5* durchgeführt (Kap. 3.6). Die Expression von *AtANTR5* war in den meisten Geweben gering und außer in den Antheren mittels GUS-Färbung kaum detektierbar (Abb. 3.10). Dennoch wird *AtANTR5* auch den Blättern exprimiert, wie durch die RT-PCR, einer weitaus sensitiveren Methode, eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.11 C). Die Expression von *AtANTR5* ist zwar sehr niedrig, jedoch offensichtlich essentiell für die Entwicklung und das Wachstum der Pflanze, da eine vollständige Unterdrückung der Transkription des Gens durch eine T-DNA-Insertion gravierende Wachstumshemmungen verursacht (Kap. 3.7.2).

Die stärkste entwicklungspezifische Expression von *AtANTR5* konnte in Antheren festgestellt werden. Während der Pollenentwicklung wird eine besonders hohe Aktivität sekretorischer Organellen benötigt, die vor allem bei der Pollenreifung stattfindet. Das Tapetum ist eine Zellschicht, die die Pollen mit Nährstoffen versorgt und einen hoch aktiven sekretorischen Fluss aufweist (BEDINGER, 1992; CHAPMAN, 1987). Während der einzelnen Schritte der Mikrosporogenese, der Reifung und Freisetzung der Pollen wird PCD initiiert und führt zum selektiven Zelltod einzelner Gewebetypen. So sterben die Tapetum-Zellen sowie Teile des umliegenden Antherengewebes nach der Reifung der Pollen ab und ermöglichen dadurch die Freisetzung der Pollenkörner (BEDINGER, 1992; CHAPMAN, 1987; WU & CHEUNG, 2000).

AtANTR5 ist im Golgi lokalisiert und vermutlich deshalb in sekretorisch aktiven Geweben induziert, jedoch konnte keine erhöhte Expression von *AtANTR5* in meristematischen Geweben detektiert werden, die ebenfalls eine hohe sekretorische Aktivität aufweisen. Möglicherweise ist *AtANTR5* für die jeweilige Funktion des Golgi oder der Vesikel charakteristisch, die sich je nach Zelltyp und Spezialisierung unterscheiden. Des Weiteren könnte *AtANTR5* eine Rolle bei der Apoptose innehaben, da *antr5*-Mutanten eine Störung aufweisen die im weiteren zum spontanen Absterben der Zellen führen (Kap. 3.11.2). Bei manchen „mimic disease“-Mutanten, denen ein negativer Regulator in der Signalkaskade der Apoptose fehlt, wurde oft ein Zusammenhang zwischen PCD und der verminderten Reproduktionsfähigkeit festgestellt werden. Bei den *mpk4*-Mutanten (*map kinase 4*) ist beispielsweise die Produktion und die Fertilität der Pollen stark reduziert (PETERSEN *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang wäre es von besonderem Interesse die Reproduktionsfähigkeit und die Pollenentwicklung bei *antr5*-Mutanten eingehender zu untersuchen.

4.3 Phänotyp der *antr5*-Insertionsmutanten

Bei den *antr5*-Pflanzen wurde eine gravierende Veränderung des Wachstums und der Entwicklung im Vergleich zu Wildtyppflanzen festgestellt. Die Rosette der Mutante zeigt eine zwergenhafte Statur mit eingedrehten Blättern (Kap. 3.7.2). Im Blattgewebe konnte Entstehung von Läsionen, die Akkumulation von Abwehrrelevanter Gene, H₂O₂, Callose und Salizylsäure nachgewiesen werden, die mit einer erhöhten Resistenz gegen Krankheitserreger korrelieren (Kap. 3.11). Es wurden zahlreiche Mutanten identifiziert, darunter *cpr22* (constitutive expresser of PR genes), *acd6*, (accelerated cell death), *ssi1*, *ssi4* (suppressor of SA and insensitivity of npr1), *lsd6* (lesions simulating disease), *cpn1* (copine), *bon1* (bonzai 1), *cad1* (constitutively activated cell death 1) oder *mpk4* die wie *antr5*-Pflanzen eine aktivierte Pathogenabwehr und entsprechend eine erhöhte Resistenz aufweisen (JAMBUNATHAN *et al.*, 2001; MORITA-YAMAMURO *et al.*, 2005; PETERSON *et al.*, 2000; RATE *et al.*, 1999; SHAH *et al.*, 1999; WEHMANN *et al.*, 1995; YANG & HUA, 2004; YOSHIOKA *et al.*, 2002; YOSHIOKA *et al.*, 2006). Anhand der Übereinstimmungen bei molekularen und biochemischen Merkmale, kann postuliert werden, dass die *antr5*-Insertionsmutanten eine weitere „mimic-disease“- Mutante darstellt. Die Rolle von *AtANTR5* bei Pathogenabwehr werden genauer im Kapitel 4.7 erläutert.

Die konstitutiv aktivierte Pathogenabwehr steht bei „mimic-disease“-Mutanten oft in einem Zusammenhang mit zwergenhaften Wuchs der Pflanzen (CLOUGH *et al.*, 2000; GREENBERG, 1997; HEIL & BALDWIN, 2002). Die ständige Aktivierung der Abwehrreaktionen führt zur massiven Verschiebung der Stoffwechselprozesse mit weitreichenden Folgen für die Entwicklung der Pflanzen. Neben der Reduktion der Biomasse kann oft ein verkürzter Lebenszyklus, eine verminderte Reproduktionsfähigkeit oder sogar Sterilität der Pflanzen eintreten. So kann applizierte Jasmonsäure den Tabakpflanzen eine Resistenz gegenüber den Pathogenen verleihen, jedoch wird dabei die Samenproduktion reduziert und die Generationszeit verkürzt (BALDWIN, 1998). Im Nikotin, der toxischen Abwehrsubstanz, können bis zu 8% des Gesamtstickstoffs der Pflanze gebunden sein, der nicht mehr mobilisiert und für andere Stoffwechselprozesse verwendet werden kann (BALDWIN & OHNMEISS, 1994; VAN DAM & BALDWIN, 2001). Im Gegensatz dazu kann eine Deaktivierung der Abwehrreaktion zur Ertragssteigerung bei *Solanum tuberosum* führen. So enthalten Lipoxigenase-Antisense-Pflanzen weniger Proteinase-Inhibitoren und sind suszeptibel gegenüber Schädlingen, aber sie produzieren größere Knollen (ROYO *et al.*, 1999). Bei Pflanzen, die Salizylsäure akkumulieren, können Ungleichgewichte im Phenylpropanoidweg auftreten, da ein großer Anteil an Chorismat zur Salizylsäuresynthese und zum Nachteil anderer biosynthetischer Prozesse verwendet wird (MAUCH *et al.*, 2001). Außerdem ist Salizylsäure neben der Pathogenabwehr, auch als ein Signalmolekül in der Seneszenz und

im Zellwachstum involviert und kann dadurch das Wachstum der Pflanzen beeinflussen (MORRIS *et al.*, 2000; RATE *et al.*, 1999; VANACKER *et al.*, 2001).

4.4 Rolle von AtANTR5 in der Phosphathomöostase

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der AtANTR-Proteine zum Natrium-Phosphat-Transporter1 von *Oryctolagus cuniculus* wurde die Rolle von AtANTR5 im Phosphatstoffwechsel überprüft. Phosphat ist einer der essentiellen, aber oft limitierten, Makronährstoffe. Aufgrund seiner zumeist relativ geringen Verfügbarkeit haben verschiedene Organismen zahlreiche Wege zum Schutz bzw. zur Überwindung solcher Pi-Mangelsituationen entwickelt. Bei Mikroorganismen liegen detaillierte Untersuchungen über die Reaktion auf Pi-Mangel auf biochemischer, genetischer und molekularer Ebene vor. Extrazellulärer Pi-Mangel führt bei *Escherichia coli* zur Induktion verschiedener Gene, die aufgrund ihrer gemeinsamen Regulation zu einem PHO-Regulon zusammengefasst werden (MARTIN *et al.*, 1989; TORRIANI, 1990; WANNER, 1993). Auch in der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde das entsprechende PHO-Regulationssystem charakterisiert (LENBURG & O'SHEA, 1996; OGAWA *et al.*, 2000; OSHIMA *et al.*, 1996). Zu den bei Pi-Mangel aktivierten Genen zählen unter anderem extrazelluläre alkalische und saure Phosphatasen, vakuoläre alkalische Phosphatasen, Pi-Transportsysteme, sowie sensorische und regulatorische Faktoren. Analog zu *E. coli* und *S. cerevisiae* wurden auch in Pflanzen mehrere homologe Proteine identifiziert, die auf ein ähnliches System hinweisen (BARIOLA *et al.*, 1994; DUFF *et al.*, 1994; GOLDSTEIN *et al.*, 1988; TRULL & DEIKMAN, 1998; ZAKHLENIUK *et al.*, 2001).

Bei Phosphatmangel ist die Aktivierung der Phosphataufnahmesysteme neben weiteren morphologischen und physiologischen Reaktionen der Pflanzen, einer der wichtigsten regulatorischen Mechanismen (RAGHOTHAMA, 2000). Für Pflanzen, aber auch für Bakterien (HARRIS *et al.*, 2001), Hefe (PERSSON *et al.*, 1998; ZVYAGLISKAYA *et al.*, 2001) und Säuger (WERNER *et al.*, 1998) wurden jeweils hoch- und niedrigaffine Transportmechanismen beschrieben, deren Expression einer strikten Regulation unterliegt. Während die Pi-Konzentration im Boden selten 10 μM überschreitet (MARSCHNER, 1995), ist der Pi-Gehalt in den pflanzlichen Zellen meist 1000-fach höher und beträgt bis zu 10 mM (BIELESKI, 1973), so dass unter physiologischen Bedingungen eine Pi-Aufnahme gegen den Konzentrationsgradienten erfolgt und energetisiert werden muss. Pflanzliche Phosphattransporter katalysieren einen protonengekoppelten Phosphatsymport und nutzen dabei den elektrochemischen Protonengradienten, der mit Hilfe von P-Typ-ATPasen aufgebaut wird (ULRICH-EBERIUS *et al.*, 1981; ULRICH-EBERIUS *et al.*, 1984). Einen wesentlichen Unterschied im Transportmechanismus von Phosphat bei Tieren und Pflanzen stellt der elektrochemische Ionengradient über die Membran dar; so katalysieren tierische

Phosphattransporter im Gegensatz zu pflanzlichen Proteinen einen natriumabhängigen Symport (RAUCH & BUCHER, 2002; WERNER *et al.*, 1998). Bislang wurden Pi/H^+ -Symporter nur bei Pflanzen und Pilzen identifiziert und charakterisiert (RAGHOTHAMA, 2000). Na^+ -abhängiger Pi-Transport konnte in Bakterien, Pilzen, Tieren, aber auch bei der Grünalge *Chara corallina* gezeigt werden (ESCOUBET *et al.*, 1989; MARTINEZ & PERSSON, 1998; REID *et al.*, 2000). AtANTR-Proteine weisen strukturelle Ähnlichkeiten zum Natrium-Phosphat-Transporter1 von *Oryctolagus cuniculus* auf, der einen natriumabhängigen Phosphattransport über die Membranen katalysiert (WERNER *et al.*, 1998). Trotz dieser Ähnlichkeit ist es unwahrscheinlich, dass AtANTR-Proteine einen natriumgetriebenen Transport aufweisen, da Pflanzen keinen derartigen Gradienten über Membranen besitzen, so dass dort möglicherweise ein von elektrochemischen Protonengradienten abhängiger Substrattransport stattfinden könnte. Bislang wurde kein Na^+ -abhängiger Transportmechanismus bei höheren Pflanzen nachgewiesen, jedoch wird bei Halophyten, die verschiedene Mechanismen der Salzresistenz entwickelt haben, auch ein Na^+/Pi -Symport diskutiert (RAUCH & BUCHER, 2002).

Phosphathomöostase ist für die pflanzliche Zelle besonders wichtig und beinhaltet die Kontrolle der Pi-Konzentrationen einzelner Zellkompartimente wie Zytoplasma, Plastiden, Mitochondrien oder Vakuole. Das Phosphat im Cytosol und in den Chloroplasten stellt den „metabolischen Pool“ der Zelle dar, indem Pi an zahlreichen Reaktionen wie z. B. Phosphorylierung oder Energieübertragung beteiligt ist. Die Vakuole dient zur Speicherung von Phosphat und kann bis 90% des Gesamtphosphates der Zelle beinhalten (BIELESKI, 1973). Während die Phosphatkonzentrationen im Cytosol unter variierender Pi-Verfügbarkeit relativ konstant bleiben, unterliegt der Pi-Pool in der Vakuole deutlichen Schwankungen (MIMURA, 1999). Phosphat wird aus der Vakuole nach Bedarf freigesetzt oder aufgenommen, so dass auf diese Weise die Pi-Konzentration des „metabolischen Pools“ reguliert wird. Zwar wurden an isolierten Vakuolen von *Hordeum vulgare* und *Catharanthus roseus* Phosphataufnahmen gezeigt, jedoch konnten bislang keine entsprechenden Transportproteine im Tonoplasten identifiziert werden, die Phosphatimport oder -export katalysieren (MASSONNEAU *et al.*, 2000; MIMURA *et al.*, 1990).

Im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates finden viele ATP-abhängige Reaktionen statt, bei denen ADP und Pi entstehen (GETHING & SAMBROOK, 1992; MATLACK *et al.*, 1998). Der ATP-Pool im ER kann über einen ATP/ADP-Transporter, der im Gegentausch ATP importiert und ADP exportiert, regeneriert werden (LEROCH, 2006). Analog werden auch ATP/ADP-Transporter im Golgi postuliert, die jedoch bisher auf molekularer Ebene noch nicht identifiziert werden konnten. Auch die Existenz von Transportproteinen, die Phosphat aus den Lumen dieser Organellen transportieren und die Pi-Akkumulation verhindern, wird diskutiert (ABEIJON *et al.*, 1997). Da AtANTR5 Ähnlichkeiten zu tierischen

Phosphattransportern aufweist und vermutlich im Golgi lokalisiert ist, muss daher auch eine Rolle in der Phosphathomöostase des Golgi-Apparates in Betracht gezogen werden.

Mit Hilfe einer Vielzahl von *Arabidopsis*-Mutanten, die Störungen in der Phosphathomöostase aufweisen, wurden Transporter, Sensor- und Regulationsproteine identifiziert (BATES & LYNCH, 2000; TICCONI *et al.*, 2004; TRULL & DEIKMAN, 1998). Auch die *antr5*-Insertionsmutante wurde auf typische Veränderungen im Phosphathaushalt untersucht und mit den bereits beschriebenen Mutanten verglichen. Der Phänotyp der *antr5*-Mutante zeichnet sich durch ein retardiertes Wachstum aus (Kap. 2.7.2). Ein verlangsamtes Wachstum von Pflanzen ist eine typische Erscheinung bei Phosphatmangel und konnte ebenfalls bei *pho1*- oder *pht2;1-1*-Mutanten mit veränderter Pi-Homöostase beobachtet werden (POIRIER *et al.*, 1991; VERSAW & HARRISON, 2002). Wie bei der *pho1*-Mutante, konnte auch bei *antr5*-Pflanzen durch erhöhte Phosphatverfügbarkeit das Wachstum verbessert und eine Zunahme an Frischgewicht erzielt werden, die jedoch das zwergenhafte Erscheinungsbild der Mutanten nicht vollständig aufheben konnte (Kap. 3.10.2.2, Abb. 3.21). Das veränderte Wachstums ist vermutlich durch Düngeeffekte verursacht worden, da auch bei Wildtyppflanzen eine leichte Verbesserung des Wachstums zu sehen war. Des Weiteren könnte bei *antr5*-Mutanten die osmotische Wirkung der Phosphationen zur Zellexpansion beitragen und damit eine geringe Wachstumssteigerung bewirken.

Phosphatmangel hat starke Auswirkungen auf Respiration, Glykolyse und besonders die Photosynthese (NATR, 1992). Die photosynthetische Leistung sowie der Chlorophyllgehalt sind bei den *antr5*-Mutanten jedoch unverändert im Vergleich zu Wildtyppflanzen (Kap. 3.10.1), was auf eine ausreichende Phosphatversorgung der Zellen hinweist.

Störungen der Phosphathomöostase können auch Auswirkungen auf den Phosphatgehalt haben. So beträgt der Phosphatgehalt der *pho1*-Mutante nur ca. 20% des Phosphatgehaltes der Wildtyppflanzen und ist damit stark reduziert (POIRIER *et al.*, 1991). Dagegen ist der Pi-Gehalt bei *pho2*-Mutante erhöht und beträgt ca. 350% des Pi-Gehaltes von Wildtyppflanzen (DELHAIZE & RANDALL, 1995). Bei den Phosphatgehalten von Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen konnten jedoch keine Unterschiede festgestellt werden (Kap. 3.10.2.1).

Eine der wichtigen Anpassungen an Phosphatmangel ist die Veränderung der Wurzelarchitektur, die sich in einer stärkeren Bildung der Lateralwurzeln und längeren und dichteren Wurzelhaaren äußert. *Arabidopsis*-Pflanzen bilden bei Wachstum unter Pi-Mangel bis zu 3 mal längere und 5 mal dichtere Wurzelhaare aus, wodurch die Kontaktfläche zwischen den Pflanzenwurzeln und dem Medium vergrößert und eine höhere Aufnahmekapazität geschaffen wird (BATES & LUNCH, 1996; MA *et al.*, 2001). So wurden zahlreiche Mutanten charakterisiert, darunter *rhd6* (*r*educed root *h*air *d*ensity) oder *pdr2* (*p*hosphate *d*eficiency *r*esponse), bei denen eine Veränderungen der Wurzelarchitektur, wie die Wurzellänge, der Verzweigungsgrad oder die Wurzelhaarmorphologie bei unterschiedlicher

Pi-Verfügbarkeit beobachtet wurde (BATES & LUNCH, 2000; TICCONI *et al.*, 2004). Bei Anzucht von Wildtyppflanzen und *antr5*-Insertionsmutanten bei unterschiedlichen Pi-Konzentrationen konnten jedoch keine Abweichungen im Wachstum, Architektur, Länge oder Dichte von Wurzeln und Wurzelhaaren festgestellt werden (Kap. 3.10.2.3).

Die Induktion von Phosphatasen ist eine der universellen Antworten auf Pi-limitierende Bedingungen und wurde bei Bakterien, Hefen und Pflanzen nachgewiesen. In Pflanzen konnte eine große Gruppe dieser Enzyme identifiziert werden, die intra- und extrazellulär agieren und Phosphat aus organischen Verbindungen freisetzen (DINKELACKER & MARSCHNER 1992; DUFF *et al.*, 1994; TADANO *et al.*, 1993). Korrespondierende Mutanten, z. B. *pup1* (phosphatase-underproducer 1), wurden anhand der veränderten Phosphatasenaktivität identifiziert (TRULL & DEIKMAN, 1998). Bei *antr5*-Mutanten konnte keine veränderte Phosphatasenaktivität im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, weder bei Anzucht mit Phosphat, noch ohne Phosphat im Nährmedium (Kap. 3.10.2.5).

Die Akkumulation von Anthocyanen ist ebenfalls eine typische Reaktion der Pflanze bei limitierter Phosphatverfügbarkeit. Bei Mutanten mit gestörter Phosphathomöostase z. B. *pho1*, *pup1* wurde oft eine verstärkte Akkumulation dieser Pigmente beobachtet (POIRIER *et al.*, 1991; TRULL & DEIKMAN, 1998), *antr5*-Mutanten wiesen jedoch weder beim Kultivieren auf Erde, noch unter phosphatlimitierenden Bedingungen in Sterilkultur eine Veränderung in der Anthocyan-Akkumulation auf (Kap. 3.10.2.4).

Im Vergleich zu den bereits beschriebenen Mutanten mit gestörtem Pi-Haushalt zeigten die *antr5*-Pflanzen nur wenige Gemeinsamkeiten. Retardiertes Wachstum, wie es bei *antr5*-Mutanten zu beobachten ist, entsteht zwar oft im Zusammenhang mit Phosphatmangel oder bei gestörtem Pi-Haushalt, kann jedoch auch durch viele andere Störungen im Metabolismus der Pflanzen verursacht werden. Darüber hinaus konnten keine signifikanten Abweichungen zum Wildtyp in Bezug auf den Pi-Gehalt, Phosphataseaktivität, Akkumulation der Anthocyane oder Wachstum bei Phosphatmangel und damit in der Phosphathomöostase festgestellt werden. Exogene Phosphat-Applikation hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die *AtANTR5*-Expression (Kap. 3.10.2.6). Ferner zeigte *AtANTR5* nach heterologer Expression in *E. coli* keine Transportaktivität für Phosphat (Kap. 3.3). Mit Hilfe von Lokalisierungsstudien konnte der Golgi-Apparat als „Zielorganell“ für *AtANTR5* identifiziert werden. Bislang ist noch völlig unklar inwiefern dieses Kompartiment am Phosphathaushalt beteiligt ist oder welche Auswirkungen mögliche Störungen der Phosphathomöostase auf seine Funktion haben könnten. Der Golgi-Apparat ist ein verhältnismäßig kleines Kompartiment innerhalb einer Zelle, so dass ein Pi-Anstau im Lumen nur geringe Effekte auf den gesamten Pi-Pool und den Pi-Gehalt der Zelle hat, und dennoch die Homöostase und die Funktionsfähigkeit des Organells beeinträchtigen kann. Zwar kann die Funktion von *AtANTR5* als putativer Phosphatexporter in der Membran der Golgi-Vesikel nicht vollkommen ausgeschlossen

werden, dennoch konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Hinweise auf eine solche Funktion gewonnen werden.

4.5 Rolle von *AtANTR5* im Stickstoffmetabolismus

Die NaPi1-Gruppe ist sehr heterogen und enthält neben den Phosphat-Transportern auch Glutamattransporter, die den Glutamatimport in die Vesikel der Neuronen vermitteln. In tierischen Organismen fungiert Glutamat als Neurotransmitter und ist an der exzitatorischen Erregungsleitung beteiligt. Obwohl im Genom von *Arabidopsis* mehrere Homologe zu tierischen Glutamatrezeptoren (GluR) identifiziert wurden, konnte für Pflanzen eine solche Signaltransduktion nicht belegt werden (DAVENPORT, 2002; LAM *et al.*, 1998). Zwar konnten durch Glutamat induzierte Kalziumströme sowie eine Beteiligung der GluRs an den kalziumvermittelten Signaltransduktionskaskaden beobachtet werden, jedoch bleiben die Mechanismen und die physiologische Bedeutung dieser Abläufe in Pflanzen unklar (DEMIDCHIK *et al.*, 2004; DENNISON & SPALDING, 2000; KIM *et al.*, 2001). Weiterhin wird dem Glutamat eine zentrale Rolle im pflanzlichen Stickstoffmetabolismus zugeschrieben, da es als primärer Akzeptor des anorganischen Stickstoffs und Donor der Aminogruppe für andere Aminosäuren dient.

Um die Rolle von *AtANTR5* im Zusammenhang mit Glutamat oder anderen Aminosäuren zu analysieren, wurden Aminosäuregehalte in Wildtyppflanzen und *antr5*-Insertionsmutanten bestimmt (Kap. 3.10.3.1). Dabei konnten abweichende Gehalte der Aminosäuren Cystein, Glutamat, Glutamin, Alanin, Threonin, Histidin, Leucin, Isoleucin, Lysin und Valin festgestellt werden, die jedoch sehr gering waren und im Rahmen der Schwankungsbreiten lagen. In Pflanzen schwanken die Aminosäurekonzentrationen je nach Tageszeit oder abhängig von Wachstumsfaktoren zum Teil erheblich, so dass die hier ermittelten Konzentrationen sehr starken Fluktuationen unterliegen können (YANAGISAWA *et al.*, 2004). Der Gesamtgehalt der Aminosäuren bei *antr5*-Mutanten war mit 97% fast gleich mit dem Gehalt der Wildtyppflanzen. Ferner waren keine Unterschiede in der Aktivität der Glutamin-Synthetase bei Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen messbar (Kap. 3.10.3.4). Da die GS-Aktivität unter anderem durch Aminosäuregehalte reguliert wird und GS das zentrale Enzym der Stickstoffassimilation darstellt, lassen die gemessenen Aktivitäten und Aminosäuregehalte vermuten, dass keine Störungen in der Stickstoffassimilation bei *antr5*-Pflanzen vorliegen.

Des Weiteren wurden die *antr5*-Mutanten in Sterilkultur mit Zusatz an verschiedenen Aminosäuren kultiviert (Kap. 3.10.3.2). Dabei konnten gravierende Wachstumshemmungen bei den *antr5*-Insertionsmutanten im Vergleich zu Wildtyppflanzen festgestellt werden. Die meisten Aminosäuren waren in höheren Konzentrationen (10-20 mM) toxisch für die Pflanzen, so dass auch bei Wildtypen hemmende Effekte beobachtet wurden. Die Aminosäuren Alanin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin,

Serin und Valin hatten einen besonders starken negativen Effekt auf das Wachstum und die Entwicklung der *antr5*-Mutanten.

Diese wachstumshemmende Wirkung der Aminosäuren auf die Pflanzen ist ein dosisabhängiger, bei *antr5*-Mutanten jedoch deutlich stärker ausgeprägter, Effekt. Die Aminosäuren, für die *antr5*-Mutanten eine höhere Sensitivität als Wildtyppflanzen aufwiesen, können keiner gemeinsamen Gruppe zugeordnet werden. So sind Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, und Prolin aliphatische Aminosäuren, Histidin dagegen besitzt eine basische Seitenkette und ist hydrophil. Methionin enthält ein Schwefelatom in einer Thioetherbindung und hat hydrophobe Eigenschaften, und bei Phenylalanin handelt es sich um eine Aminosäure mit einer aromatischen Seitenkette. Auch die Synthesewege der genannten Aminosäuren weisen keine Gemeinsamkeiten auf. Während Pyruvat als Vorstufe für die Synthese von Alanin, Valin und Leucin dient, können Prolin aus α -Ketoglutarat, Methionin und Isoleucin aus Oxalacetat, Phenylalanin aus Erythrose-4-Phosphat und Histidin aus Ribose-5-Phosphat synthetisiert werden (LAM *et al.*, 1995, HELD, 1999). Die Aminosäuren Serin und Glycin entstehen während der Photorespiration aus Glyoxylat (MURRAY *et al.*, 1987).

Der AS-Transport trägt entscheidend zur Stickstoffhomöostase bei und kann bei einer putativen Funktion von *AtANTR5* als ein Aminosäuretransporter die Toleranz der Mutanten gegenüber externen AS-Konzentrationen beeinflussen. Aminosäuren werden über weite Strecken im Phloem oder Xylem transportiert und die Gesamtkonzentration von Aminosäuren kann im Phloem 100-300 mM betragen (RIENS *et al.*, 1991, LOHAUS *et al.*, 1994, LOHAUS *et al.*, 1995). Obwohl Aminosäuren die häufigsten Substanzen im Xylem sind, ist ihre Gesamtkonzentration dennoch ca. zehnfach kleiner als im Phloem (PATE *et al.*, 1980; LAM *et al.*, 1995). Die häufigsten Aminosäuren im Xylem und im Phloem sind Glutamin, Glutamat und Aspartat, die deshalb oft als Transport-Aminosäuren bezeichnet werden. Zahlreiche Membranproteine sind an der AS-Aufnahme, am Beladen oder Entladen der Leitelemente, sowie an ihrem Transport über endogene Membranen beteiligt, die je nach Substratspezifität und Homologien in verschiedene Familien eingeteilt werden. Aus *A. thaliana* sind insgesamt 8 Transporter der AAP-Gruppe (amino acid permease) bekannt, die zu ATF1 (amino acid transporter superfamily 1) zählen und den protonengekoppelten Import neutraler und saurer Aminosäuren vermitteln (FISCHER *et al.*, 2002; OKUMOTO *et al.*, 2002). Außerdem wurden weitere AS-Transporter aus den Familien *AtCAT1* (cationic amino acid transporter), *AtLHT1* (lysine histidine transporter), *ANT1* (aromatic and neutral amino acid transporter), *ProT1* und *ProT2* (proline transporter) in *A. thaliana* identifiziert und charakterisiert (CHEN & BUSH, 1997; CHEN *et al.*, 2001; FROMMER *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 1991; RENTSCH *et al.*, 1996). Bislang wurden jedoch keine plastidären oder mitochondrialen Aminosäuretransporter beschrieben, obwohl viele Stoffwechselprozesse dieser Organellen die Existenz solcher Membranproteine vermuten lassen (WIPF *et al.*, 2002). Die bisher

charakterisierten Aminosäuretransporter transportieren meist mehrere Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften, die durch Größe, Ladung oder Struktur der Seitenketten selektiert werden (FISCHER *et al.*, 2002; SU *et al.*, 2004). Die *antr5*-Insertionsmutanten sind gegenüber vielen Aminosäuren sensitiv, die jedoch keine strukturellen oder metabolischen Gemeinsamkeiten aufweisen, so dass die Funktion von *AtANTR5* als putativer, spezifischer Aminosäuretransporter unwahrscheinlich ist. Ferner weist *AtANTR5* keine strukturellen Ähnlichkeiten zu den bisher charakterisierten pflanzlichen Aminosäuretransportern auf. Auch die biochemische Charakterisierung von *AtANTR5* im heterologen Hefe-System mit den Transportsubstraten Glutamat und Glutamin lieferte keine Hinweise auf eine mögliche Funktion des Proteins als Aminosäuretransporter (Kap. 3.3).

Eine Ursache für die wachstumshemmenden Effekte der Aminosäuren auf *antr5*-Pflanzen könnte in deren Funktion als Stickstofflieferanten liegen. Der Überfluss an organischem Stickstoff oder an freien Ammoniumionen, welche im Katabolismus der Aminosäuren entstehen, kann eine toxische Wirkung auf die Pflanzen haben. Deshalb wurden Anzuchtsexperimente mit Nitrat oder Ammonium als einziger Stickstoffquelle im Nährmedium durchgeführt (Kap. 3.10.3.3). Beim Kultivieren auf nitrathaltigem Nährmedium entwickelten sich Wildtyp- und *antr5*-Keimlinge ähnlich wie Kontrollpflanzen auf Vollmedium, wobei die *antr5*-Mutanten geringfügig größer waren (Kap. 3.10.3.3, Abb. 3.24). Wurde jedoch Ammonium als einzige Stickstoffquelle dem Nährmedium zugesetzt, konnte bei Wildtypen und *antr5*-Pflanzen eine hemmende Wirkung beobachtet werden. Die Wildtypkeimlinge waren kleiner als Kontrollpflanzen oder Pflanzen, die mit Nitrat versorgt wurden. Im Vergleich dazu war die Hemmung des Wachstums bei *antr5*-Mutanten viel stärker, so dass die Keimlinge nach der Keimung abstarben. Ähnliche Effekte beim Wachstum auf Ammonium oder Nitrat weist auch eine *amt1;1-TDNA*-Mutante auf, der ein hoch affiner Ammonium-Transporter, *AtAMT1;1*, fehlt (KAISER *et al.*, 2002). Beim Kultivieren auf Erde entwickeln sich die *amt1;1-TDNA*-Mutanten wie die Wildtyppflanzen und zeigen keine Verzögerungen oder Hemmung im Wachstum. Die Ursachen solcher Ammonium-Toxizität bei *amt1;1-TDNA*-Mutanten sind nicht eindeutig geklärt, wobei Osmolarität oder kompensatorische Effekte anderer Ammonium-Transporter kontrovers diskutiert werden (KAISER *et al.*, 2002).

Bei einer Funktion von *AtANTR5* als putativer Ammonium-Transporter könnte die mangelnde Stickstoffversorgung eine Ursache für eine derartige Wachstumshemmung verantwortlich sein. Durch das inaktivierte *AtANTR5*-Gen könnte das Ammonium-Sensing oder die Ammonium-Verteilung innerhalb der Zellen oder der ganzen Pflanze beeinflusst sein, so dass die *antr5*-Mutanten Ammonium nicht nutzen können. Da aber die Wildtyp- und *antr5*-Pflanzen, die auf stickstofffreiem Nährmedium kultiviert wurden und ihre eigenen Stickstoffreserven nutzten, zwar eine langsamere Entwicklung aufwiesen aber vital und gleich groß waren, kann der Stickstoffmangel die Wachstumshemmung der *antr5*-Mutanten

bei Anzucht auf Ammonium nicht verursachen. Vielmehr scheint Ammonium selbst eine toxische Wirkung auszuüben. Die toxischen Effekte von vielen Aminosäuren und von Ammonium auf *antr5*-Insertionsmutanten weisen auf eine Rolle von *AtANTR5* in der Ammonium-Entgiftung hin.

Zahlreiche plasmamembranständige Transportproteine katalysieren die Aufnahme von Nitrat oder Ammonium aus dem Boden in die Wurzel, wobei die Assimilierung und der Transport der beiden Ionen unterschiedlich sind. So werden Ammoniumionen direkt in den Wurzeln assimiliert und als Aminosäuren zu den Blättern transportiert, während Nitrationen über das Xylem zu den Blättern transportiert und dort assimiliert werden (GIVAN 1979; BLACK *et al.*, 2002). Obwohl *Arabidopsis thaliana* sowohl Nitrat als auch Ammonium nutzen kann, besteht ein grundlegender Unterschied zwischen Nitrat und Ammonium als Stickstoffquelle: Nitrat wird als Anion, Ammonium dagegen als Kation in die Wurzel aufgenommen (PEUKE & JESCHKE, 1993). Die Rhizosphäre der Pflanzen wird bei der Ammonium-Ernährung angesäuert, bei der Nitrat-Ernährung dagegen alkalisiert (FINDENEGG, 1987; MARSCHNER, 1995; TAYLOR & BLOOM, 1998).

Zwar kann bei Assimilation von Ammonium der hohe Energieverbrauch der Nitratreduktion vermieden werden, trotzdem weisen Pflanzen beim Wachstum auf Ammonium als einzige N-Quelle morphologische sowie physiologische Störungen und geringere Biomasse auf (DE GRAF *et al.*, 1998; CHAILLOU *et al.*, 1991). Ammonium (NH_4^+) steht im Gleichgewicht mit freiem Ammoniak (NH_3), welches als Entkoppler von Protonengradienten an Membranen wirkt, und bereits in geringen Konzentrationen zytotoxisch ist (KLEINER, 1981). Im Cytosol beträgt die Ammonium-Konzentration in der Regel ca. 15 μM , in der Vakuole hingegen können höhere Konzentrationen auftreten, da der geringe pH-Wert die NH_3 -Bildung verhindert (ROBERTS & PANG, 1992). Nitrat ist ein wichtiges osmotisch wirksames Anion, das als Ladungsträger zur Ionenhomöostase der Zelle und zur Zellexpansion beim sekundären Längenwachstum beiträgt (RAAB & TERRY, 1995; SALSAC *et al.*, 1987). Dem Stickstoffmetabolismus wird außerdem eine regulatorische Rolle in der Synthese des Phytohormons Cytokinin zugeschrieben, das die Zellteilung und die Zellexpansion fördert (RAYLE *et al.*, 1982; WANG & BELOW, 1996). Bereits kurz nach der Umstellung der Nähstoffzusammensetzung auf Ammonium als einzige N-Quelle findet eine Reduktion der Cytokininkonzentration um das Zehnfache statt (WALCH-LIU *et al.*, 2000). Bei Tabakpflanzen konnte dabei eine Reduktion der Spross- und Wurzelbiomasse beobachtet werden, die durch eine Abnahme der Zellzahl und der Zellgröße verursacht wird. (WALCH-LIU *et al.*, 2000). Außerdem enthalten Pflanzen bei ausschließlicher Ammonium-Versorgung weniger anorganische Kationen und organische Anionen. Sie akkumulieren Aminosäuren, der Kohlenhydratstoffwechsel wird zugunsten der Versorgung der Wurzel mit C-Skeletten umgestellt (CHAILLOU *et al.*, 1991). Die daraus resultierenden Ungleichgewichte verursachen

schwere physiologische und morphologische Störungen in der Osmo- und pH-Regulation und werden als „Ammonium-Syndrom“ definiert (CHAILLOU *et al.*, 1991; MEHRER & MOHR 1989).

Diese vielschichtigen Auswirkungen der ausschließlichen Ammonium-Ernährung äußern sich bei den Wildtyppflanzen durch retardiertes Wachstum, für *antr5*-Mutanten hingegen ist diese Nährstoffzusammensetzung sogar letal. Da das AtANTR5-Protein vermutlich im Golgi-Apparat lokalisiert ist, muss eine Rolle in der Ionen- oder pH-Regulation dieses Kompartiments in Betracht gezogen werden. Im Golgi-Komplex herrscht ein leicht saueres Milieu vor, das zwischen pH~6,5 bis pH~6,0 im *trans*-Golgi und pH~5,0 in sekretorischen Vesikeln variiert und den biochemischen Funktionen der Enzyme angepasst ist (MELLMAN *et al.*, 1986). Zur pH-Homöostase tragen vor allem V-ATPasen bei, die unter ATP-Verbrauch einen Protonengradienten über die Golgi-Membran aufbauen und das Lumen des Golgi-Apparates und der Vesikel ansäuern (ALI & AKAZAWA, 1986; CHANSON & TAIZ, 1985; DETTMAR, 2006; GLICKMAN *et al.*, 1983, GRABE & OSTER, 2001). Ammoniak kann als eine schwache Base den pH saurer Organellen neutralisieren, in dem NH₃ über die Membranen diffundiert und dort durch Protonierung zu NH₄⁺ konvertiert (KNEEN *et al.*, 1998; MELLMAN *et al.*, 1986). Durch diese pH-Veränderung werden Enzyme des Golgi-Apparates inhibiert, was weitreichende Auswirkungen auf die Funktionen von des Golgi-Apparates und der ganzen Zelle hat (AXELSSON *et al.*, 2001; GAWLITZEK *et al.*, 2000). So wurden bei Säugerzellen durch Ammonium und die pH-Verschiebung eine veränderte Glykosylierung der Proteine und sogar Apoptose beobachtet (ANDERSEN & GOOCHEE, 1995; MARTINELLE *et al.*, 1996; NAKAMURA & HAGEN, 2002). Ebenso wird bei Hefe durch Ammoniak programmierter Zelltod ausgelöst (VACHOVA & PALKOVA, 2005).

Zwar wurde bislang noch kein Transportprotein identifiziert, das Ammoniumionen aus dem Golgi exportiert und damit die pH- und Ionen-Homöostase reguliert, dennoch würde der Verlust eines putativen Ammonium-Exporters einen Anstau an Ammonium im Golgi zur Folge haben. Die daraus resultierenden Störungen der Funktionen des Golgi-Apparates könnten für die Zelle oder sogar die ganze Pflanze letal sein.

Des weiteren kann der Transport innerhalb der Pflanze oder die Exretion von Ammonium über Vesikel erfolgen, die zuvor mit Hilfe eines putativen Ammonium-Transporters beladen wurden. Obwohl für die Pflanzen noch kein solcher Transportmechanismus nachgewiesen worden ist, gibt es Hinweise, dass symbiotische Organismen wie Mycorrhiza einen solchen Mechanismus besitzen (CHALOT *et al.*, 2006). Dort wird neben dem Aminosäuretransfer ein Transport von Ammoniumionen via Vesikeln postuliert, der zur Versorgung der Pflanze mit Stickstoff dient.

Bei einer Ammonium-Entgiftung könnte AtANTR5 als putativer Ammonium-Exporter zur Ionen- und pH-Regulation des Golgi-Apparates, oder als putativer Ammonium-Importer bei

der Exkretion von Ammonium via Vesikel fungieren. Unter diesen Bedingungen würde die AtANTR5-Expression in Geweben mit starker Golgi-Aktivität und Vesikelfluss erhöht sein, was sich möglicherweise in starken Expressionssignalen bei der Pollenentwicklung (Kap. 3.6), Nematodeninfektion (HAMMES *et al.*, 2005) oder *Pseudomonas*-Inokulation (Kap. 3.11.8.1) widerspiegelt. Jedoch steht Ammonium als ein Kation im Widerspruch zur Eingruppierung von AtANTR5 zur Anion-Cation-Symporter-Familie (ROTH *et al.*, 2004). Ebenfalls hatte eine exogene Ammonium-Applikation keinen Einfluss auf die Regulation von AtANTR5 (Kap. 3.10.3.5). Da auch nach heterologer Expression von AtANTR5 in Hefe und Rekonstitution im Liposomensystem keine Transportaktivität für Methyl-Ammonium nachgewiesen werden konnte, ist eine AtANTR5-Funktion als Ammoniumtransporter fraglich (Kap. 3.3).

4.6 Rolle von AtANTR5 bei Salinität

Salinität führt zu unterschiedlichen Stressarten bei betroffenen Pflanzen. Außer toxischen Konzentrationen an Natriumionen, die verschiedene Enzyme inhibieren können, spielen osmotischer Stress und veränderte Nährstoffaufnahme, insbesondere der Kationen wie Kalium oder Kalzium, eine Rolle (VERSLUES *et al.*, 2006). Hohe Salzkonzentrationen verursachen eine Störung der Ionen- und Wasserhomöostase, sowie eine Hemmung der gesamten Entwicklung der Pflanzen (LIN *et al.*, 2006; KATSUHARA, 1997). Bei den *antr5*-Mutanten konnte eine hohe Sensitivität gegenüber Salzstress festgestellt werden (Kap. 3.12). Während die Wildtyppflanzen bei 100 mM NaCl nur geringfügige Wachstumshemmung aufwiesen, waren bei *antr5*-Pflanzen die Wurzeln stark verkürzt und die Wurzelspitzen angeschwollen. In der Teilungszone konnte eine drastische Reduktion des meristematischen Gewebes festgestellt werden, die Zellen der Streckungszone waren bauchig aufgebläht, womit der Verdickung der Wurzelspitzen nicht die Zellteilung sondern die radiale Zellexpansion zugrunde liegt.

Mehrere Studien belegen, dass osmotischer Stress eine Auswirkung auf den Zellzyklus haben kann und mit einer Reduktion der Zellteilung assoziiert ist (SACKS *et al.*, 1997; SAMARAJEEWA *et al.*, 1999; WEST *et al.*, 2004). Durch Hemmung der mitotischen Aktivität und durch das Arretieren des Zellzyklus bleiben nur wenige teilungsfähige Zellen im meristematischen Gewebe erhalten. Die daraus resultierende Reduktion der Zellproduktion und der Größe des Meristems stellen eine adaptive Antwort auf solche Stressbedingungen dar (WEST *et al.*, 2004).

Eine ähnliche Sensitivität gegenüber hohen Salzkonzentrationen zeigen auch *stt3a-1*-Mutanten (*staurosporin* und *temperature sensitive*), denen eine Untereinheit der Oligosaccharyl-Transferase fehlt und die ebenfalls geschwollene Wurzelspitzen und reduzierte mitotische Aktivität aufweisen (KOIWA *et al.*, 2003). Der Gesamtkomplex der

Oligosaccharyl-Transferase ist an der N-Glykosylierung der Proteine im ER und Golgi beteiligt und verursacht bei den *stt3a-1*-Mutanten vermutlich eine fehlerhafte Proteinprozessierung. Organellen des sekretorischen Komplexes sind in die Adaptation während des osmotischen Stresses involviert, so dass Störungen in Proteintranslation, Reifung und vesikulärem Transport die Salztoleranz beeinträchtigen können (GONG *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2002). Möglicherweise tritt auch bei *antr5*-Mutanten die Salzsensitivität in Verbindung mit einer Störung der sekretorischen Aktivität während der Antwort auf den osmotischen Stress auf.

Mittels der Trypanblau-Färbung wurden bei *antr5*-Insertionsmutanten abgestorbene Zellen in den Wurzeln und Blättern festgestellt (Kap. 3.12.1). Programmierter Zelltod ist ebenfalls ein adaptiver Prozess, der bei hohen Salzkonzentrationen nicht nur bei Pflanzen, sondern auch bei Hefe nachgewiesen wurde (BORSANI *et al.*, 2001; HUH *et al.*, 2002; KATSUHARA & KAWASKI, 1996; KATSUHARA & SHIBASAKA, 2000). Bei *antr5*-Mutanten tritt dieser Effekt bereits bei niedrigen Konzentration auf, die beim Wildtyp nur eine geringe Wachstumshemmung verursachen, jedoch noch kein Zelltod initiieren. Bei Pflanzen beruht der Mechanismus der Zelltodinduktion durch osmotischen Stress im Wesentlichen auf der photosynthetischen Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies, dabei wird in der Mehler-Reaktion atmosphärischer Sauerstoff unter Bildung des Superoxidradikals reduziert (ALLEN, 1995; FOYER *et al.*, 1994; PRICE & HENDRY, 1991). BORSANI *et al.* (2001) konnten einen Zusammenhang zwischen ROS und Salizylsäure bei dem durch Salz induzierten Zelltod nachweisen, dabei interagieren SA und ROS und modulieren die Antwort auf Salinität. Salizylsäure potenziert die PCD-induzierende Wirkung der reaktiven Sauerstoffspezies und verursacht noch stärkere Läsionen und Wachstumshemmungen.

Cvi-0-Arabidopsis-Pflanzen, die hohe SA-Mengen beinhalten, sind schon bei geringen Salzkonzentrationen im Vergleich zu Wildtyp in ihrer Entwicklung inhibiert. *nahG*-Pflanzen, die durch Salizylhydroxylase-Aktivität keine Salizylsäure akkumulieren können, zeigen dagegen auch bei hohen Salzkonzentrationen nur eine geringfügige Hemmung des Wachstums verglichen mit Wildtyppflanzen (BORSANI *et al.*, 2001). Da *antr5*-Insertionsmutanten höhere SA-Gehalte als Wildtypen akkumulieren, könnte auch dort ein ähnlicher Mechanismus zur Wachstumshemmung beitragen. Vermutlich verursacht bei *antr5*-Mutanten eine Störung des sekretorischen Komplexes die Reduktion des Meristems und den Zelltod. Darüber hinaus vervielfacht die Salizylsäure die Wirkung von durch Zelltod und Mehler-Reaktion entstandener ROS und führt damit zu noch größeren Schäden des Gewebes.

4.7 Rolle von *AtANTR5* in der Pathogenabwehr und beim programmierten Zelltod

HAMMES *et al.* (2005) konnten mit Hilfe von Mikroarray-Analysen zeigen, dass durch den Kontakt zum Nematoden *Meloidogyne incognita* eine Induktion der *AtANTR5*-Expression stattfindet. Eine Infektion mit Nematoden zeichnet sich durch die Entwicklung knotenartiger Gebilde an den Wurzeln aus, die Riesenzellen mit stark verändertem Stoffwechsel enthalten (HUSSEY, 1989). Diese Riesenzellen dienen zur Fütterung der parasitären Nematoden mit verschiedenen Nährstoffen und enthalten hohe Mengen an Proteinen, Aminosäuren und Zucker (BIRD & LOVEYS, 1975; GOMMERS & DROPKIN, 1976). Entsprechend findet in diesen Zellen eine verstärkte Expression zahlreicher Transportproteine wie dem Saccharosetransporter *AtSUC1*, oder den Aminosäuretransportern *AtAAP6* und *AtAAP7* statt, die vermutlich die Substrate für Nematodenfütterung bereitstellen (HAMMES *et al.*, 2005). Die verstärkte Expression von *AtANTR5* kann in diesem Zusammenhang durch die hohe Golgi-Aktivität und den Vesikelfluss hervorgerufen sein. Ebenfalls könnte das *AtANTR5*-Protein in die Abwehrantwort bei Nematodenbefall involviert sein. Auch bei einer Abwehr von Nematoden konnte eine Beteiligung der reaktiven Sauerstoffspezies und Salizylsäure festgestellt werden, die als wichtige Signalmoleküle zur Entwicklung der Resistenz bei Pflanzen beitragen (BRANCH *et al.*, 2004; WAETZIK *et al.*, 1999).

Computergestützte Analysen von Expressionsdatenbanken lieferten Hinweise auf eine verstärkte *AtANTR5*-Expression nach Inokulation mit *Pseudomonas syringae* in den Blätter (<https://www.genevestigator.ethz.ch>). Der Einfluss von *P. syringae* auf die *AtANTR5*-Expression konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Sowohl der virulente Stamm *P. syringae* DC3000 als auch der avirulente Stamm *P. syringae* DC3000AvrRpt2 rufen 24 Stunden nach der Inokulation eine Akkumulation des *AtANTR5*-Transkripts hervor (Kap. 3.11.8.1), was einen Hinweis auf eine Beteiligung des Proteins in der Pathogenantwort darstellt.

Um die Rolle des *AtANTR5*-Proteins in der Pathogenabwehr zu untersuchen, wurde die Akkumulation abwehrrelevanter Substanzen bei *antr5*-Mutanten analysiert. So wurde die Synthese phenolischer Verbindungen in nichtinfizierten *antr5*-Mutanten festgestellt, die anhand ihrer Autofluoreszenz detektiert werden konnte (Kap. 3.11.1). Bei diesen Verbindungen handelt es sich meist um Lignine oder Suberine, die zur Zellwandverstärkung dienen, sowie antimikrobielle Phytoalexine. Diese phenolischen Verbindungen werden insbesondere bei Zellen, die im Zuge der hypersensitiven Reaktion absterben, detektiert (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000; KOGA *et al.*, 1980). Callose ist ebenfalls eine zellwandverstärkende Substanz und wurde in den Blättern von nichtinfizierten *antr5*-Pflanzen mittels histochemischer Färbung nachgewiesen (Kap. 3.11.5). Mit Hilfe von DAB-Färbung konnte die Produktion von H₂O₂, einem weiteren Molekül der Pathogenabwehr, bei *antr5*-

Mutanten detektiert werden (Kap. 3.3.11.3). ROS spielen eine zentrale Rolle in der Induktion der hypersensitiven Reaktion im infizierten Gewebe, deren Akkumulation zum Absterben der Zellen am Infektionsort durch programmierten Zelltod (LAM *et al.*, 2001; LEVINE *et al.*, 1994; WOJTASZEK, 1997). Ferner wurden bei *antr5*-Pflanzen erhöhte SA-Gehalte festgestellt, die bei freier SA das Doppelte und bei konjugierten SA das 8-fache des Gehalts von Kontrollpflanzen ausmachten (Kap. 3.11.4). Salizylsäure fungiert als zentrales Signalmolekül der pflanzlichen Verteidigung gegen Krankheitserreger, und kann viele Reaktionen innerhalb der Pflanze auslösen und damit Resistenz gegenüber Pathogenen vermitteln (MURPHY *et al.*, 1999; GAFFNEY *et al.*, 1993; SHAH, 2003). Durch Trypanblau-Färbungen konnten bei *antr5*-Mutanten zahlreiche lokal begrenzte, abgestorbene Gewebebereiche, die mehrere benachbarte Zellen umfassen, nachgewiesen werden (Kap. 3.11.2). Solche Läsionen sind in ihrer Form dem hypersensitiven Zelltod ähnlich, diese treten jedoch spontan und in Abwesenheit von Pathogenen auf. Weiterhin wurde bei *antr5*-Pflanzen die Expression von Abwehrgenen untersucht (Kap. 3.11.6). Die Abwehrgene *PR1*, *PR2* und *GST6* waren bei *antr5*-Mutanten konstitutiv exprimiert, bei Wildtyppflanzen war hingegen keine bzw. nur eine schwache mRNA-Akkumulation detektierbar. Die Expression von *PAL* war im Vergleich zum Wildtyp bei *antr5*-Pflanzen ebenfalls hoch reguliert. Phenylalanin-Ammonium-Lyase ist ein Schlüsselenzym des Phenylpropanoid-Stoffwechsels, das zur Synthese zahlreicher abwehrrelevanter Sekundärmetabolite, wie Salizylsäure, führt (HAHLBROCK & SCHEEL, 1989; KAUSS, 1992). Die erhöhte Expression von *PAL* korreliert mit der Akkumulation von Salizylsäure in den *antr5*-Pflanzen. Die Expression von *PDF1.2* war dagegen bei den Mutanten deutlich herunter reguliert. *PDF1.2* wird als Antwort auf Jasmonsäure induziert und ist unabhängig von Salizylsäure. Die Aktivierung der SA-abhängigen Signalkaskade ist oft mit einer Repression der JA- und Ethylen-abhängigen Kaskade und mit der negativen Regulation von *PDF1.2* assoziiert (PENNINGKX *et al.*, 1996; GUPTA *et al.*, 2003).

Das Auftreten spontaner Läsionen, die Akkumulation von H₂O₂, SA, Callose, *PR1*-, *PR2*-, *GST6* sowie *PAL*-Transkripte, die Repression von *PDF1.2*, sind Merkmale der systemischen Resistenz und weisen auf eine aktivierte SA-abhängige Abwehrreaktion bei der *antr5*-Mutante hin. Mittels einer Inokulation der Pflanzen mit *Pseudomonas syringae* wurde die Resistenz von *antr5*-Insertionsmutanten untersucht (Kap. 3.11.8). Die Analyse der Blattschäden nach einer Infektion deutet auf eine höhere Resistenz der *antr5*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyppflanzen gegenüber virulenten als auch den avirulenten *Pseudomonas*-Stämmen hin (Kap. 3.8.2). Bei *antr5*-Mutanten konnten während der gewählten Inkubationsdauer weder Krankheitssymptome durch *P. syringae* DC3000, noch hypersensitiver Zelltod durch *P. syringae* DC3000AvrRpt2 hervorgerufen werden. Die Bestimmung der Bakterienmenge in den Blättern nach Infektion mit dem virulenten Erreger *P. syringae* DC3000 bestätigte die erhöhte Resistenz der *antr5*-Mutanten, im Vergleich zu

Wildtyppflanzen, da dort die ermittelten Bakterienmengen nach der 3-tägigen Inkubation um Faktor 10 niedriger war. Bei der Bestimmung der Bakterienmenge des avirulenten Stammes *P. syringae* DC3000AvrRpt2 in den Pflanzen konnte kein Unterschied zwischen *antr5*- und Wildtyppflanzen festgestellt werden. Die erhöhte Resistenz der *antr5*-Mutanten gegen den virulenten Stamm *P. syringae* DC3000 wird vermutlich durch die konstitutiv aktivierte Abwehr verursacht.

4.7.1 Einfluss der hohen Luftfeuchtigkeit auf die *antr5*-Mutante

Die Infektion mit einem Krankheitserreger scheint keine weitere Induktion oder Verstärkung der Abwehr bei *antr5*-Pflanzen hervorzurufen, da keine hypersensitive Reaktion, die einen wichtigen Abwehrmechanismus darstellt, beobachtet werden konnte (Kap. 3.11.8.2, Abb. 3.33). Auch fand keine verstärkte Expression von abwehrrelevanten Genen wie *PR1* und *PR2* statt, sondern im Gegenteil eine kontinuierliche Verringerung der Transkriptgehalte, die durch hohe Luftfeuchtigkeit im Inkubationsraum verursacht wurde (Kap. 3.11.8.4 Abb. 3.37; 3.36).

Hohe Luftfeuchtigkeit kann nicht nur die Phytopathogene, sondern auch die Pflanze selbst, die Aktivierung der Abwehrmechanismen und die Resistenz beeinflussen. Dieses Phänomen konnte insbesondere an verschiedenen „lesion mimic“-Mutanten wie *cpr22*, *cpn1*, *lsd6* oder *ssi4* gezeigt werden (JAMBUNATHAN *et al.*, 2001; WEHMANN *et al.*, 1995; YOSHIOKA *et al.*, 2001). Bei der Mutante *cpr22* konnte eine Mutation im *AtCNGC11/12* „cyclic nucleotid-gated ion channel“ festgestellt werden, bei der Mutante *cpn1* ist ein membranassoziertes, Ca_2^+ -abhängiges Copin-Protein nicht mehr funktionsfähig. Das betroffene Gen der *lsd6* Mutante wurde bisher nicht identifiziert. Die Anzucht dieser Mutanten unter hoher Luftfeuchtigkeit verursacht eine partielle oder vollständige Unterdrückung der konstitutiven Aktivierung der Abwehrmechanismen und führt zum Verlust der erhöhten Resistenz gegenüber Pathogenen und zum Aufheben des Zwergphänotyps. Auch die transgenen *A. thaliana*-Pflanzen, die die R-Proteine RPW8.1, RPW8.2 oder TIR-NBS-LRR exprimieren, zeigen einen Zusammenhang zwischen Resistenz und den Anzuchtbedingungen. Bei Wachstum auf Erde zeigen die genannten Mutanten ein retardiertes Wachstum und entwickeln die typischen HR-Merkmale, wie Expression von PR-Proteinen, SA-Akkumulation und spontane Läsionen. Bei Anzucht auf MS-Nährmedium oder bei hoher Luftfeuchtigkeit wird dieser Phänotyp aufgehoben und entsteht wieder beim Transfer von der Sterilkultur auf Erde (JAMBUNATHAN *et al.*, 2001; WEHMANN *et al.*, 1995; XIAO *et al.*, 2001; XIAO *et al.*, 2003; YOSHIOKA *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2004). Auch bei *antr5*-Mutanten konnte dieser Zusammenhang beobachtet werden: Während des Wachstums in Sterilkultur besitzen sie den gleichen Habitus wie Wildtyppflanzen (Kap. 3.7.2, Abb. 3.13), exprimieren keine PR-Proteine (Kap. 3.11.7, Abb. 3.31) und entwickeln keine Läsionen (Daten nicht gezeigt).

Ebenfalls ruft der Transfer von *antr5*-Pflanzen von Sterilkultur auf Erde die HR-Merkmale und retardiertes Wachstum hervor (Daten nicht gezeigt).

Zwar wurde bereits mehrmals gezeigt, dass hohe Luftfeuchtigkeit die Entwicklung und die Etablierung der Pathogenabwehr bei Pflanzen unterdrücken bzw. verzögern kann, die genauen Mechanismen dieser Reaktion bleiben dennoch ungeklärt (HAMMOND-KOSACK *et al.*, 1996; MAY *et al.*, 1996). Bei *Lycopersicon esculentum* verhindert eine Luftfeuchtigkeit von 98% die hypersensitive Reaktion, die Akkumulation von Salizylsäure, ROS, Abwehrproteine, Oxilipine und Oxidation von Glutathion (HAMMOND-KOSACK *et al.*, 1996; MAY *et al.*, 1996). Da hohe Luftfeuchtigkeit die SA- und ROS Akkumulation unterdrückt und dadurch die Induktion der PR-Expression und der HR verhindert, wird diese Reaktion als eine Ursache für das Aufheben des zwergenhaften Habitus der RPW8.1-, RPW8.2- und *cpr22*-Mutanten diskutiert, und kann auch bei *antr5*-Pflanzen eine Rolle spielen (XIAO *et al.*, 2003; YOSHIOKA *et al.*, 2001). Bei der *cpn1*-Mutante wird eine Störung in der Ionenhomöostase vermutet (JAMBUNATHAN *et al.*, 2001; JAMBUNATHAN & MCNELLIS, 2003). Indem bei niedriger Luftfeuchte eine verstärkte Wasseraufnahme in der Wurzel und eine erhöhte Transpiration in den Blättern stattfindet, kommt es zu einer erhöhten Akkumulation von Ionen in der Zelle, die eine spezielle Regulierung der Ionenhomöostase erfordert (MOHR & SCHOPFER, 1995). Möglicherweise liegen bei *antr5*-Pflanzen Defekte in der Regelung des Ionenhaushaltes vor, die im Golgi-Apparat, dem vermutlichen Zielorganell von AtANTR5, ihren Ursprung nehmen. Wachstumshemmungen bzw. das Absterben der *antr5*-Keimlinge durch Zugabe von Ammonium oder Natriumchlorid (Kap. 3.10.3; Kap. 3.12) können eventuell durch die Störung Ionenhomöostase verursacht werden.

Ein weiteres Problem der niedrigen Luftfeuchtigkeit stellt möglicherweise die Akkumulation von ROS dar. Durch geschlossene Stomata und damit CO₂-Mangel erfolgt eine Inhibierung des Calvin-Cyclus. Der durch die Lichtreaktion erzeugte Überfluss an Elektronen wird in die Mehler-Reaktion umgeleitet und führt zur Entstehung von Superoxidanionen bzw. H₂O₂. Durch die Störung des Golgi-Apparats könnte womöglich die Zellwandbiosynthese, eine Hauptfunktion des Kompartiments, affiziert sein, so dass die Quervernetzung, an der die reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sind, zur Verstärkung der strukturellen Unregelmäßigkeiten führt. Die hohe Luftfeuchtigkeit vermindert die H₂O₂-Akkumulation wodurch die Störungen der Zellwandstruktur möglicherweise gemildert werden. Des Weiteren können ROS mit Salizylsäure in ihrer Wirkung interagieren und so die Abwehr der *antr5*-Pflanzen aktivieren und zum hypersensitiven Zelltod führen.

4.7.2 Programmierter Zelltod

Bei „mimic disease“-Mutanten kann der programmierte Zelltod SA-abhängig, aber auch SA-unabhängig entstehen (HUNT *et al.*, 1997; MACH *et al.*, 2001; WEYMANN *et al.*, 1995). Um

die Abhängigkeit der Entstehung der Läsionen und der Expression von Abwehrgenen durch den endogenen Salizylsäurestimulus in den *antr5*-Mutanten zu überprüfen, wurde das *nahG*-Gen in den Insertionsmutanten exprimiert (Kap. 3.11.9). Durch die Aktivität der bakteriellen Salizylhydroxylase konnte die Akkumulation der Salizylsäure verhindert werden, so dass bei *antr5+nahG*-Pflanzen nur geringe SA-Mengen detektiert werden konnten (Kap. 3.11.9.2). Die *antr5+nahG*-Pflanzen akkumulieren keine *PR1*- und *PR2*-Transkripte, was auf einen direkten Einfluss von Salizylsäure auf die Expression dieser Abwehrgene hinweist (Kap. 3.11.9.3). Der Zelltod scheint von der SA unabhängig zu sein, da es trotz niedriger SA-Gehalte zur Entwicklung von Läsionen in *antr5-nahG*-Pflanzen in Pathogenabwesenheit kommt. Ebenso scheint Salizylsäure das Wachstum der Mutanten nicht zu beeinflussen, so dass auch bei geringen SA-Mengen die Pflanzen einen kleinwüchsigen Habitus aufweisen (Kap. 3.11.9.5), womit die erhöhten Salizylsäuregehalte vermutlich sekundäre Effekte sind. Bei manchen „mimic disease“-Mutanten, wie *acd6*, *acd11* oder *Isd6*, kann die *nahG*-Expression das retardierte Wachstum aufheben und Bildung von Läsionen vollständig verhindern (BRODERSEN *et al.*, 2002; RATE *et al.*, 1999, WEYMANN *et al.*, 1995), während bei *mpk4*-, *cad1*-Mutanten nur eine partielle Unterdrückung der Symptome erreicht werden kann (MORITA-YAMAMURO *et al.*, 2005; PETERSON *et al.*, 2000). Bei *Isd2*, *Isd4* oder *acd2* ist der Phänotyp und die Läsionbildung wie bei der *antr5*-Mutante nicht SA-abhängig und kann durch *nahG*-Expression nicht aufgehoben werden (HUNT *et al.*, 1997; MACH *et al.*, 2001).

Diese Befunde deuten daraufhin, dass der Zelltod vor der Salizylsäure-Akkumulation in der Signaltransduktion der Abwehrantwort stattfindet oder sie sogar auslöst. Bei SAR werden beim Befall eines Blattes durch einen Krankheitserreger auch andere Teile der Pflanze gegenüber den Erregern resistent (ROSS, 1961; RYALS *et al.*, 1996). Läsionen, die durch die Krankheitserreger selbst oder durch HR entstanden sind, können SAR in distalen Geweben einer Pflanze induzieren. Die Zellen senden beim Absterben Botenstoffe aus, die in entfernten Teilen der Pflanze perzipiert werden und die SAR auslösen können (HUNT & RYALS, 1996). Auf diese Weise könnten absterbende Zellen bei *antr5*-Pflanzen die Pathogenantwort induzieren und sekundär eine erhöhte Resistenz gegenüber den Krankheitserregern vermitteln.

Der PCD ist ein komplexer Prozess, der viele aktivierende und hemmende Signale beinhaltet, und deren Wechselwirkung den Zellzyklus beeinflusst (DANON *et al.*, 2000). Während die molekularen Abläufe der Apoptose in Tieren besonders gut untersucht sind, ist bei Pflanzen über den programmierten Zelltod deutlich weniger bekannt. Dennoch scheinen viele Mechanismen konserviert zu sein, so dass die heterologe Expression einiger Proteine die Apoptose in einem Fremdorganismus verhindern kann (MATSUMURA *et al.*, 2003; MITSUHARA *et al.*, 1999). Zahlreiche exogene, endogene und physiologische Stimuli können

bei Tieren Apoptose aktivieren, so sind unter anderem der Differenzierungszustand einer Zelle, der Zellzyklus und die Genaktivierung wichtige Kontrollpunkte der Apoptose. Die Initiation der meisten Apoptosewege verläuft über den Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Die Aktivität von Caspasen wird während der Signaltransduktion reguliert und ist ebenfalls ein weitverbreiteter Degradationsmechanismus im Zelltod (HENSEL *et al.*, 1993; MARTIN & GREEN, 1995; MINAMI & FUKUDA, 1995). In diesem Prozess wirken viele Inhibitoren der Apoptose wie z. B. Wachstumshormone, Cytokine, Onkoproteine der Bcl-2-Familie und Aktivatoren wie H₂O₂, *ces*-Transkriptionsfaktoren (*cell death specification*) oder CD95-Rezeptoren (DUKE & COHEN, 1986; FARROW & BROWN, 1996; PENNEL & LAMB, 1997). Das Zusammenwirken der positiven und negativen Regulatoren entscheidet über den Ablauf der molekularen Kaskade und die irreversible Initiierung der Apoptose.

Bei vielen „mimic disease“-Mutanten wird eine fehlende Funktion in der Kontrolle des programmierten Zelltods vermutet. Bei CAD1, einem MACPF-Protein (*membran attack complex and perforin*) oder MPK4, einer Map-Kinase-4 wird eine negativ-regulatorische Wirkung beim Zelltod postuliert, so dass ihre Inaktivierung bei den entsprechenden Mutanten zur Entstehung von Läsionen und zum Aktivieren der Abwehrmechanismen führt (MORITA-YAMAMURO *et al.*, 2005; PETERSON *et al.*, 2000).

Außerdem können zahlreiche biochemische Störungen, die ursprünglich nicht in einem Zusammenhang mit Zelltod stehen, Apoptose auslösen. Bei Transgenen Pflanzen, die Invertase oder Hexokinase überexprimieren, ist der Hexosestoffwechsel und das metabolische Gleichgewicht der Zelle so verändert, dass es dort zum Zelltod und zur Aktivierung der Abwehrreaktionen kommt (MITTLER & RIZHSKY, 2000; HERBERS *et al.*, 1996). Die *acd11*-Mutante zeigt, wie *antr5*-Pflanzen, konstitutiv aktivierte Pathogenabwehr und HR-ähnlichen Zelltod. Das betroffene Gen, *ACD11*, kodiert für ein Sphingosin-Transfer-Protein, dem eine mögliche Rolle als negativer Regulationsfaktor des PCD zugeschrieben wird. Auch wird ein metabolisches Ungleichgewicht in der PCD-Entstehung bei *acd11*-Pflanzen als möglicher Auslöser diskutiert (BRODERSEN *et al.*, 2002). Bei *acd2*-Mutanten wird der Zelltod vermutlich durch Akkumulation der Chlorophyll-Abbauprodukte ausgelöst, da es sich bei ACD2 um eine Reduktase der Chlorophyll-Katabolite handelt. Zwar ist ACD2 nicht direkt in die Signaltransduktion von PCD involviert, dennoch verursacht seine Abwesenheit den Zelltod und aktiviert die Pathogenabwehr bei den Mutanten (MACH *et al.*, 2001). Auch bei der *antr5*-Mutante könnte eine Stoffwechselstörung den Zelltod und die damit verbundene sekundäre Effekte verursachen.

Die Bedeutung des sekretorischen Komplexes in PCD und der Pathogenantwort ist nur wenig erforscht, jedoch gibt es viele Hinweise auf eine Einbindung der sekretorischen Organellen in die Abwehr. Beispielsweise wird die Expression vieler Proteine des Endoplasmatischen Retikulum, wie Calreticulin, BiP (*binding protein*), *HvGRP94* oder

Protein-Disulfid-Isomerase durch SA und Pathogenbefall induziert (DENECKE *et al.*, 1995; WALTHER-LARSEN *et al.*, 1993). Auch die Expression des AtSNAP33-Proteins (soluble NSF-attachment protein), das in die Fusion von Vesikeln involviert ist, reflektiert die sekretorische Aktivität während der Pathogenabwehr (WICK *et al.*, 2003), ähnlich wie die AtANTR5-Expression nach einer Infektion mit *Pseudomonas syringae* (Kap. 3.11.8.1). Eine Abwehrreaktion der infizierten Pflanzen erfordert die Produktion von PR-Proteinen, die im ER synthetisiert und in den Apoplasten oder in die Vakuole mittels Vesikeln transportiert werden. Auch während der Verstärkung und der Reparatur der Zellwände wird eine erhöhte Leistung der sekretorischer Organellen benötigt (JELITTO-VAN DOOREN *et al.*, 1999; KALINSKI *et al.*, 1995; LEYMAN *et al.*, 2000). Störungen im sekretorischen Transportweg können einen ähnlichen Phänotyp wie bei den „mimic disease“-Mutanten hervorrufen. Bei *snp33*, einer AtSNAP33-„knock out“-Mutante, konnte eine spontane Bildung von Läsionen, Autofluoreszenz und Akkumulation von Callose, PR1-mRNA sowie von reaktiven Sauerstoffspezies nachgewiesen werden (HEESE *et al.*, 2001). Möglicherweise rufen Störungen des Vesikelflusses und der Fusion fatale Veränderungen im Stoffwechsel hervor und verursachen somit das Absterben der Zellen, was in den umliegenden Geweben zur einer SAR-ähnlichen Antwort führt. Des Weiteren wird auch für AtSNAP33 eine regulierende Funktion in PCD postuliert (HEESE *et al.*, 2001; WICK *et al.*, 2003). Da bei *antr5*-Pflanzen womöglich eine Mutation im Golgi-Protein AtANTR5 vorliegt, könnte der Zelltod ebenfalls durch Veränderungen der sekretorischen Funktion oder durch fehlende Regulierung in der PCD-Signalkaskade auslöst werden.

Eine weitere Ursachen der Läsionenentstehung bei *antr5*-Mutanten könnten die Unregelmäßigkeiten in der Zellwandbiosynthese sein, die durch eine Störung im Golgi-Apparat hervorgerufen werden. Zellwandbestandteile die nicht richtig gebunden sind könnten als endogene Elicitoren wirken und dadurch die erhöhte Abwehr verursachen.

Das AtANTR5-Protein ist vermutlich im Golgi-Apparat lokalisiert und könnte für die Funktion des sekretorischen Komplexes von enormer Bedeutung sein. Sein Verlust verursacht bei *antr5*-Insertionsmutanten Empfindlichkeit gegenüber hohen Konzentrationen an Natriumchlorid, Aminosäuren sowie der ausschließlichen Ammonium-Versorgung und führt zur konstitutiven Aktivierung der Pathogenabwehr. Induktion der AtANTR5-Expression findet während einer Infektion mit Phytopathogenen oder in Pollenentwicklung statt. Möglicherweise sind einige Effekte pleiotropher Natur und werden durch eine generelle Funktionsstörung hervorgerufen und unter verschiedenen Bedingungen verstärkt oder aufgehoben. Da in den genannten Prozessen oft eine erhöhte sekretorische Aktivität vorliegt, oder ein Zusammenhang mit der Ionen-Disbalance sowie dem Zelltod besteht, kann für AtANTR5 eine Funktion in der Ionenhomöostase des Golgi-Apparates, Zellwandbiosynthese und/oder in der Regulation der Apoptose angenommen werden.

5 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine wichtige Rolle von *AtANTR5* im sekretorischen Komplex bei *Arabidopsis*-Pflanzen hin. Eine weitere Bestätigung der Lokalisierung von *AtANTR5* im Golgi sollten elektronenmikroskopische Studien mit Hilfe von c-Myc-spezifischen Antikörpern in Verbindung mit Immuno-Gold-Labeling an den *AtANTR5-cMyc*-Pflanzen liefern.

Um die Einbindung von *AtANTR5* in der sekretorischen Proteinprozessierung und im Transport detaillierter zu analysieren könnten Untersuchungen der Protein-Glykosylierungsmuster bei *antr5*-Pflanzen durchgeführt werden. Der Golgi-Apparat ist bei Pflanzen auch an der Zellwandsynthese beteiligt, so dass Analysen der Zellwandzusammensetzung bei *antr5*-Mutanten neue Aufschlüsse über eine Aktivität des *AtANTR5*-Proteins im sekretorischen Weg liefern könnten.

Mit Hilfe von Metabolomanalysen der *antr5*-Pflanzen könnten weitere Stoffwechselstörungen aufgedeckt und dadurch neue Hinweise auf potentielle Transportsubstrate gewonnen werden, die anschließend durch Aufnahmestudien in heterologen Expressionssystemen getestet werden könnten.

Es konnte gezeigt werden, dass *antr5*-Mutanten Veränderungen im Stickstoffstoffwechsel aufweisen, die sich in einer Sensitivität gegenüber Ammonium und Aminosäuren äußern. Bestimmungen von Nitrit-, Nitrat- und Ammoniumgehalte unter verschiedenen Bedingungen wie Seneszenz, Photorespiration oder variierenden Stickstoffquellen könnten weitere Anhaltspunkte im Zusammenhang mit dem Stickstoffmetabolismus liefern.

Zahlreiche Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit Hilfe von *antr5*-Insertionsmutanten, bei denen eine Inaktivierung des *AtANTR5*-Gens starke phänotypische Veränderungen verursacht. *AtANTR5-Antisense*-Pflanzen stellen Dosismutanten dar, die durch eine Abmilderung des Phänotyps gekennzeichnet sind und möglicherweise weniger Nebeneffekte aufweisen. Analysen an diesen Pflanzen könnten zu einem differenzierteren Gesamtbild beitragen und sekundäre Effekte ausschließen. Diese *AtANTR5-Antisense*-Pflanzen sowie *antr5*-Mutanten sollten für Mikro-Array-Analysen herangezogen werden, um mögliche Veränderungen im Stoffwechsel und in den regulatorischen Elementen aufzudecken.

Untersuchungen an *OsANTR5.1*-Überexpressionslinien könnten ebenfalls zur Aufklärung der *AtANTR5*-Funktion beitragen. So könnten Informationen über die Rolle von *AtANTR5* beim programmierten Zelltod erhalten werden, wie z. B. Regulation oder Unterdrückung der HR. Weiterhin könnten diese Pflanzen für Pathogenversuche verwendet werden, um weitere Hinweise auf die Einbindung des Proteins in die Pathogenantwort zu gewinnen.

Da die *antr5*-Insertionsmutanten eine erhöhte Resistenz gegen *P. syringae* aufwiesen, wäre es interessant herauszufinden, inwieweit diese Resistenz auch gegenüber anderen Phytopathogenen besteht. Dabei könnten verschiedene geeignete Vertreter der viralen oder pilzlichen Krankheitserreger getestet werden.

Um den Befund, dass es sich der SA-Akkumulation in den *antr5*-Pflanzen um einen sekundären Effekt handelt unabhängig zu überprüfen, wäre eine Kreuzung dieser Pflanzen mit der *sid2*-Mutante hilfreich. Da in dieser Mutante durch das Fehlen der Isochorismat-Synthase keine Salizylsäure gebildet werden kann und daher keine Nebeneffekte des durch *nahG* gebildeten Catechols auftreten, könnte mit dieser Kreuzung der Einfluss von SA besser untersucht werden. Da Salizylsäure auch bei einer Stressantwort bei hohen Salzkonzentrationen eine Rolle spielt, wäre es von besonderem Interesse die Phänotypen von *antr5+nahG*-Pflanzen und *antr5xsid2*-Kreuzung neben *antr5*-Mutanten bei den Salzstressversuchen zu analysieren.

Mit Hilfe von Sequenzanalysen konnte in Reis eine verwandte Proteingruppe identifiziert werden, wobei dort zwei Proteine OsANTR5.1 und OsANTR5.2 eine hohe Ähnlichkeit zu AtANTR5 aufweisen. Da eine funktionelle Verwandtschaft zwischen den Proteinen OsANTR5.1 und AtANTR5 bereits gezeigt werden konnte, soll dies in weiteren Arbeiten auch für OsANTR5.2 nachgewiesen werden. Mittels Expressionsanalysen sollte auch die Einbindung der Proteine OsANTR5.1 und OsANTR5.2 in den Stoffwechsel der Reis-Pflanze untersucht werden, um die Frage zu klären, warum Reis im Gegensatz zu *Arabidopsis* zwei Isoformen besitzt.

Da die *antr5*-Linie eine „mimic disease“-Mutante darstellt und eine konstitutiv aktivierte Abwehr aufweist, könnten diese Mutante zur Untersuchung der physiologischen und biochemischen Vorgänge der natürlichen Abwehrmechanismen herangezogen werden. Neuen Erkenntnisse über diese Vorgänge könnten zur Entwicklung alternativer Strategien zum konventionellen Pflanzenschutz dienen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden pflanzliche Membranproteine mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Anion:Cation-Symportern, insbesondere zu den Transportern der NaPi1-Familie aus Tieren untersucht. Neben den bereits bekannten Anion-Transporter (ANTR) aus *Arabidopsis thaliana* (ROTH *et al.*, 2004) wurde in dieser Arbeit eine homologe Proteinfamilie aus *Oryza sativa* identifiziert. Dabei konnte die funktionelle Verwandtschaft der Proteine AtANTR5 aus *A. thaliana* und OsANTR5.1 aus *O. sativa* mittels Komplementation der *antr5*-Mutante nachgewiesen werden.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag in der Charakterisierung der physiologischen Bedeutung des AtANTR5-Proteins in der Phosphathomöostase, im Stickstoffstoffwechsel oder bei Pathogenbefall. Mittels GFP-Fusionsexperimenten konnte für AtANTR5 eine subzelluläre Lokalisierung im Golgi-Apparat festgestellt werden. Durch AtANTR5-Promotor-GUS-Pflanzen wurde die gewebe- und entwicklungsspezifische Expression des Membranproteins untersucht. AtANTR5 weist in den meisten Geweben eine sehr geringe Transkriptmenge auf und ist mittels GUS-Färbung nur in Pollen detektierbar. Dennoch ist das AtANTR5-Protein für die ganze Pflanze von essentieller Bedeutung, da eine Inaktivierung des Gen zu gravierenden phänotypischen Veränderungen, gekennzeichnet durch zwergenhaften Wuchs, eingerollten Blättern und Blattläsionen.

Aufgrund der Ähnlichkeit zu tierischen Phosphattransportern, wurde zunächst der Einfluss von AtANTR5 auf die Phosphathomöostase in entsprechenden „knock out“-Mutanten untersucht. Es konnte jedoch keine Veränderungen im Phosphathaushalt festgestellt werden. Vielmehr weist die *antr5*-Mutante eine erhöhte Sensitivität gegenüber Aminosäuren, Ammonium und Salz auf. Offensichtlich ist die durch AtANTR5 Transportaktivität innerhalb des Golgi-Apparates von außerordentlichen Wichtigkeit für den pflanzlichen Stoffwechsel.

Des weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen AtANTR5 und Pathogenabwehr festgestellt werden. „Northern-Blot“-Analysen zeigten eine Induktion der AtANTR5-Expression als Antwort auf Pathogenbefall durch *P. syringae*. Zytologische sowie histochemische Analysen haben bei *antr5*-Pflanzen die Ausprägung zahlreicher Abwehrmechanismen, wie Ablagerungen von Callose in den Zellwänden, Akkumulation von phenolischen Metaboliten, Salizylsäure, PR-Proteinen und Wasserstoffperoxid oder Absterben der Zellen, gezeigt. Weiterhin konnte eine erhöhte Resistenz der *antr5*-Pflanzen gegenüber dem Befall von *P. syringae* ermittelt werden. Durch die Expression des *NahG*-Gens in *antr5*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Expression der PR-Gene Salizylsäure abhängig, das spontane Absterben der Zellen jedoch Salizylsäure unabhängig war. Dieses Befund lässt den Schluss zu, dass erhöhte SA-Akkumulation und die dadurch aktivierte Abwehr, sekundäre Effekte der AtANTR5-Inaktivierung darstellen.

Literaturverzeichnis

- Abeijon C, Mandon EC, Hirschberg CB** (1997) Transporters of nucleotide, sugars, nucleotide sulphate and ATP in the Golgi. *TIBS* **22**: 203-207
- Agrios GN** (2005) *Plant Pathology*. 5th edition Academic Press, San Diego, USA
- Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J** (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* **74**: 2622-2625
- Aklinski A, Rowley DL, Loer DS, Foley C, Buta G, Herman E** (1995) Binding-protein expression is subject too temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differentiated soybean organs. *Planta* **195**: 611-621
- Ali MS & Akazawa T** (1986) Association of proton-translocating ATPase in the Golgi membrane system from suspension-cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *Plant Physiol* **81**: 222-227
- Allen R** (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* **107**: 1049-1054
- Ames BN** (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* **8**: 115-118
- Andersen DA, & Goochee CF** (1995) The Effect of ammonia on the O-linked glycosylation of granulocyte colony-stimulating Factor produced by chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* **47**: 96-105
- Antoniw J & White RF** (1980) The effects of aspirin and polyacrylic acid on soluble leaf proteins and resistance to virus infection in five cultivars of tobacco. *Phytopathol Z* **98**: 331-341
- Arnon DJ** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1-15
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann M, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J** (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977-983
- Axelsson MAB, Karlson NG, Steel DM, Ouwedijk J, Nilsson T, Hansson GC** (2001) Neutralisation of pH the Golgi apparatus redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins. *Glycobiol* **11**: 633-644
- Azpiroz-Leehan R & Feldmann KA** (1997) T-DNA Insertion mutagenesis in Arabidopsis: Going back and forth. *Trends Genet* **13**: 152-159
- Babior BM** (1992) The respiratory burst oxidase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **65**: 49-95
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dines-Kumar SP** (1997) Signaling in plant-mikrobe interaction. *Science* **276**: 726-733
- Baldwin IT & Ohnmeiss TE** (1994) Swords into plowshares? *Nicotiana sylvestris* does not use nicotine as a nitrogen source under nitrogenlimited growth. *Oecologia* **98**: 385-392
- Baldwin IT** (1998) Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8113-8118
- Bariola PA, Howard CJ, Taylor CB, Verburg MT, Jaglan VD, Green PJ** (1994) The *Arabidopsis* ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J* **6**: 673-685
- Bates TR & Lynch JP** (1996) Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorous availability. *Plant Cell Envir* **19**: 529-538
- Bates TR & Lynch JP** (2000) Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am J Bot* **87**: 958-963

- Batley NH & Blackbourn HD** (1993) The control of exocytosis in plant cells. *New Phytol* **125**: 307-338
- Beckers GJM & Spoel SH** (2006) Fine-tuning plant defence signaling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biol* **8**: 1-10
- Bedinger P** (1992) The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* **4**: 879-887
- Beers EP & McDowell JM** (2001) Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 561-567
- Bellés JM, Garro R, Fayos J, Navarro P, Primo J, Conejero V** (1999) Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 227-235
- Bellés JM, Garro R, Pallás V, Fayos J, Rodrigo I, Conejero V** (2006) Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta* **223**: 500-511
- Bellocchio EE, Reimer RJ, Fereau RT, Edwards RH** (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* **289**: 957-960
- Bentel N** (2006) Physiologische Charakterisierung eines putativen Anion-Transportes aus *Arabidopsis thaliana* (L.). Diplomarbeit
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL** (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**: 332-341
- Bielecki RL** (1973) Phosphate pools, phosphate transport und phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol* **24**: 225-252
- Bird AF & Loveys BR** (1975) The incorporation of photosynthates by *Meloidogyne javanica*. *J Nematol* **7**: 111-113
- Black BL, Fuchigami LH, Coleman GD** (2002) Partitioning of nitrate assimilation among leaves, stems and roots of poplar. *Tree Physiol* **22**: 717-724
- Blee E** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* **7**: 315-321
- Borsani O, Valpuesta V, Botella MA** (2001) Evidence for a Role of Salicylic Acid in the Oxidative Damage Generated by NaCl and Osmotic Stress in Arabidopsis Seedlings. *Plant Physiol* **126**: 1024-1030
- Bourque JE** (1995) Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Sci* **105**: 125-149
- Bowles DJ** (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem* **59**: 873-907
- Boyer JS** (1982) Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448
- Brandizzi F, Irons SL, Johansen, Kotzer A, Neumann U** (2004) GFP is the way to glow: bioimaging of the plant endomembrane system. *J Microscopy* **214**: 138-158
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb CJ** (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* **6**: 1703-1712
- Brugière N, Dubois F, Masclaux C, Sangwan RS, Hirel B** (2000) Immunolocalization of glutamine synthase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta* **211**: 519-527
- Bucher M, Rausch C, Daram P** (2001) Molecular and biochemical mechanisms of phosphorus uptake into plants. *J Plant Nutr Soil Sci* **164**: 209-217
- Busch AE, Schuster A, Waldegger S, Wagner CA, Zempel G, Broer S, Biber J, Murer H, Lang F** (1996) Expression of renal type I sodium/phosphate transporter (NaPi-1) induces a conductance in *Xenopus oocytes* permeable for organic and inorganic anions. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5347-5351
- Cao H, Li X, Dong X** (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6531-6536
- Carmona E, Dufour E, Plouffe C, Takebe S, Mason P, Mort JS, Menard R** (1996) Potency and selectivity of the cathosin L propeptide as an inhibitor of Proteases. *Biochem* **35**: 8149-8157

- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC** (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-803
- Chalot M, Blaudez D, Brun A** (2006) Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends Plant Sci* **11**: 263-266
- Champigny ML** (1995) Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. *Photosynthesis Res* **46**: 117-127
- Chanson A & Taiz L** (1985) Evidence for an ATP-dependent proton pump on the Golgi of corn coleoptiles. *Plant Physiol* **78**: 232-240
- Chapman GP** (1987) The tapetum. *Int Rev Cytol* **107**: 111–125
- Chen L & Bush DR** (1997) LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **115**: 1127-1134
- Chen L, Ortiz-Lopez A, Jung A, Bush DR** (2001) ANT1, an aromatic and neutral amino acid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **125**: 1813-1820
- Chen X & Schnell DJ** (1999) Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol* **9**: 222-227
- Clausen C, Ilkavets I, Thomson R, Philippar K, Vojta A, Möhlmann T, Neuhaus HE, Fulgosi H, Soll J** (2004) Intracellular localization of VDAC proteins in plants. *Planta* **220**: 30-37
- Cohen Y, Gisi U, Möisinger E** (1991) Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. *Physiol Mol Plant Pathol* **38**: 255-273
- Conrath U & Kauss H** (2000) Das "Immunsystem" der Pflanze. *Biologie in unserer Zeit* **30(4)**: 202-208
- Cooper HD & Clarkson DT** (1989) Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals – A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrition uptake. *J Exp Bot* **40**: 753-762
- Crawford NM & Forde BG** (2002) Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. *The Arabidopsis Book*, 1-25
- Creelman RA & Mullet JE** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 355-381
- Danon A, Delorme V, Mailhac N, Gallois P** (2000) Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiol Biochem* **38**: 647-655
- Daram P, Brunner S, Persson BL, Amrhein N, Bucher M** (1998) Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* **206**: 225-233
- Daram P, Brunner S, Rauch C, Steiner C, Amrhein N, Bucher M** (1999) Pht2;1 encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *Plant cell* **11**: 2153-2166
- Dat J, Vandenbeeke S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* **57**: 779-795
- Davenport R** (2002) Glutamate receptors in plants. *Annals of Botany* **90**: 549-557
- de Graaf MCC, Bobbink R, Roelofs JGM, Verbeek PJM** (1998) Differential effects of ammonium and nitrate on three heathland species. *Plant Ecology* **135**: 185-196
- Dean JV, Mohammed LA, Fritzpatrick** (2005) The formation, vacuolar localization, an tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* **221**: 287-296
- Delaney TP** (1997) Genetic Dissection of Acquired Resistance to Disease. *Plant Physiol* **113**: 5-12
- Delhaize E & Randall P J** (1995) Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **107**: 207-213
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588
- Demidchik V, Essah PA, Tester M** (2004) Glutamate activates cation currents in the plasmamembrane of *Arabidopsis* root cells. *Planta* **219**: 167-175

- Denecke J, Carlsson LE, Vidal S, Höglund AS, Ek B, van Zeijl MJ Sinjorgo KMC, Palva ET (1995)** The tobacco homolog of mammalian celreticulin is present in protein complexes in vivo. *Plant Cell* **7**: 391-406
- Dennison KL & Spalding EP (2000)** Glutamate-gated calcium fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **124**: 1511-1514
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich L, Genin S, Marco Y (2003)** Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8024-8029
- Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K (2006)** Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell*. **18**: 715-730
- Dietrich A, Mayer JE, Hahlbrock K (1990)** Fungal elicitors triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J Biol Chem* **265**: 6360-6368
- Dietrich RA, Delaney TP, Uknes SJ, Ward ER, Ryals JA, Dangl JL (1994)** Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**: 565-577
- Dinkelaker B & Marschner H (1992)** *In vivo* demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants. *Plant Soil* **144**: 199-205
- Doares SH, Narvaez-Vasquez J, Conconi A, Ryan CA (1995)** Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol* **108**: 1741-1746
- Doehlert DC, Wicklow DT, Gardner HW (1993)** Evidence implicating the lipoxygenase pathway in providing resistance to soybean against *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* **83**: 1473-1478
- Dong X, Mindrinos M, Davis KR, Ausubel FM (1991)** Induction of Arabidopsis defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by cloned avirulence gene. *Plant Cell* **3**: 61-72
- Dorey S, Baillieux F, Pierrel MA, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S (1997)** Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Mol Plant-Microbe Interact* **10**: 646-655
- Duff SMG, Moorhead GBG, Lefebvre DD Plaxton WC (1989)** Phosphate starvation inducible „bypasses“ of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol* **90**: 1275-1278
- Duff SMG, Sarath G, Plaxton WC (1994)** The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol Plant* **90**: 791-800
- Duke RC & Cohen JJ (1986)** IL-2 addiction: Withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T-cells. *Lymphokine Res* **5**: 289-299
- Durner J, Shah J, Klessig DF (1997)** Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* **2**: 266-274
- Ebel J & Cosio EG (1994)** Elicitors of plant defense responses. *Int Rev Cytol* **148**: 1-36
- Ebel J & Mithöfer A (1998)** Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**: 335-348
- Ecker J & Davis R (1986)** Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 5372-5376
- Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR (1991)** Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* **7**: 663-698
- Emanuelsson OH, Nielsen S, von Brunak HG (2000)** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**: 1005-1016
- Eschrich W & Currier HB (1964)** Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. *Stain Technol* **39**: 303-307
- Escoubet B Djabali K, Amiel C (1989)** Adaptation to Pi deprivation of cell Na-dependent Pi uptake – a widespread process. *Am J Physiol* **256**: C322-C328

- Farrow SN & Brown R** (1996) New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 45-49
- Fayos J, Bellés JM, López-Gresa MP, Primo J, Conejero V** (2006) Induction of gentisic acid 5-O-b-D-xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens. *Phytochemistry* **67**: 142-148
- Felix G, Grosskopf DG, Regenass M, Boller T** (1991) Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cell. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8831-8834
- Felix G, Regenass M, Boller T** (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: Induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J* **4**: 307-316
- Findenegg GR** (1987) A comparative study of ammonium toxicity at different constant pH of the nutrient solution. *Plant Soil* **103**: 239-243
- Fischer DE** (1994) Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* **78**: 539-542
- Fischer WN, Loo DD, Koch W, Ludewig U, Boorer KJ, Tegeder M, Rentsch D, Wright EM, Frommer WB** (2002) Low and high affinity amino acid H⁺- cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. *Plant J* **29**: 717-731
- Flor H** (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**: 275-296
- Flügge UI** (1999) Phosphate translocators in plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 27-45
- Flügge UI & Weber A** (1994) A rapid method for measuring organelle-specific substrate transport in homogenates from plant tissues. *Planta* **194**: 181-185
- Forde BG** (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 219-235
- Foyer CH, Descourvières P, Kunert KJ** (1994) Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ* **17**: 507-523
- Franz TA, Peterson DM, Durbin RD** (1982) Sources of ammonium in oat leaves treated with tabtoxin or methionine sulfoximine. *Plant Physiol* **69**: 345-348
- Friedrich L, Vernooij B, Gaffney T, Morse A, Ryals J** (1995) Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol Biol* **29**: 959-968
- Frommer WB & Ninnemann O** (1995) Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal, and plant cells. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 419-443
- Frommer WB, Hummel S, Unseld M, Ninnemann O** (1995) Seed and vascular expression of a high-affinity transporter for cationic amino acids in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 12036-12040
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negmtto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754-756
- Gawlitsek M, Ryll T, Lofren J, Sliwkowski M** (2000) Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: Degrative Versus Biosynthetic mechanisms. *Biotechnol Bioeng* **68**: 637-646
- Gething MJ & Sambrook J** (1992) Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 33-45
- Gilchrist DG** (1998) Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annu Rev Phytopathol* **36**: 393-414
- Givan CV** (1979) Metabolic detoxification of ammonium in higher plants. *Phytochem* **18**: 375-382
- Glass AD, Britto DT, Kaiser BN, Kinghorn JR, Kronzucker HJ, Kumar A, Okamoto M, Rawat S, Siddiqi MY, Unkles SE, Vidmar JJ** (2002) The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *J Exp Bot* **53**: 855-864
- Glazebrook J, Rogers EE, Ausubel FM** (1996) Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**: 973-982

- Glickman J, Croen K, Kelly S, Al-Awquati Q** (1983) Golgi membranes contain an electrogenic H⁺ pump in parallel to a chloride conductance. *J Cell Biol* **97**: 1303-1308
- Goldstein AH, Baertlein DA, McDaniel RG** (1988a) Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*. I. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension-cultured cells. *Plant Physiol* **87**: 711-715
- Gommers FJ & Dropkin VH** (1977) Quantitative histochemistry of nematode-induced transfer cells. *Phytopathology* **67**: 869-873
- Gong Z, Koiwa H, Cushman MA, Ray A, Bufford D, Kore-eda S, Matsumoto TK, Zhu J, Cushman JC, Bressan RA, Hasegawa PM** (2001) Genes that are uniquely stress-regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. *Plant Physiol* **126**: 363-375
- Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S** (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* **108**: 1657-1664
- Grabe M & Oster G** (2001) Regulation of Organelle Acidity. *J Gen Physiol* **117**: 329-343
- Grant JJ, Yun BW, Loake GJ** (2000) Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *Plant J* **24**: 569-582
- Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J** (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J* **23**: 441-450
- Gras C, Herzog E, Belenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, Mestikawy S** (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* **22**: 5442-5451
- Greenberg JT** (1997) Programmed cell death in plant pathogen interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 525-545
- Griffith JK, Baker ME, Rouch DA, Page MGP, Skurray RA, Paulsen IT, Chater KF, Baldwin SA, Henderson PJF** (1992) Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr Opin Cell Biol* **4**: 684-695
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM** (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signalling. *Science* **302**: 100-103
- Hahlbrock K & Scheel D** (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 347-369
- Hahlbrock K, Scheel D, Logemann E, Nurnberger T, Parniske M, Reinold S, Sacks WR, Schmelzer E** (1995) Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4150-4157
- Hall BG** (2004) *Phylogenetic trees made easy*. pp1-122 Sinauer Associates
- Hammerschmidt R & Kagan IA** (2001) In This Issue "Phytoalexins into the 1st century". *Physiol Mol Plant Pathol* **59**: 59-61
- Hammond-Kosack KE & Jones JDG** (1996) Resistance Gene-Dependent Plant Defence Responses *Plant Cell* **8**: 1773-1791
- Hammond-Kosack KE & Jones JDG** (2000) Responses to plant pathogens. In: *Biochemistry and molecular biology of plants*. (Buchanan B, Gruissem W, Jones R) Am Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1102-1156
- Hammond-Kosack KE & Parker JE** (2003) Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotech* **14**: 177-193
- Havkins S, Leplé JC, Daniel Cornu D, Jouanin L, Pilate G** (2003) Stability of transgene expression in poplar: A model forest tree species. *Ann For Sci* **60**: 427-438
- Haynes RJ & Goh KM** (1978) Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biol Rev* **53**: 465-510
- Heath MC** (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defences. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 315-319

- Heese M, Gansel X, Sticher L, Wick P, Grebe M, Granier F, Jürgens G** (2003) Functional characterization of the KNOLLE-interacting t-SNARE AtSNAP33 and its role in plant cytokinesis. *J Cell Biol* **155**: 239-249
- Hellens R, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux P** (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**: 819-832
- Henderson, PJF** (1991) Sugar transport proteins. *Curr Opin Struct Biol* **1**: 590-601
- Hensel LL, Gibric V, Baumgarten DA, Bleecker AB** (1993) Developmental and age-related process that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis. *Plant Cell* **5**: 553-564
- Herbers K, Meuwly P, Frommer WB, Métraux JP, Sonnewald U** (1996) Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* **8**: 793-803
- Howitt SM & Udvardi MK** (2000). Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 152-170
- Huang CN, Corne MJ, Bush DS, Jones RL** (1986) Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. *Protoplasma* **135**: 425-437
- Huh GH, Damsz B, Matsumoto TK, Reddy MP, Rus AM, Ibeas JI, Narasimhan ML, Bressan RA, Hasegawa PM** (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J* **29**: 649-659
- Hunt M & Ryals J** (1996) Systemic acquired resistance signal transduction. *Crit Rev Plant Sci* **15**: 583-606
- Hurkman WJ & Tanaka CK** (1996) Germin gene expression is induced in wheat leaves by powdery mildew infection. *Plant Physiol* **111**: 735-739
- Hussey RS** (1989) Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. *Annu Rev Phytopathol* **27**: 123-141
- Ikegawa T, Mayama S, Nakayashiki H, Kato H** (1996) Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* and its role in the resistance of oat leaves to cell wall degrading enzymes. *Physiol Mol Plant Pathol* **48**: 245-255
- Innes RW, Bent AF, Kunkel BN, Bisgrove SR, Staskawicz BJ** (1993) Molecular characterisation of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J Bacteriol* **175**: 4859-4869
- Ito H, Fukuda J, Murata K, Kimura A** (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168
- Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, Panstruga R, Strizhov N, Schulze-Lefert P, Fincher GB** (2003) An Arabidopsis callose synthase, *GSL5*, is required for wound and papillary callose formation. *Plant Cell* **15**: 2503-2513
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC** (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**: 347-354
- Jambunathan N, Siani JM, McNellis TW** (2001) A humidity-sensitive Arabidopsis copine mutant exhibits precocious cell death and increased disease resistance. *Plant Cell* **13**: 2225-2240
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901-3907
- Jelitto-van Dooren EPWM, Vidal S, Denecke J** (1999) Anticipating endoplasmic reticulum stress: a novel early response before pathogenesis-related gene induction. *Plant Cell* **11**: 1935-1943
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B** (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* **19**: 4004-4014
- Jiang CZ, Kliebenstein DE, Ke N, Rodermeil S** (1994) Destabilization of *rbcS* sense transcripts by antisense RNA. *Plant Mol Biol* **25**: 569-576
- Johnson PR & Ecker JR** (1998) The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annu Rev Genet* **32**: 227-254

- Jonak C, Ökrész L, Bögre L, Hirt H** (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 415-424
- Kaiser BN, Rawat SR, Siddiqi MY, Masle J, Glass ADM** (2002) Functional Analysis of an Arabidopsis T-DNA "Knockout" of the High-Affinity NH₄-Transporter AtAMT1;1. *Plant Physiol.* **130**: 1263-1275
- Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae T, Ojlma K** (1991) A role for glutamine synthetase in the remobilisation of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiol* **96**: 411-417
- Kamoun S** (2001) Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 295-300
- Katsuhara M & Kawasaki T** (1996) Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristemic cells of barley roots. *Plant Cell Physiol* **37**: 169-173
- Katsuhara M & Shibasaka M** (2000) Cell death and growth recovery of barley after transient salt stress. *J Plant Res.* **113**: 239-243
- Katsuhara M** (1997) Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress. *Plant Cell Physiol.* **38**: 1091-1093
- Kauss H** (1992) Callose and callose synthase *Mol Plant Path Ed.:* Guro SL, McPherson MJ, Bowles DJ, Oxford University Press Oxford UK **2**: 1-8
- Kauss H, Jeblick W, Domard A** (1989) Degree of polymerisation and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta* **178**: 385-392
- Kawakami N & Watanabe A** (1988) Senescence specific increase in cytosolic glutamine synthetase and its mRNA in radish cotyledones. *Plant Physiol* **88**: 1430-1434
- Kawano T & Muto S** (2000) Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. *J Exp Bot* **51**: 685-693
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257
- Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrave RM, Mifflin BJ** (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* **275**: 741-743
- Kieber JJ** (1997) The ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 277-296
- Kim JW, Closs EI, Albritton LM, Cunningham JM** (1991) Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* **352**: 725-728
- Kim SA, Kwak JM, Jae SK, Wang MH, Nam HG** (2001) Overexpression of the *AtGluR2* gene encoding an *Arabidopsis* homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilisation and sensitivity to ionic stress in transgenic plants. *Plant Cell Physiol* **42**: 74-84
- Kitajima M & Butler WL** (1975) Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim biophys Acta* **376**: 105-115
- Kleiner D** (1981) The transport of NH₃ and NH₄⁺ across biological membranes. *Biochim Biophys Acta* **639**: 41-52
- Kneen M, Farinas J, Li Y, Verkman AS** (1998) Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys J* **74**: 1591-1599
- Koga H, Bushnell WR, Zeyen RJ** (1990) Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Can J Bot* **68**: 2344-2352
- Koiwa H, Li F, McCully MG, Mendoza I, Koizumi, N, Manabe, Y, Nakagawa Y, Zhu J, Rus A, Pardo JM, Bressan RA, Hasegawa PM** (2003) The STT3a Subunit Isoform of the Arabidopsis Oligosaccharyltransferase Controls Adaptive Responses to Salt/Osmotic Stress. *Plant Cell* **15**: 2273-2284

- Krysan PJ, Young JC, Sussman MR** (1999) T-DNA as an insertion mutagen in Arabidopsis. *Plant Cell* **11**: 2283-2290
- Kunkel BN, Bent AF, Dahlbeck D, Innes RW, Staskawicz BJ** (1993) RPS2, an Arabidopsis disease resistance locus specifying recognition of *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene avrRpt2. *Plant cell* **5**: 865-875
- Kurosaki F, Yamashita A, Arisawa M** (2001) Involvement of GTP-binding protein in the induction of phytoalexin biosynthesis in cultured carrot cells. *Plant Sci* **161**: 273-278
- Lam E, Kato N, Lawton M** (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**: 848-853
- Lam HM, Chiu J, Hsieh MH, Meisel L, Oliveira IC, Shin M, Coruzzi GM** (1998) Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* **396**: 125-126
- Lam HM, Cishigano K, Schulz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, Olivera J, Ngai N, Hisch HM, Coruzzi G** (1995) Use of Arabidopsis mutants and genes to study amino acid biosynthesis, *Plant cell* **7**: 887-898
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM** (1996) The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 569-593
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Lane BG, Dunwell JM, RayJA, Schmitt MR, Cuming AC** (1993) Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J Biol Chem* **268**: 12239-12242
- Lange H, Shropshire W, Mohr H** (1971) An analysis of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis. *Plant Physiol* **57**: 649-655
- Lee HI & Raskin I** (1998) Glucosylation of lalicylic acid in *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi-nc* *Phytopathol* **88**: 692-697
- Lenburg ME & O'Shea EK** (1996) Signalling phosphate starvation. *Trends Biochem Sci* **21**: 383-386
- Leroch M** (2006) Molekulare, biochemische und physiologische Eigenschaften von Transportproteinen der MCF (mitochondrial carrier family) aus Pflanzen und Protisten. Dissertation
- Levine A, Pennell RI, Alvarez ME, Palmer R, Lamb C** (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol* **6**: 427-437
- Leyman B, Geelen D, Blatt MR** (2000) Localization and control of expression of Nt-Syr1, a tobacco snare protein, *Plant J* **24**: 369-381
- Lieberherr D, Wagner U, Dubuis PH, Metraux JP, Mauch F** (2003) The Rapid induction of glutathione S-transferases AtGSTF2 and AtGSTF6 by avirulent *Pseudomonas syringae* is the result of combined salicylic acid and ethylene signalling. *Plant Cell Physiol* **44**: 750-757
- Lin J, Wang Y, Wang G** (2006) Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *J Plant Physiol* **163**: 731-739
- Lohaus G, Burba M, Heldt HW** (1994) Comparison of the contents of sucrose and amino acids in the leaves, phloem sap and taproots of high and low sugar-producing hybrids of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J Exp Bot* **45**: 1097-1101
- Lohaus G, Winter H, Riens B, Heldt HW** (1995) Further studies of the phloem loading process in leaves of barley and spinach. The comparison of metabolite concentrations in the apoplasmic compartment with those in the cytosolic compartment and in the sieve tubes. *Bot Acta* **108**: 270-275
- Ludewig U, von Wiren N, Frommer WB** (2002) Uniport of NH₄⁺ by the root hair plasmamembrane ammonium transporter LeAMT1;1. *J Biol Chem* **277**: 13548-13555
- Lynch, J** (1995) Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol* **109**: 7-13

- Ma Z, Bielenberg DG, Brown KM, Lynch JP** (2001) Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **24**: 459-467
- Mach JM, Castillo AR, Hoogstraten R, Greenberg JT** (2001) The *Arabidopsis* accelerate cell death gene *ACD2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 771-776
- Maiden MCJ, Davis EO, Baldwin SA, Moore DCM, Henderson PJF** (1987) Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature* **325**: 641-643
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I** (1990) Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002-1004
- Mancini GM, Beerens CE, Aula PP, Verheijen FW** (1991) Sialic acid Storage diseases. A multiple lysosomal transport defect for acidic monosaccharides. *J Clin Invest* **87**: 1329-1335
- Mandel M & Higa A** (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162
- Marger MD & Saier MH** (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators catalyzing uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* **18**: 13-20
- Marschner H** (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press, London
- Martin A, Auger EA, Blum PH, Schultz JE** (1989) Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria. *Annu Rev Microbiol* **43**: 293-316
- Martin SJ & Green DR** (1996) Protease activation during apoptosis: Death by thousand cuts? *Cell* **82**: 349-352
- Martin W & Herrman RG** (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens and why? *Plant Physiol* **118**: 9-17
- Martinelle K, Westlund A, Haggström L** (1996) Ammonium ion transport - a cause of cell death. *Cytotechnology* **22**: 251-254
- Martinez P & Persson B** (1998) Identification, cloning and characterization of a depressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **258**: 628-638
- Marty F** (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell* **11**: 587-59
- Massonneau A, Martinoia E, Dietz KJ, Mimura T** (2000) Phosphate uptake across the tonoplast of intact vacuoles isolated from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Planta* **211**: 390-395
- Matlack KE, Mothes W, Rapoport TA** (1998) Protein translocation: tunnel vision. *Cell* **92**: 381-390
- Matsumura H, Nirasawa S, Kiba A, Urasaki N, Saitoh H, Ito M, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Terauchi R** (2003) Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant J* **33**: 425-434
- Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA** (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* **17**: 969-973
- Matzke MA & Matzke AJM** (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiol* **107**: 679-685
- Matzke MA, Matzke AJM, Pruss GJ, Vance VB** (2001) RNA-based silencing strategies in plants. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 221-227
- Mauch F, Mauch-Mani B, Gaille C, Kull B, Haas D** (2001) Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by expression of an engineered bacterial salicylate synthase. *Plant J* **25**: 62-77
- Mauch-Mani B & Slusarenko A** (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* **8**: 203-312
- Maxwell K & Johnson GN** (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* **51**: 659-668
- McFadden GI** (1999) Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 513-519
- Mehrer I & Mohr H** (1989) Ammonium toxicity: Description of the syndrome in *Sinapis alba* and the search for its causation. *Physiol Plant* **77**: 545-554

- Mellman I Fuchs R, Helenius A** (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann Rev Biochem* **55**: 663-700
- Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Bem M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W, Inverardi B** (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006
- Meuwly P & Métraux JP** (1993) Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal Biochem* **214**: 500-505
- Mimura T** (1995) Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant Cell Physiol* **36**: 1-7
- Mimura T** (1999) Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *Int Rev Cytol* **191**: 149-200
- Mimura T, Dietz K, Kaiser W, Schramm M, Kaiser G, Heber U** (1990) Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. *Planta* **180**: 139-146
- Mimura T, Sakano K, Shimmen T** (1996) Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. *Plant Cell Envir* **19**: 311-320
- Minami A & Fukuda H** (1995) Transient and specific expression of a cysteine endopeptidase associated with autolysis during differentiation of *Zinnia mesophyll* cells into tracheary elements. *Plant Cell Physiol* **36**: 1599-1606
- Miras S, Salvi D, Ferro M, Grunwald D, Garin J, Joyard J, Rolland N** (2002) Non -canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J Biol Chem* **277**: 47770-47778
- Miroux B & Walker JE** (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutants hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**: 289-298
- Mitsuhara I, Mlaik KA, Miura M, Ohashi Y** (1999) Animal cell-death suppressors Bcl-XL and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr Biol* **9**: 775-778
- Mittler R & Rizhsky Ludmilla** (2000) Transgene-induced lesion mimic. *Plant Mol Biol* **44**: 335-334
- Mizuno M & Singer SJ** (1993) Soluble secretory proteins is first concentrated in the endoplasmic reticulum before transfer to the golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5732-5736
- Mohr H & Schopfer** (1995) *Plant Physiology*. Springer-Verlag
- Mölders W, Buchala A, Métraux JP** (1996) Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. *Plant Physiol* **112**: 787-792
- Morel F, Doussiere J, Vignais PV** (1991) The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells: physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* **201**: 523-546
- Morgan PW & Drew MC** (1997) Ethylene and plant responses to stress. *Physiol Plant* **100**: 620-630
- Morita-Yamamuro C, Tsutsui T, Sato M, Yoshioka H, Tamaoki M, Ogawa D, Matsuura H, Yoshihara T, Ikeda A, Uyeda I, Yamaguchi J** (2005) The Arabidopsis Gene CAD1 Controls Programmed Cell Death in the Plant Immune System and Encodes a Protein Containing a MACPF Domain. *Plant Cell Physiol* **46**: 902-912
- Morris K, Mackerness SAH, Page T, John CF, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V** (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J* **23**: 677-685
- Mukatira U, Lui C, Varadarajan DK, Raghothama KG** (1996) Negative Regulation of phosphate starvation induced genes. *Plant Physiol* **127**: 1854-1862
- Murashige F & Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* **15**: 473-496
- Murphy AM, Chivasa S, Singh DP, Carr JP** (1999) Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the way. *Trends Plant Sci* **4**: 155-160

- Murray AJS, Blackwell RD, Joy KW, Lea PJ** (1987) Photorespiratory N donors, aminotransferase specificity and photosynthesis in a mutant of barley deficient in serine:glyoxylate aminotransferase activity. *Planta* **172**:106–113
- Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T** (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* **7**: 869-886
- Nada A & Soll J** (2004) Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J Cell Science* **117**: 3975-3982
- Nagata S** (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* **88**: 355-365
- Nakamura E & Hagen SJ** (2002) Role of glutamine and arginase in protection against ammonia-induced cell death in gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**: G1264–G1275
- Näsholm T, Ekblad A, Nordin A, Giesler R, Högberg M, Högberg R** (1998) Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* **392**: 914-916
- Natr L** (1992) Mineral nutrients-a ubiquitous stress factor for photosynthesis. *Photosynthetica* **27**: 271-294
- Nawrath C, Heck S, Parinthawong N, Métraux JP** (2002) EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signalling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* **14**: 275-286
- Ni B, Rosteck PR, Nadi NS, Paul SM** (1994) Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5607-5611
- Nielsen HJ, Engelbrecht S, von Brunak HG** (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**: 1-6
- Nürnberger T & Brunner F** (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Cur Opin Plant Biol* **5**: 318-324
- Nürnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**: 249-266
- Oerke EC & Dehne HW** (1997) Global crop production and the efficacy of crop protection-current situation and future trends. *Eur J Plant Pathol* **103**: 203-215
- Ogawa N, DeRisi J, Brown PO** (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell* **11**: 4309-4321
- Okita TW & Rogers JC** (1996) Compartmentation of proteins in the endomembrane system of plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 327-350
- Okumoto S, Schmidt R, Tegeder M, Fischer WN, Rentsch D, Frommer WB, Koch W** (2002) High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of Arabidopsis. *J Biol Chem* **277**: 45338-45346
- Oppenheim RW** (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **14**: 453-501
- Orsel M, Eulenburg K, Krapp A, Daniel-Vedele F** (2004) Disruption of the nitrate transporter genes AtNRT2.1 and AtNRT2.2 restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta* **219**: 714-721
- Orsel M, Filleur S, Fraissier V, Daniel-Vedele F** (2002) Nitrate transport in plants: which gene and which control? *J Exp Bot* **53**: 825-833
- Osborn AE** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defence against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831
- Oshima Y, Ogawa N, Narashima S** (1996) Regulation of phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* a review. *Gene* **179**: 171-177
- Otis TS** (2001) Vesicular glutamate transporters incognito. *Neuron* **29**: 11-14

- Palade GE** (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**: 347-358
- Panstruga R & Schulze-Lefert** (2002) Live and let live: insights into powdery mildew disease and resistance. *Mol Plant Pathol* **3**: 495-502
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH** (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol Biol Rev* **62**: 1-34
- Pate JS** (1980) Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu Rev Plant Physiol* **31**: 313-340
- Peck SC** (2003) Early phosphorylation events in biotic stress. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 334-338
- Pena-Cortes H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L** (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* **191**: 123-128
- Peng M & Kuc J** (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathol* **82**: 696-699
- Pennel R & Lamb C** (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* **9**: 1157-1168
- Penninckx IAMA, Eggermont K, Terras FRG, Thomma BPHJ, Samblanx GWD, Buchala A, Metraux JP, Manners J, Broekaert WF** (1996) Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis* Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway. *Plant Cell* **8**: 2309-2323
- Persson BL, Berhe A, Fristedt U, Martinez P, Pattison J, Petersson J, Weinander R** (1998) Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Acta* **1365**: 23-30
- Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J** (2000) Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111-1120
- Peuke AD, Jeschke WD, Dietz KJ, Schreiber L, Hartung W** (1998) Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis*-l-carbon and nitrogen uptake and inflows. *New Phytologist* **138**: 675-687
- Pietersen CMJ & van Loon LC** (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci* **4**: 52-58
- Pisoni RL & Thoene JG** (1991) The transportsystems of mammalian lysosomes. *Biochim Biophys Acta* **1071**: 351-373
- Plano GV & Winkler HH** (1989) Solubilization and reconstitution of the *Rickettsia prowazekii* ATP/ADP translocase. *J Memb Biol* **110**: 227-233
- Plano GV & Winkler HH** (1991) Identification and initial topological analysis of the *Rickettsia prowazekii* ATP/ADP translocase. *J Bacteriol* **173**: 3389-3396
- Poirier Y, Somerville C, Schiefelbein J** (1991) A mutant of Arabidopsis deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol* **97**: 1087-1093
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ** (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescence protein. *Gene* **111**: 229-233
- Price AH, Hendry GAF** (1991) Iron-catalyzed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant Cell Environ* **14**: 477-484
- Raab TK & Terry N** (1994) Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol* **105**: 1159-116
- Rae AL, Cybnisky DH, Jamey JM, Smith FW** (2003) Characterization of two phosphate transporters from barley; evidence for diverse function and kinetic properties among members of Pht1 family. *Plant Mol Biol* **53**: 27-36
- Raghotama KG** (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 665-693
- Raghotama KG** (2000) Phosphate transport and signalling. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 182-187
- Ramage CM & Williams RR** (2002) Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs. *J Exp Bot* **53**(373): 1437-1443

- Rasmussen JB, Hammerschmidt R, Zook MN** (1991) Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Phys* **97**: 1342-1347
- Rate DN, Cuenca JV, Bowman GR, Guttman DS, Greenberg JT** (1999) The gain-of-function *Arabidopsis acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signalling pathway in controlling cell death, defences, and cell growth. *Plant Cell* **11**: 1695–1708
- Rauch C & Bucher M** (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* **216**: 23-37
- Rauch C, Zimmermann P, Amrhein N, Bucher M** (2004) Expression analysis suggests novel roles for the plastidic phosphate transporter Pht2;1 in auto- and heterotrophic tissues in potato and *Arabidopsis*. *Plant J* **39**: 13-28
- Rayle DL, Ross CW, Robinson N** (1982) Estimation of osmotic parameters accompanying zeatin-induced growth of detached cucumber cotyledons. *Plant Physiol* **70**: 1634-1636
- Reddy ASN** (2001) Calcium: Silver bullet in signalling. *Plant Sci* **160**: 381-404
- Reid RJ, Mimura T, Ohsumi Y, Walker NA, Smith FA** (2000) Phosphate uptake in *Chara*: membrane transport via Na/Pi cotransport. *Plant Cell Environ* **23**: 223-228
- Renlund M, Aula P, Raivio KO, Autio S, Sainio K, Rapola J, Koskella SL** (1983) Salla disease: a new lysosomal storage disorder with disturbed sialic acid metabolism. *Neurology* **33**:57-66
- Renlund M, Tietze F, Gahl WA** (1986) Defective sialic acid egress from isolated fibroblast lysosomes of patients with Salla disease. *Science* **232**: 759-762
- Reumann S** (2004) Specification of the targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. *Plant Physiol* **135**: 783-800
- Reumann S, Ma C, Lemke S, Baujee L** (2004) AraPeroX. A Database of putative *Arabidopsis* proteins from plant peroxisomes. *Plant Physiol* **136**: 1-22
- Ribnicky DM, Shulaev V, Raskin I** (1998) Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* **118**: 565-572
- Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt HW** (1991) Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiol* **97**: 227-233
- Rigaud JL, Pitard B, Levy D** (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: Application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1231**: 223-246
- Roberts JKM & Pang MKL** (1992) Estimation of ammonium ion distribution between cytoplasm and vacuole using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol* **100**: 1571-1574
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot* **53**: 103-110
- Rohacek K** (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynth* **40**: 13-29
- Roos W, Evers S, Hieke M, Tschope M, Schumann B** (1998) Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids. Phytoalexin biosynthesis in cultured cells of *Eschscholtzia californica*. *Plant Phys* **118**: 349-364
- Ross AF** (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **13**: 340–358
- Roth C, Menzel G, MacDonald-Comber, Petétot J, Rochat-Hacker S, Poirier Y** (2004) Characterization of a protein of the plastid inner envelope having homology to animal inorganic phosphate, chloride and organic-anion transporters. *Planta* **218**: 406-416
- Royo J, Leon J, Vancanneyt G, Albar JP, Rosahl S, Ortego F, Castanera P, Sanchez-Serrano JJ** (1999) Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Pro Natl Acta Sci USA* **96**: 1146-1151

- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signalling both in vascular plants and unicellular algae. *Genes Dev* **15**: 2122-2133
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **8**: 1809-1819
- Ryan CA & Farmer EE (1991) Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Annu Rev Plant Physiol* **42**: 651-674
- Sacks MM, Silk WK, Burman P (1997) Effect of water stress on cortical cell division rates within the apical meristem of primary roots of maize. *Plant Physiol* **114**: 519-527
- Sadka A, DeWald DB, May GD, Park WD, Mullet JE (1994) Phosphate modulates transcription of soybean *VspB* and other sugar-inducible genes. *Plant Cell* **6**: 737-749
- Saier MH (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 354-411
- Salsac L, Chaillou S, Mordot Gaudry JF, Lesaint C, Jolivet E (1987) Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol Chem* **25**: 805-812
- Samarajeewa PK, Barrero RA, Umeda-Hara C, Kawai M, Uchimiya H (1999) Cortical cell death, cell proliferation, macromolecular movements and rTip1 expression patterns in roots of rice (*Oryza sativa* L.) under NaCl stress. *Planta* **207**: 354-361
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA
- Savill J (1994) Apoptosis and disease. *Eur J Clin Invest* **24**: 715-723
- Schäfer MKH, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* **277**: 50734-50748
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM (2000) Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11655-11660
- Schultheiss H, Dechert C, Kogel KH, Huckelhoven R (2002) A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. *Plant Physiol* **128**: 1447-1454
- Schweigert N, Zehnder AJB, Eggen RIL (2001) Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiol* **3**: 81-91
- Schweizer P, Gees R, Möisinger E (1993) Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with powdery mildew *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Plant Physiol* **102**: 503-511
- Serino L, Reimann C, Baur H, Beyeler M, Visca P, Haas D (1995) Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* **249**: 217-228
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko, C, Clarke JD, Cotton D, Bullis D, Snell J, Miguel T, Hutchison D, Kimmerly B, Mitzel T, Katagiri F, Glazerbrook J, Law M, Goff SA (2002) A high-throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *Plant Cell* **14**: 2985-2994
- Shah J (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 1-7
- Shah J, Kachroo P, Klessig DF (1999) The Arabidopsis *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* **11**: 191-206
- Sharp JK, Valent B, Albersheim P (1984) Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicit phytoalexin accumulation in soybean. *Plant Cell* **2**: 1027-1038
- Shen KA, Meyers BC, Islam-Faridi NM, Chin DB, Stelly DM, Michelmore RW (1998) Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**: 815-823

- Shi H, Kim Y, Guo Y, Stevenson B, Zhu JK** (2003) The Arabidopsis SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *Plant Cell* **15**: 19-32
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y** (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223-239
- Soll J** (2002) Protein import into chloroplasts. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 529-535
- Staehelin LA & Moore I** (1995) The plant golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 261-288
- Staehelin LA** (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* **11**: 1151-1165
- Stitt M** (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 178-186
- Strokes TL, Kunkel BN, Richards EJ** (2002) Epigenetic variation in Arabidopsis disease resistance. *Genes Dev* **16**: 171-182
- Su YH, Frommer WB, Ludewig U** (2004) Molecular and functional characterization of a family of amino acid transporters from Arabidopsis. *Plant Physiol* **136**: 3104-3113
- Suzuki N** (1965) Nature of resistance to blast. In rice blast disease. The International Rice Research Institute (eds.) The John Hopkins Press, Baltimore Maryland, pp 277-302
- Tadano T, Ozawa K, Sakei H, Osaki M & Matsui H** (1993) Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots. *Plant Soil* **155**: 95-98
- Takabatake R, Hata S, Taniguchi M, Kouchi H, Sugiyama T, Izui K** (1999) Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial phosphate transporters in soybean, maize, rice and Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **40**: 479-486
- Takamori S, Malherbe P, Broger C, Jahn R** (2002) Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci* **21**: 1-6
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R** (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* **407**: 189-194
- Taylor AR & Bloom AJ** (1998) Ammonium, nitrate, and proton fluxes along the maize root. *Plant Cell Environ* **21**: 1255-1263
- Temple SJ, Bagga S, Sengupta-Gopalan C** (1998) Down-regulation of specific members of the glutamine synthetase gene family in alfalfa by antisense RNA technology. *Plant Mol Biol* **37**: 535-547
- Theodorou ME & Plaxton WC** (1993) Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol* **101**: 339-344
- Thiel G & Battey NH** (1998) Exocytosis in plants. *Plant Mol Biol* **38**: 111-125
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP, Broekaert WF** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defence-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15107-15111
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG** (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**: 4876-4882
- Thordal-Christensen H** (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 351-357
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB** (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* **11**: 1187-1194
- Ticconi CA, Delatore CA, Lahner B, Slat DE, Abel S** (2004) Arabidopsis *pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *Plant J* **37**: 801-814

- Tietze F, Seppala R, Renlund M, Hopwood JJ, Hapers GS, Thomas GH, Gahl WA** (1989) Defective lysosomal egress of free sialic acid (N-acetylneuramic acid) in fibroblasts of patients with infantile free sialic acid storage disease. *J Biol Chem* **264**: 15316-15322
- Tjaden J, Schwöppe C, Möhlmann T, Quick WP, Neuhaus HE** (1998) Expression of the 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
- Ton J, Davison S, Van Wees SCM, Van Loon LC, Pieterse CMJ** (2001) The *Arabidopsis* ISR1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol* **125**: 652-661
- Torriani A** (1990) From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Bioessays* **12**: 371-376
- Trull MC & Deikman J** (1998) An *Arabidopsis* mutant missing one acid phosphatase isoform. *Planta* **206**: 544-550
- Uknes S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter S, Williams S, Dinicher S, Chandler D, Slusarenko A, Ward E, Ryals J** (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**: 645-656
- Ulrich-Eberius CI, Novacky A, Fischer E, Lüttge U** (1981) Relationship between energy-dependent phosphate uptake and the electrical membrane potential in *Lemna gibba* G1. *Plant Physiol* **67**: 797-801
- Ulrich-Eberius CI, Novacky A, van Bel AJE** (1984) Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: energetics and kinetics. *Planta* **161**: 46-52
- Vachova L & Palkova Z** (2005) Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. *J Cell Biol* **169**: 711-717
- van Camp W, Van Montagu M, Inzé D** (1998) H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci* **3**: 330-334
- van Dam NM & Baldwin IT** (2001) Competition mediates cost of jasmonate-induced defenses, acquisition and transgenerational plasticity in *Nicotiana attenuata*. *Funct Ecol* **15**: 406-415
- van der Krol AR, Lenting PE, Veenstra J, Van der Meer IM, Koes RE, Gerats AGM, Mol JNM, Stuitje AR** (1988) An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* **333**: 866-869
- van Doorn W & Woltering EJ** (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 117-122
- Van Loon LC & Van Strien EA** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* **55**: 85-97
- Van Wees SC & Glazebrook J** (2003) Loss of non-host resistance of *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant*, **33**: 733-742
- Vanacker H, Lu H, Rate DN, Greenberg JT** (2001) A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. *Plant J* **28**: 209-216
- Varoqui H, Schäfer MKH, Zhu HM, Weihe E, Erickson JD** (2002) Identification of the differentiation-associated Na⁺-P-I transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* **22**: 142-155
- Vaux DL** (1999) Caspases and apoptosis – biology and terminology *Cell death Diff* **6**: 493-494
- Verheijen FW, Verbeek E, Aula N, Beerens CE, Havelaar AC, Joosse M, Aula P, Galjaard H, van der Spek PJ, Mancicni GM** (1999) A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat Genet* **23**: 462-465
- Versaw WK & Harrison MJ** (2002) A Chloroplast phosphate transporter PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell* **14**: 1751-1766
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK** (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J* **45**: 523-539

- Vick BA & Zimmerman DC** (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol* **75**: 458-461
- von Röpenack E, Parr A, Schulze-Lefert P** (1998) Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *J Biol Chem* **273**: 9013-9022
- von Wiren N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB** (2000) The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 254-261
- Walbot V** (1985) On the life strategies of plants and animals. *Trends Genet* **1**:165
- Walch-Liu P, Neumann G, Bangerth F, Engels C** (2000) Rapid effects of nitrogen on leaf morphogenesis in tobacco. *J Exp Bot* **51**: 227-237
- Walther-Larsen H, Brandt J, Collinge DB, Thordal-Christensen H** (1993) A pathogen-induced gene of barley encodes HSP90 homologue showing striking similarity to vertebrate forms resident in the endoplasmic reticulum. *Plant Mol Biol* **21**: 1097-1108
- Walton JD** (1996) Host-selective toxins: agents of compatibility. *Plant Cell* **8**: 1723-1733
- Wang X & Below FE** (1996) Cytokonins in enhanced growth and tillering of wheat induced by mixed nitrogen source. *Crop Sci* **36**: 121-126
- Wanner BL** (1993) Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* **51**: 47-54
- Ward ER, Kuhn C, Tegeder, Frommer WB** (1998) Sucrose transport in higher plants. *Int Rev Cytol* **178**: 41-71
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Métraux JP, Ryals JA** (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**: 1085-1094
- Wee EG, Sherrier DJ, Prime TA, Dupree P** (1998) Targeting of active sialyltransferase to the plant golgi apparatus. *Plant Cell* **10**: 1759-1768
- Weigel D & Glazebrook J** (2002) *Arabidopsis*. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Weisshaar B & Jenkins GI** (1998) Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 251-257
- Wendt UT, Wenderoth I, von Schaewen A** (2000) Molecular characterisation of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* **23**: 723-733
- Werner A, Dehmelt L, und Nalbant P** (1998) Na⁺-dependent phosphate cotransporters: the NaPi protein families. *J Exp Biol* **201**: 3135-3142
- West G, Inze D, Beemster GTS** (2004) Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiol* **135**: 1050-1058
- Weymann K, Hunt M, Uknes S, Neuenschwander U, Lawton K, Steiner HY, Ryals J** (1995) Suppression and restoration of lesion formation in *Arabidopsis lsd* mutants. *Plant Cell* **7**: 2013-2022
- White PJ** (1996) The permeation of ammonium through a voltage-independent K⁺ channel in the plasma membrane of rye roots. *J Membr Biol* **152**: 89-99
- White RF** (1979) Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* **99**: 410-412
- Wick P, Gansel X, Oulevey C, Page V, Studer I, Dürst M, Sticher L** (2003) The expression of the t-SNARE AtSNAP33 is induced by pathogens and mechanical stimulation. *Plant Physiol* **123**: 343-351
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562-565
- Winkler HH, Bygrave FL, Lehninger AL** (1968) Characterization of the atractyloside-sensitive adenine nucleotide transport system in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **243**: 20-28

- Winter H, Robinson DG, Heldt HW** (1994) Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. *Planta* **193**: 530-535
- Wipf D, Benjdia M, Rikirsch E, Zimmermann S, Tegeder M, Frommer WB** (2003) An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants, complementation of a yeast *his4* mutant, and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporium*. *Genome* **46**: 177-181
- Wipf D, Ludewig U, Tegeder M, Rentsch D, Koch W & Frommer WB** (2002) Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem Sci* **27**: 139-147
- Wojtaszek P** (1997) Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochem J* **322**: 681-692
- Wu H & Cheung AY** (2000) Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol Biol* **44**: 267-281
- Wykoff DD, Grossman AR, Weeks DP, Usuda H, Shimogawara K** (1999) Psr1, a nuclear localized protein that regulates phosphate metabolism in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 15336-15341
- Xiao SY, Ellwood S, Calis O, Patrick E, Li TX, Coleman M, Turner JG** (2001) Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. *Science* **291**: 118-120
- Xu Y, Chang PFL, Liu D, Narasimhan, M L, Raghothama, KG, Hasegawa PM, Bressan RA** (1994) Plant defence genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* **6**: 1077-1085
- Yanagisawa S, Akiyama A, Kisaka H, Uchimiya H, Miwa T** (2004) Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7833-7838
- Yang Y, Shah J, Klessing DF** (1997) Signal perception and transduction in plant defence responses. *Genes Dev* **11**: 1621-1639
- Yen KM & Gunsalus IC** (1982) Plasmid gene organisation: Naphthalene/salicylate oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 874-878
- Yoshioka K, Kachroo P, Tsui F, Sharma SB, Shah J, Klessing DF** (2001) Environmentally sensitive, SA-dependent defense responses in the *cpr22* mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* **26**: 447-459
- Zakhleniuk OV, Raines CA, Lloyd JC** (2001) *pho3*: a phosphorus-deficient Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **212**: 529-534
- Zhang ZG, Collinge DB, Thordal-Christensen H** (1995) Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J* **8**: 139-145
- Zhou F, Menke FLH, Yoshioka K, Moder W, Shirano Y, Klessing DF** (2004) High humidity suppresses *ssi4*-mediated cell death and disease resistance upstream of MAP kinase activation, H₂O₂ production and defence gene expression. *Plant J* **39**: 920-932
- Zhu JK** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 247-273
- Zvyagliskaya R, Parchomenko O, Abramova N, Allard P, Panaretakis T, Pattison-Granberg J, Presson BL** (2001) Proton- and sodium-coupled phosphate transport system and energy status of *Yarrowia lipolytica* cells grown in acidic and alkaline conditions. *J Membr Biol* **183**: 39-50

8 Anhang

8.1 „Accession“-Nummern

Die vollständigen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen der *At*ANTR-, *Os*ANTR-Familien sind in der NCBI-Datenbank hinterlegt und unter den jeweiligen Zugangsnummern („Accession“-Nummern) eingetragen.

Tabelle 8.1: Accession-Nummern

Abkürzung	AGI-Nummer	Accession-Nummer
<i>At</i> ANTR1	At2g29650	AAP37848
<i>At</i> ANTR2	At4g00370	NP_197538
<i>At</i> ANTR3	At2g38060	NP_181341
<i>At</i> ANTR4	At3g46980	NP_190282
<i>At</i> ANTR5	At5g44370	AAO22650
<i>At</i> ANTR6	At5g20380	AAP78973
<i>Os</i> ANTR1	Os01g17240	BAA87831
<i>Os</i> ANTR2	Os09g39680	BAD46232
<i>Os</i> ANTR3	Os05g37820	AAX96385
<i>Os</i> ANTR4	Os01g63290	NP_915525
<i>Os</i> ANTR5.1	Os11g08370	AAX96345
<i>Os</i> ANTR5.2	Os12g07970	ABA95938
<i>Os</i> ANTR6	Os09g38410	AAX96345

8.2 Aminosäuresequenzanalyse der ANTR5-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*

In der Abbildung 8.1 ist das Aminosäurealignment der Proteine *At*ANTR1, *At*ANTR2, *At*ANTR3, *At*ANTR4, *At*ANTR5 und *At*ANTR6 aus *Arabidopsis thaliana* sowie *Os*ANTR1, *Os*ANTR2, *Os*ANTR3, *Os*ANTR4, *Os*ANTR5.1, *Os*ANTR5.2 und *Os*ANTR6 aus *Oryza sativa* zu sehen. Die Sequenzähnlichkeiten unter den analysierten Proteinen sind in der Tabelle 8.2 dargestellt.

8.3 Klonierungsstrategien

8.3.1 Herstellung der Konstrukte zur heterologen Expression in *E. coli* und *S. cerevisiae*

Zur heterologen Expression von *AtANTR5* in *E. coli* wurde die codierende Sequenz mittels PCR und den Primer At5g44370-3 und At5g44370-4 (Tab. 2.4) auf cDNA amplifiziert und in den mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* geöffneten Klonierungsvektor pBSK ligiert, wodurch das Konstrukt pLL1 entstand. Daraufhin wurde die *AtANTR5*-DNA mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I aus dem pLL1 Plasmid herausgeschnitten und in den *Bam*HI/*Xho*I geöffneten Expressionsvektor pET16b ligiert. Dabei wurde das *AtANTR5*-Protein c-terminal „in frame“ mit dem His-Tag fusioniert, das aus 10 Histidinen besteht und eine Detektion des synthetisierten Proteins mit spezifischen Anti-His-Antikörper erlaubt. Die *E. coli* C43-Zellen wurden mit dem fertigen pLL2 Konstrukt transformiert und für Aufnahmestudien verwendet. Das Fließschema der Konstruktherstellung ist der Abbildung 8.2 dargestellt.

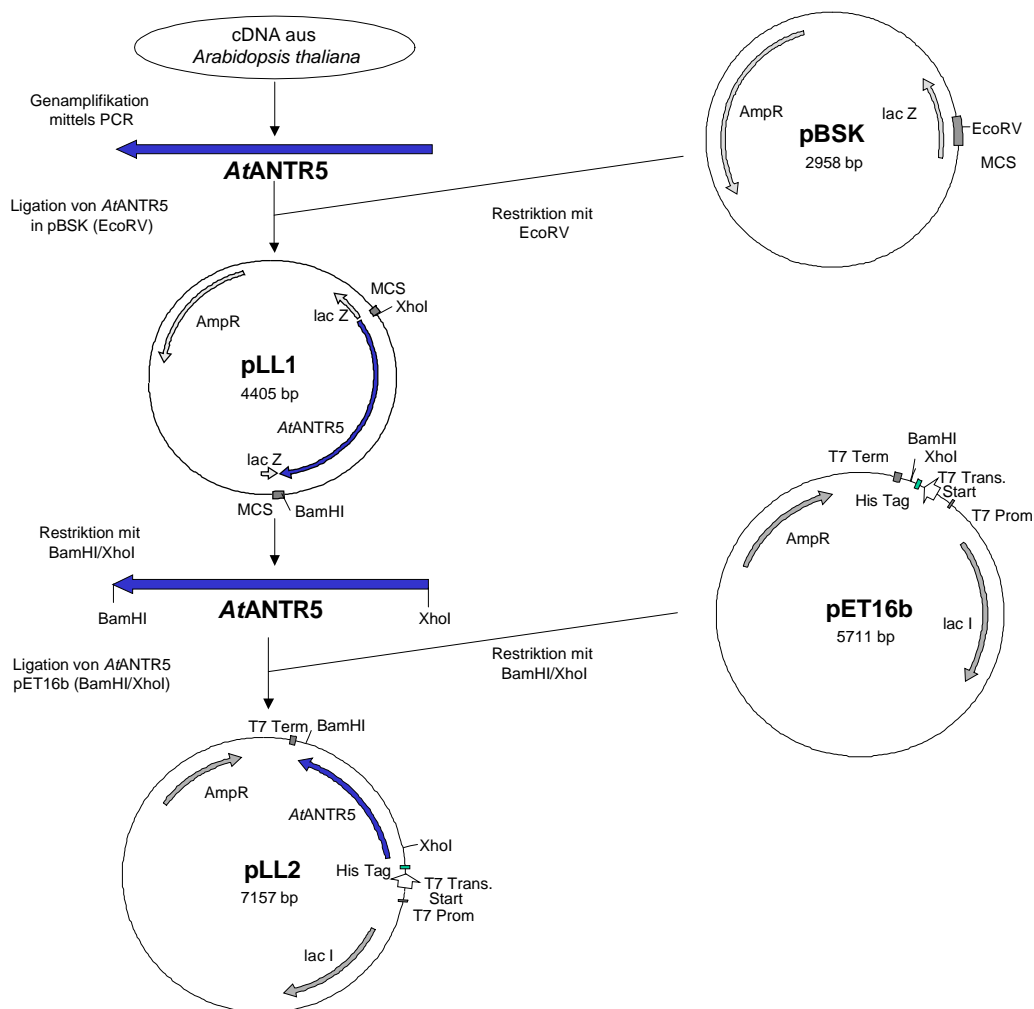


Abbildung 8.2: Fließschema zur Herstellung des pLL2 Konstruktes. PCR: Polymerasekettenreaktion; AmpR: Ampicillinresistenz; MCS: "multiple cloning site"; lacZ: β -Galactosidase; lacI: β -Galactosidase-Repressor; T7 Trans Start: Transkriptionsstart; T7-Prom: T7 Promotor; T7 Term: T7 Terminator.

Zur heterologen Expression von *AtANTR5* in *S. cerevisiae* wurde die codierende Sequenz gemeinsam mit dem His-Tag unter Verwendung der Primer pET-Kozak und pET-PstI (Tab. 2.4) und des pLL2-Konstrukts als „Template“ mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit dem Enzym PstI geschnitten und in den SmaI/PstI geöffneten pDR196 Vektor ligiert, wobei das Konstrukt pLL15 entstanden ist. Das Fließschema der Konstruktherstellung ist in der Abbildung 8.3 dargestellt. Die *S. cerevisiae* 22Δ8AA-Zellen wurden mit dem Konstrukt pLL15 transformiert und für heterologe Expression und Aufnahmen an ganzen Zellen oder im artifizialen Liposomensystem verwendet.

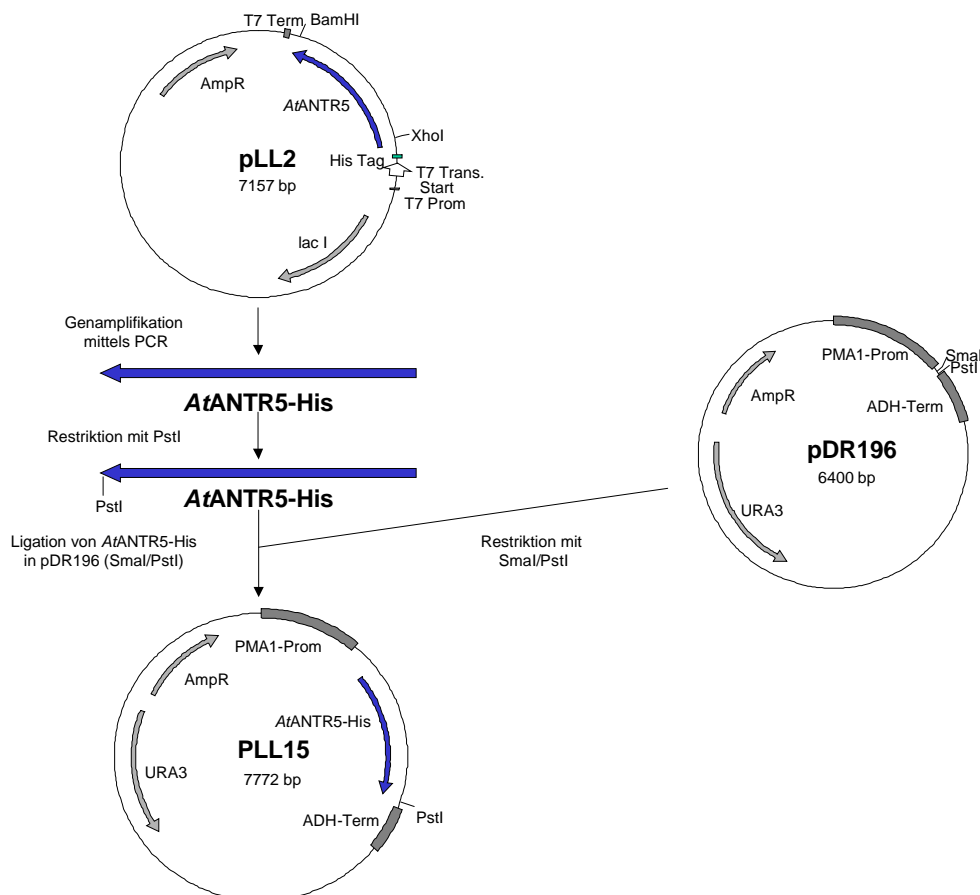


Abbildung 8.3: Fließschema zur Herstellung des pLL15 Konstruktes. PCR: Polymerasekettenreaktion; AmpR: Ampicillinresistenz; lacI: β -Galactosidase-Repressor; T7 Trans Start: Transkriptionsstart; T7-Prom: T7 Promotor; T7 Term: T7 Terminator; URA3: Gen der Uracil-Synthese; PMA1-Prom: Plasmamembran-ATPase-Promotor; ADH-Term: Polyadenylierungssignal aus dem Alkohol-Dehydrogenase-Gen.

8.3.2 Herstellung des *AtANTR5::GFP*-Konstruktes zur subzellulären Lokalisierung von *AtANTR5*

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von *AtANTR5* wurde ein Konstrukt zur Synthese eines GFP-Fusionsproteins in transformierten Pflanzenzellen hergestellt. Dazu wurden *AtANTR5* mit den Primern At5g44370-3 und At5g44370-10 und pLL1 als „Template“ mittels PCR amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen XhoI und KpnI geschnitten und in den entsprechend geöffneten pGFP2-Vektor ligiert. Das entstandene Konstrukt pLL3 enthält das GFP-Gen (*green fluorescent protein*) das im offenen Leseraster mit *AtANTR5* fusioniert ist. Bei den Lokalisierungsstudien wurde das pLL3-Konstrukt für transiente Expression des *AtANTR5::GFP*-Proteins in Protoplasten von *N. tabacum* und *Arabidopsis*-Suspensionszellkultur verwendet. Das Fließschema der Konstruktherstellung ist in der Abbildung 8.4 dargestellt.

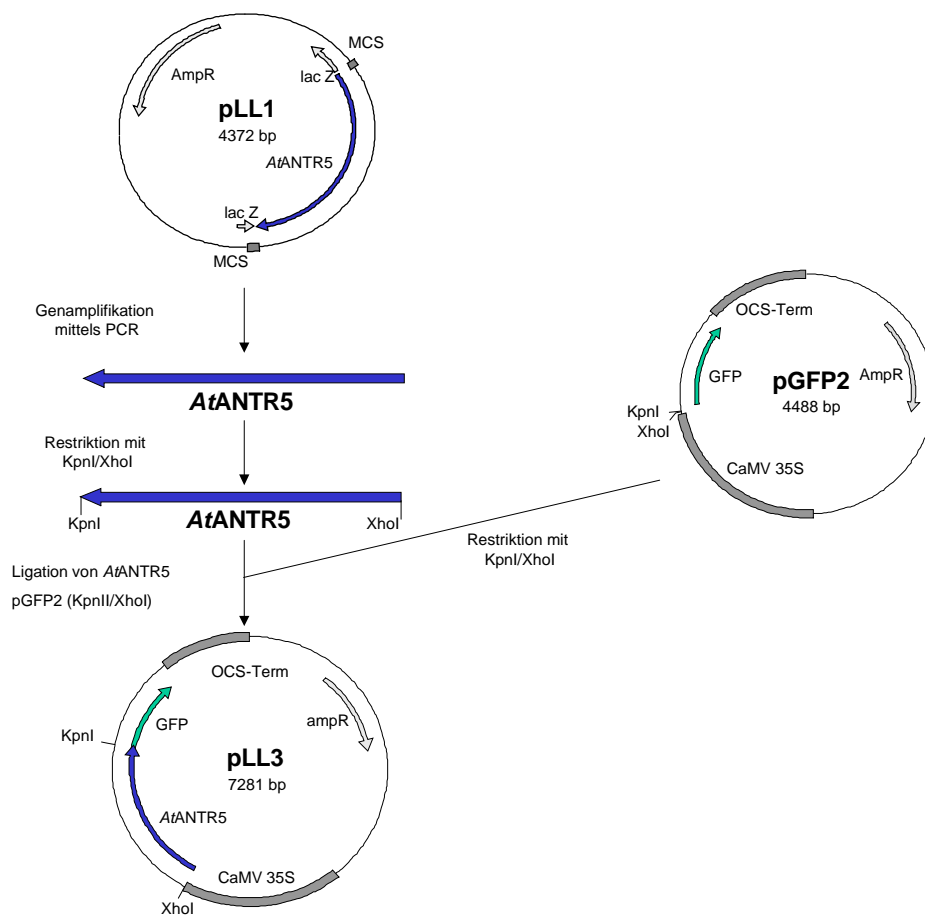


Abbildung 8.4: Fließschema zur Herstellung des pLL3 Konstruktes. PCR: Polymerasekettenreaktion; Amp^R: Ampicillinresistenz; MCS: "multiple cloning site"; CaMV-35S: Cauliflower-Mosaikvirus-Promotor; OCS: Polyadenylierungssignal aus dem Octopinsynthese-Gen; RB: Right Border; LB: Left Border.

8.3.3 Herstellung des *AtANTR5*-c-Myc-Tag-Konstruktes zur subzellulären Lokalisierung von *AtANTR5*

Zur Analyse der subzellulären Lokalisierung des *AtANTR5* wurden transgene Pflanzen hergestellt, bei denen *AtANTR5* mit einem c-terminalen c-Myc-Tag fusioniert und seine Expression unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotor gestellt ist. Das Fusionsprotein *AtANTR5*-c-Myc-Tag kann auf diese Weise mit Hilfe eines spezifischen Anti-c-Myc-Tag Antikörpers nachweisen werden.

Zur Herstellung des Konstruktes wurde die *AtANTR5*-Sequenz mit den Primern At5g44370-3 und At5g44370-27 (Tab. 2.4) auf dem 1.Strang cDNA mittels PCR amplifiziert, wobei die codierende Sequenz von *AtANTR5* mit dem c-Myc-Tag fusioniert wurde. Der Primer At5g44370-27 enthält die codierende c-Myc-Tag-Sequenz (Aminosäuresequenz: Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu). Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den mit dem Restriktionsenzym EcoRV geöffneten Klonierungsvektor pBSK ligiert (pLL11). Im Folgenden wurde *AtANTR5*-c-Myc über die Restriktionsenzyme BamHI/XhoI aus dem pLL11-Plasmid herausgeschnitten und in den Vektor pHannibal ligiert, dabei ist das Plasmid pLL12 entstanden. Zusammen mit dem CaMV-35S-Promotor und dem OCS-Terminator wurde die *AtANTR5*-c-Myc-Sequenz über das Enzym NotI aus pLL12 herausgeschnitten und in den Pflanzentransformationsvektor pART27 ligiert. Nach Fertigstellung dieses Konstruktes (pLL14) wurde das Plasmid in *Agrobakterien* und anschließend in *Arabidopsis* Pflanzen transformiert, die dann anhand der erworbenen Kanamycinresistenz entsprechend selektiert wurden. Das Fließschema der Konstruktherstellung ist in der Abbildung 8.5 dargestellt.

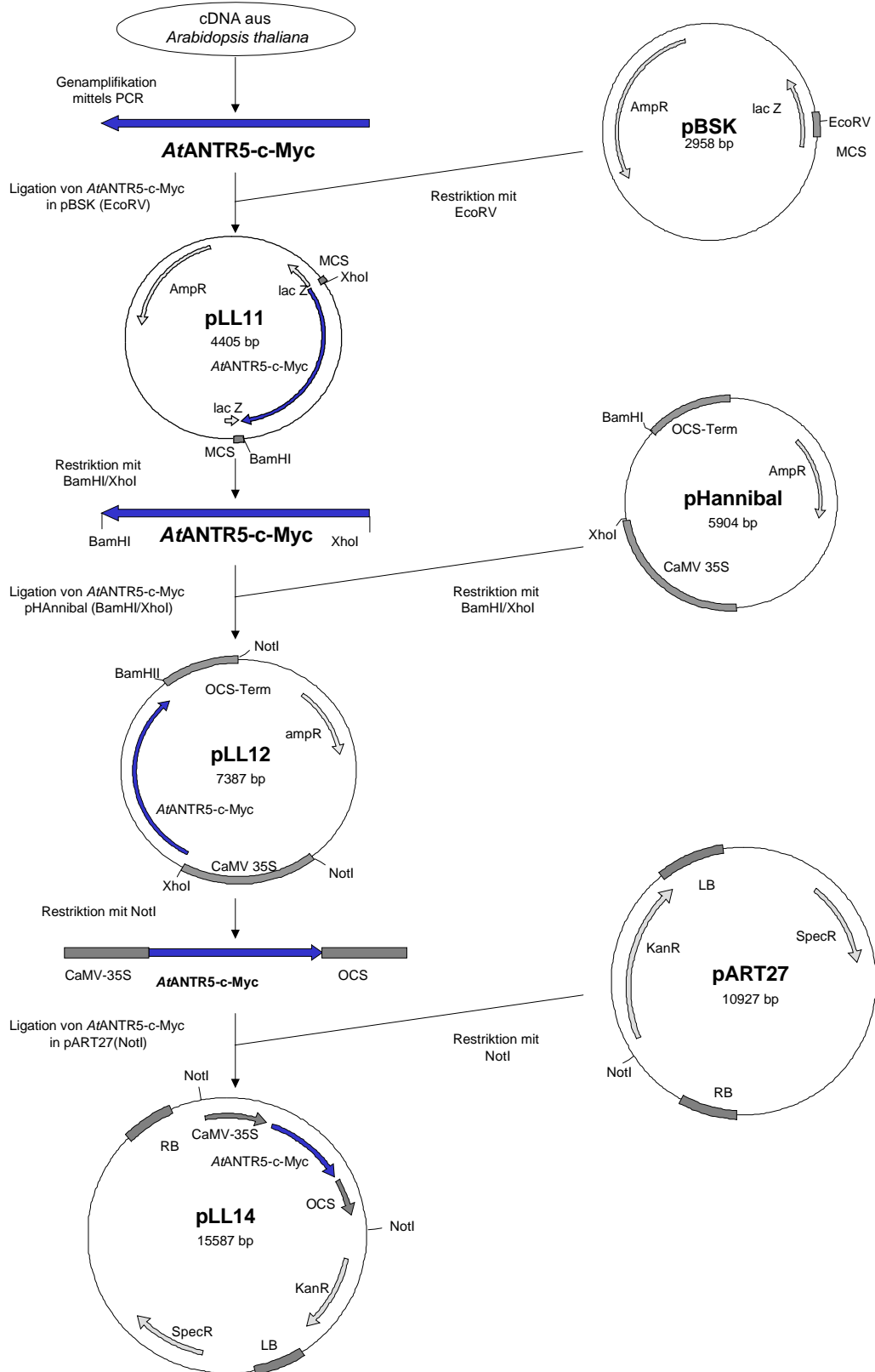


Abbildung 8.5: Fließschema zur Herstellung des pLL14 Konstruktes. PCR: Polymerasekettenreaktion; AmpR: Ampicillinresistenz; KanR: Kanamycinresistenz; SpecR: Spectinomycinresistenz; MCS: "multiple cloning site"; CaMV-35S: Cauliflower-Mosaikvirus-Promotor; OCS: Polyadenylierungssignal aus dem Octopinsynthese-Gen; RB: Right Border; LB: Left Border.

8.3.4 Herstellung des *AtANTR5*-Promotor-GUS-Fusionskonstruktes zur Analyse der gewebespezifischen Expression

Für die Analyse der gewebespezifischen Expression von *AtANTR5* wurde dessen 1037 bp umfassender Promotorbereich inklusive 60 Nukleotiden hinter dem Start-ATG mit den Primern At5g44370-11 und At5g44370-12 (Tab. 2.4) auf gDNA mittels PCR amplifiziert. Das ungeschnittene PCR-Produkt wurde daraufhin in den mit *EcoRV*-linearisierten Klonierungsvektor pBSK ligiert (Konstrukt pLL5). Nach dem Restriktionsverdau mit den Enzymen *Sall* und *SmaI*, wurde der Promotorbereich von *AtANTR5* in den entsprechend geöffneten Pflanzentransformationsvektor pGPTV ligiert. Der Promotorbereich wurde „in frame“ vor das GUS-Gen (β -Glucuronidase) kloniert. Das fertige Konstrukt pLL6 wurde in *Agrobakterien* und anschließend in *Arabidopsis* Pflanzen transformiert. Die Klonierungsstrategie ist in der Abbildung 8.6 dargestellt.

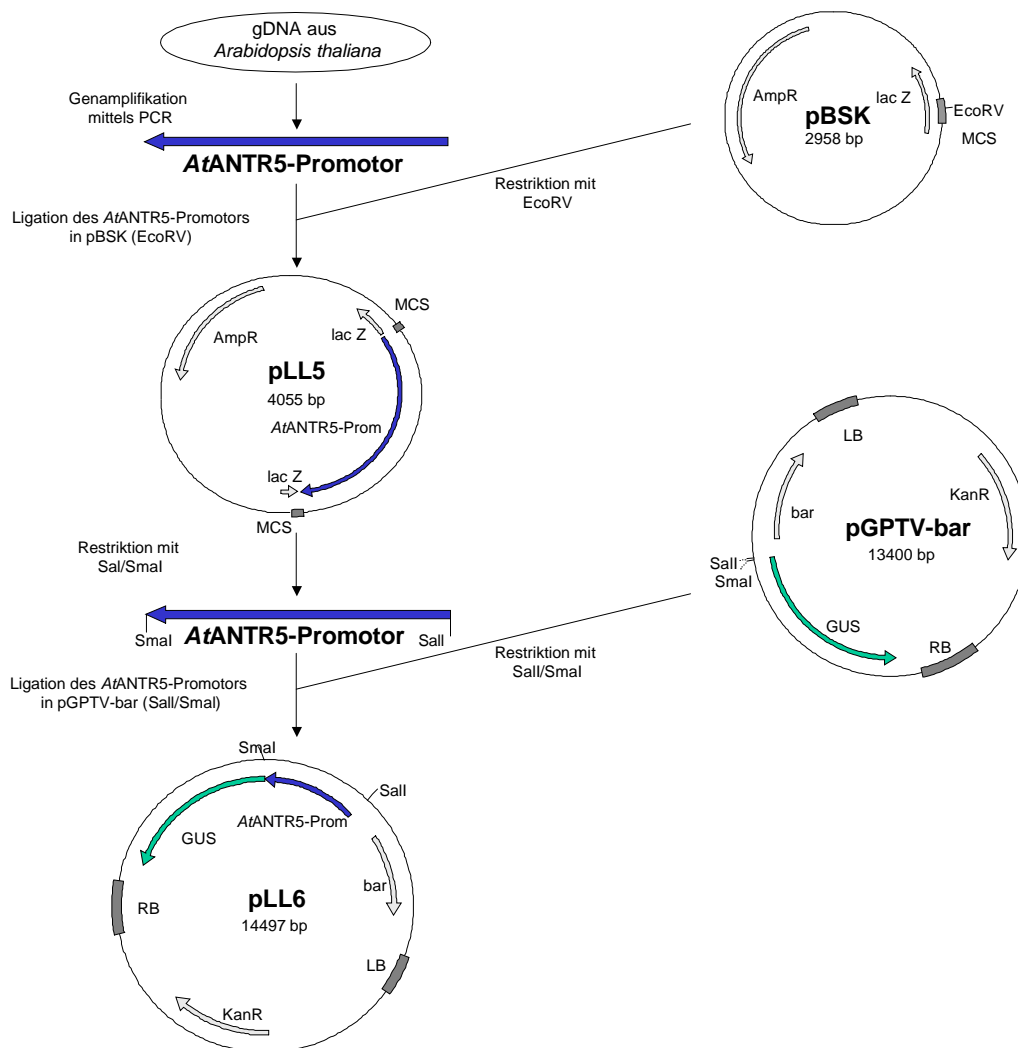


Abbildung 8.6: Fließschema zur Herstellung des pLL6 Konstruktes. PCR: Polymerasekettenreaktion; Amp^R: Ampicillinresistenz; MCS: "multiple cloning site"; lacZ: β -Galactosidase; Kan^R: Kanamycinresistenz; *AtANTR5*-Prom: *AtANTR5*-Promotor; bar: Phosphinotricin-Acetyl-Transferase; GUS: β -Glucuronidase; RB: Right Border; LB: Left Border.

8.3.5 Herstellung des *AtANTR5*-Komplementationskonstruktes zur Komplementation von *antr5*-Insertionsmutanten

Für die Komplementation der *antr5*-Mutante wurde die kodierende *AtANTR5*-Sequenz und jeweils der endogene Promotor und Terminator verwendet. Für die Herstellung des Komplementationskonstruktes wurde eine 1257 bp lange Promotorsequenz, der kodierende, 1299 bp lange DNA-Abschnitt gemeinsam mit 361 bp des 5'UTR-Bereichs durch PCR mit den Primern At5g44370-23 und At5g44370-24 auf gDNA amplifiziert. Der gesamte DNA-Abschnitt wurde in den mit EcoRV linearisierten Pflanzentransformationsvektor pGreen0029 (Tab. 2.3) ligiert, wobei das Komplementationskonstrukt pLL14 entstanden ist. Das Fließschema der Konstruktherstellung ist in der Abbildung 8.7 dargestellt. Anschließend wurde das Plasmid pLL7 gemeinsam mit pSoup in *A. tumefaciens* transformiert. Das Plasmid pSoup enthält das RepA-Gen, das mit pSa Ori interagiert und die Replikation des pLL7-Konstruktes in *A. tumefaciens*-Zellen ermöglicht.

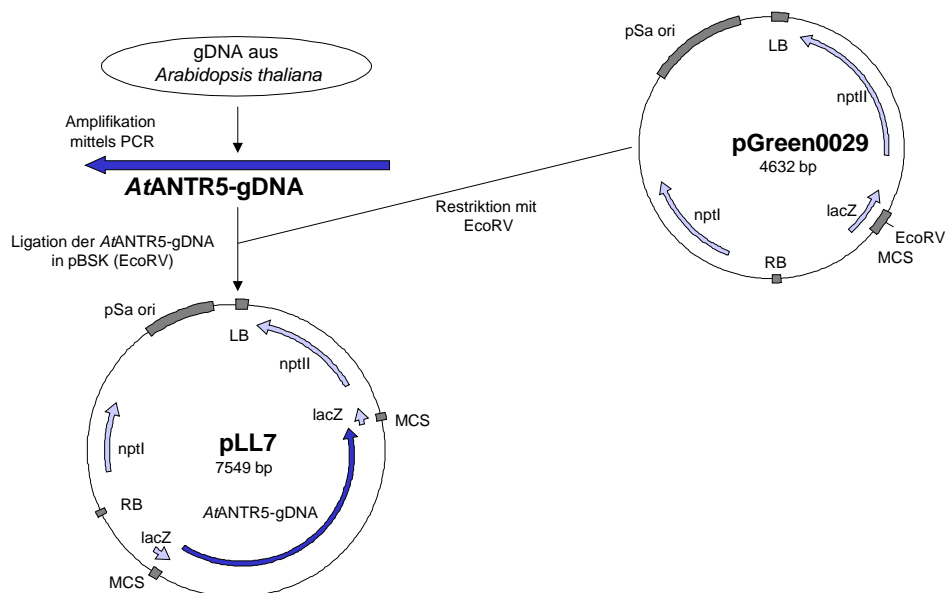


Abbildung 8.7: Fließschema zur Herstellung des pLL7 Konstruktes. PCR: Polymerasekettenreaktion; AmpR: Ampicillinresistenz; nptII: Kanamycinresistenz; MCS: "multiple cloning site"; pSa Ori: Replikationsursprung; lacZ: β -Galactosidase; RB: Right Border; LB: Left Border.

8.3.6 Klonierungsstrategie des *AtANTR5*-Antisense-Konstruktes zur Herstellung von Dosismutanten

Zur Herstellung des *AtANTR5*-Antisense-Konstruktes wurde ein *AtANTR5*-Sequenzabschnitt durch PCR mit den Primern At5g44370-20 und At5g44370-21 und pLL1-Plasmid als „Template“ amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit BamHI und EcoRI in den pHannibal-Vektor kloniert (Plasmid pLL8). Der Antisense-DNA-Abschnitt steht dabei unter der Kontrolle von einem konstitutiven CaMV-35S-Promotor und einem OCS-Terminator. Nach einem

Restriktionsverdau mit NotI wurde der CaMV-35S-*AtANTR5*-OCS-Sequenzabschnitt in den entsprechend linearisierten Pflanzentransformationsvektor pART27 ligiert. Das fertige Konstrukt pLL9 wurde abschließend in *A. tumefaciens*-Zellen transformiert, die weiter für die Herstellung von *A. thaliana*-Dosismutanten, bezüglich des *AtANTR5*-Gens, verwendet wurden. Das Fließschema der Konstruktherstellung ist in der Abbildung 8.8 dargestellt.

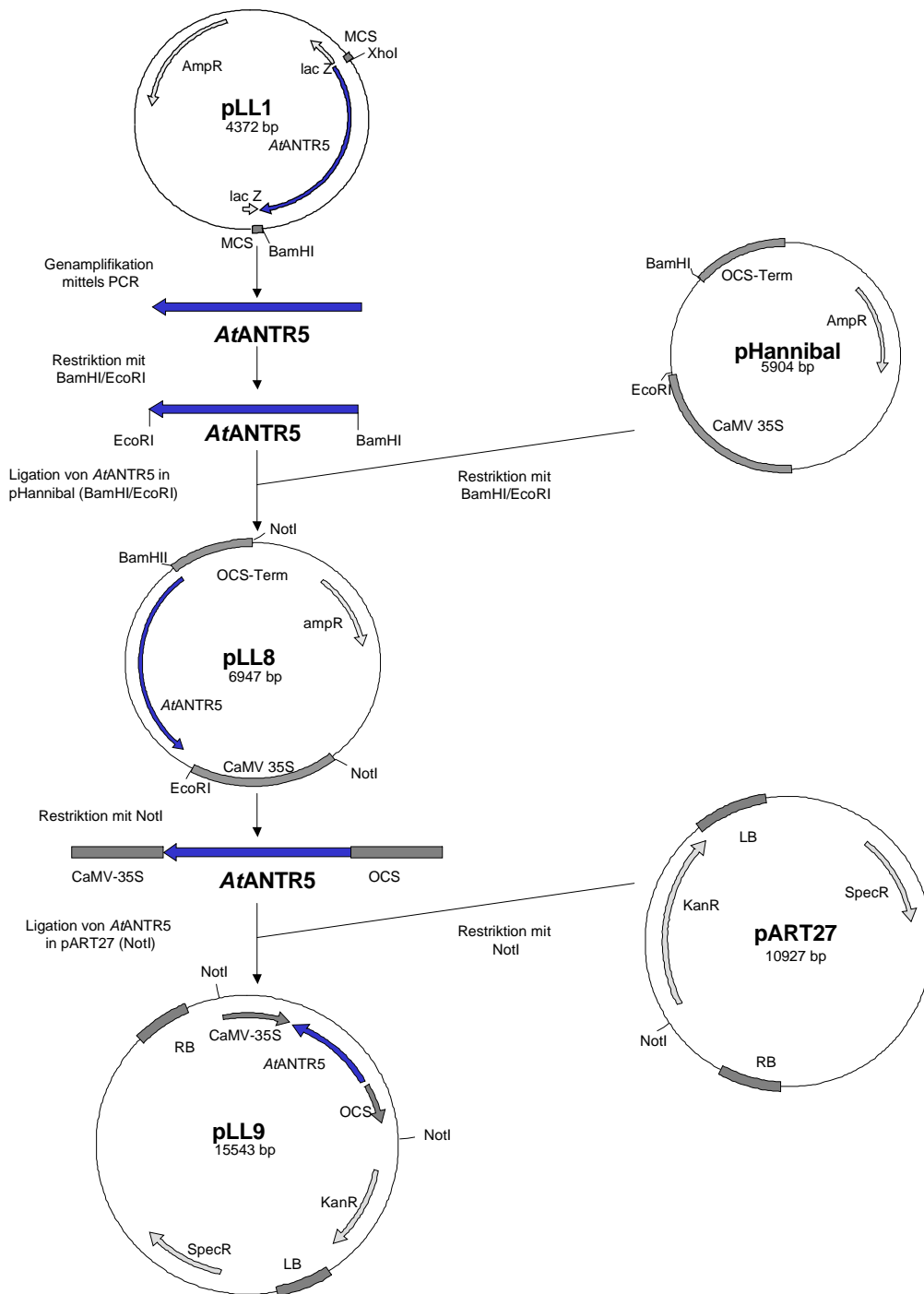


Abbildung 8.8: Fließschema zur Herstellung des pLL9 Konstruktes. PCR: Polymerasekettenreaktion; AmpR: Ampicillinresistenz; MCS: "multiple cloning site"; lacZ: β -Galactosidase; KanR: Kanamycinresistenz; *AtANTR5*-Prom: *AtANTR5*-Promotor; GUS: β -Glucuronidase; RB: Right Border; LB: Left Border.

8.4 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
A	Ampère
AAP	amino acid permease
Abb.	Abbildung
ACS	anion cation symporter
ADH	Alkoholdehydrogenas
Amp	Ampicillin
ANT1	aromatic and neutral amino acid transporter1
ANTR	Anion-Transporter
APC	amino acid-polyamino-choline
APS	Ammoniumpersulfat
AQC	6-aminoquinolyl-Nhydroxysuccinimidylcarbamat
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATF1	amino acid transporter superfamily 1
AtLHT1	lysine histidine transporter 1
ATP	Adenosintriphosphat
Avr	Avirulenz
BA2H	Benzoessäure-2-Hydroxylase
bidest.	doppelt destilliert
BNPI	brain-specific Na ⁺ -dependent inorganic phosphate cotransporter
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CAT1	cationic amino acid transporter 1
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cfu	kolonienbildende Einheit
Ci	Curie
CNGC	cyclic nucleotid-gated ion channel
cpn1	copine 1
cpr22	constitutive expresser of PR genes 22
DAB	Diaminobenzidin
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPI	differentiaion-associated brain-specific Na ⁺ -dependent inorganic phosphate cotransporter
DsRED	Discosoma ssp. red

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eds	enhanced disease susceptibility
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GA	Gentisinsäure
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
Gen	Gentamycin
GFP	green fluorescence protein
GluR	Glutamatrezeptoren
GOGAT	Glutamat-Synthase
GPT	Glucose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator
GS	Glutamin-Synthetase
GUS	β -Glucoronidase
h	Stunde
HATS	high affinity transport system
His-„Tag“	Histidin-tag
HPLC	high pressure liquid chromatography
HR	Hypersensitive Reaktion
ICS	Isochorismat-Synthase
IEP32	inner envelope protein 32
IPL	Isochorismat-Pyruvat-Lyase
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
ISR	induzierte systemische Resistenz
ISSD	infantile sialic acid storage disorder
JA	Jasmonsäure
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
λ	Wellenlänge
l	Liter
LATS	low affinity transport system
LB	Left Border
Isd6	lesions simulating disease 6
μ	mikro
m	milli
M	molar
MCS	Multiple Cloning Site (=Multiple Klonierungsstelle)
MFS	major facilitator superfamily”
min	Minute

MOPS	2-[N-Morpholino]-Ethansulfonsäure
mpk4	map kinase 4
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	nano
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat _{red}
NahG	Gen, dass für die Salizylat-Hydroxylase codiert
NaPi	Natrium-Phosphattransporter
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	nitric oxid synthase
NR	Nitratreduktase
NSF	Nethymaleimide-sensitive factor
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
Os	<i>Oryza sativa</i>
p.a.	per Analysis
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PCD	programmed cell death
PCR	Polymerase Chain Reaction
pdr2	phosphate defieciency response 2
P _i	anorganisches Phosphat
PMA	Plasmamembran H ⁺ -ATPase
PR	pathogenesis-related
ProT	proline transporter
QORH	quinone oxido reductase
r	Resistenzgen
RB	Right Border
rhd6	reduced root hair density 6
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
RV	Restriktionsverdau
s	Sekunde
SA	Salicylsäure
SAR	systemisch erworbene Resistenz
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sid	salicylic acid induktion deficient
SNAP	soluble NSF-attachment protein
stt3a-1	staurosporin und temperature sensitive 3a-1
Tab.	Tabelle
T-DNA	transfer DNA
TEMED	Tetramethylethylendiamin

Tet	Tetrazyklin
TIR-NBS-LRR	toll-interleukin 1 receptor - nucleotide binding site – leucine rich repeats
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Unit (μmol Substrat pro Minute)
UV	ultraviolett
V	Volt
VGLUT	vesikuläre Glutamat Transporter
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronid

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	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Publikationsliste

Jens Reiser, Nicole Linka, Lilia Lemke, Wolfgang Jeblick and H. Ekkehard Neuhaus (2004) Molekular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, November 2004, Vol. **136**: 3524-3536

Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen: Poster

Deutsche Botanikertagung in Braunschweig, vom 05-10 September 2004

Lilia Lemke, H. Ekkehard Neuhaus (2004) Characterization of a putative sodium/phosphate transporter (*ANTR5*) from *Arabidopsis thaliana*.

Tri-National Arabidopsis Meeting in Neuchâtel, Schweiz (2005)

Magali Schnell, Lilia Lemke, Hanna Schneider, Ulrike Schmidt, Enrico Martinoia, H. Ekkehard Neuhaus (2005) A transporter implicated in glutamate homeostasis.

Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name Lilia Lemke
Geburtsdatum 03.02.1977
Geburtsort Nowosibirsk, Russland

Schulbildung

09/84 - 10/92 Gesamtschule Nowosibirsk, Abschluss: Mittlere Reife
12/92 - 07/93 Realschule Loßburg
09/93 - 06/98 Gymnasium Mössingen Abschluss: Abitur

Studium

10/98 - 08/03 Studium der Biologie an der TU Kaiserslautern
Diplomarbeit in der Abteilung Pflanzenphysiologie
(Prof. Dr. H.E. Neuhaus)
Thema: Molekulare und biochemische Charakterisierung der
Isoformen des plastidären ATP/ADP-Transporters aus
Arabidopsis thaliana (L.)

Promotion

09/03 - 12/06 Promotionsstipendiat des Graduiertenkolleg der DFG:
„Molekulare, physiologische und pharmakologische Analyse von
zellulärem Membrantransport“. Promotion in der Abteilung
Pflanzenphysiologie (Prof. Dr. H.E. Neuhaus)
Thema: Charakterisierung eines Membranproteins aus
Arabidopsis mit strukturellen Ähnlichkeiten zu den
Transportern der Natrium-Phosphat1-Familie aus
Tieren

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den lieben Menschen bedanken, ohne deren Hilfe die Verwirklichung dieser Arbeit nicht möglich oder zumindest deutlich schwieriger gewesen wäre.

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus für die Überlassung des spannenden Themas und die vertrauensvolle Zusammenarbeit danken. Prof. Dr. Matthias Hahn danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und für die Übernahme des Zweitgutachtens. Danken möchte ich auch den Kooperationspartnern Dr. Michael Melzer am IPK Gatersleben und Prof. Enrico Martinoia sowie Dr. Ulrike Schmidt am Botanischen Institut Zürich. Dr. Thorsten Stoeck danke ich für seine Hilfe bei Erstellung des Stammbaumes. Ein besonderes Dankeschön schulde ich Dr. Torsten Möhlmann für die unkomplizierte Betreuung und Korrektur des Manuskripts. Ich bedanke mich auch bei Dr. Saeed Khoursandi und Wolfgang Jeblick für die wertvollen Labortipps und die praktische Hilfestellung, sowie Nadine Bentel für ihre Mitarbeit am Projekt innerhalb ihrer Diplomarbeit. Ein spezieller Dank geht an unsere Organisationstalente Christa Jung und Gabrielle Amoroso.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Für die freundschaftliche Zusammenarbeit, ein stets offenes Ohr und aufmunternden Worte bedanke ich mich bei Claude, Ingmar und Simon.

Alex danke ich für die vielen kleinen und großen Hilfen, die praktische und moralische Unterstützung und die außerordentlich gute Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön meinen Eltern, die mich während meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützt, mir Mut zugesprochen und zu mir gestanden haben.

Schließlich gilt besonderer Dank Uli für seine bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die keine namentliche Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Eidesstattliche Versicherung

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

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

Kaiserslautern, im Juli 2006

Lilia Lemke

Alles Wissen und alles Vermehren unseres
Wissens endet nicht mit einem Schlusspunkt,
sondern mit einem Fragezeichen.

Hermann Hesse

